



HAL
open science

Vers un nouveau biosubstitut pour l'ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur : Approche biomécanique

Cédric P. Laurent

► **To cite this version:**

Cédric P. Laurent. Vers un nouveau biosubstitut pour l'ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur : Approche biomécanique . Biomécanique [physics.med-ph]. Université de Lorraine, 2012. Français. NNT : 2012LORR0073 . tel-01749742v2

HAL Id: tel-01749742

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01749742v2>

Submitted on 15 Mar 2017

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.

Thèse
pour l'obtention du grade de
Docteur de l'université de Lorraine
Spécialité : Mécanique et Énergétique

par
Cédric LAURENT
Ingénieur Arts & Métiers ParisTech

**Vers un nouveau biosubstitut pour l'ingénierie tissulaire du
Ligament Croisé Antérieur**
Approche biomécanique

Towards a new biosubstitute for Anterior Cruciate Ligament Tissue Engineering
A biomechanical approach

Thèse dirigée par : Jean-François Ganghoffer et Rachid Rahouadj

Composition du jury

| | | |
|--------------|--------------------------|---|
| Rapporteurs: | Dominique Pioletti | Professeur, EPFL, Lausanne |
| | David Mitton | Directeur de recherche, IFSTTAR, Université Lyon 1 |
| Examineurs: | Cécile Legallais | Directrice de recherche, UTC, Compiègne |
| | Didier Mainard | PU-PH, CHU, Nancy |
| | Damien Durville | Chargé de recherche, LMSSMat, Ecole Centrale Paris |
| | Jean-François Ganghoffer | Professeur, Université de Lorraine, Nancy (directeur de thèse) |
| | Rachid Rahouadj | Professeur, Université de Lorraine, Nancy (co-directeur de thèse) |



Thèse
pour l'obtention du grade de
Docteur de l'université de Lorraine
Spécialité : Mécanique et Énergétique

par
Cédric LAURENT
Ingénieur Arts & Métiers ParisTech

**Vers un nouveau biosubstitut pour l'ingénierie tissulaire du
Ligament Croisé Antérieur**
Approche biomécanique

Towards a new biosubstitute for Anterior Cruciate Ligament Tissue Engineering
A biomechanical approach

Thèse dirigée par : Jean-François Ganghoffer et Rachid Rahouadj

Composition du jury

| | | |
|--------------|--------------------------|---|
| Rapporteurs: | Dominique Pioletti | Professeur, EPFL, Lausanne |
| | David Mitton | Directeur de recherche, IFSTTAR, Université Lyon 1 |
| Examineurs: | Cécile Legallais | Directrice de recherche, UTC, Compiègne |
| | Didier Mainard | PU-PH, CHU, Nancy |
| | Damien Durville | Chargé de recherche, LMSSMat, Ecole Centrale Paris |
| | Jean-François Ganghoffer | Professeur, Université de Lorraine, Nancy (directeur de thèse) |
| | Rachid Rahouadj | Professeur, Université de Lorraine, Nancy (co-directeur de thèse) |

Résumé

L'ingénierie tissulaire, qui consiste à remplacer un tissu lésé par un biosubstitut constitué de cellules réparatrices ensemencées dans une matrice de support biodégradable, possède un potentiel prometteur pour la réparation du Ligament Croisé Antérieur (LCA). Or, aucune solution opérationnelle n'a encore été proposée à ce jour, notamment au vu du nombre de domaines scientifiques impliqués.

Dans ce travail, nous avons dressé un cahier des charges pour la définition de cette matrice en nous appuyant sur l'état de l'art. Une matrice de support tressée multicouche constituée de fibres de P(LL85/CL15) a été imaginée, puis les outils nécessaires à sa fabrication à l'échelle du laboratoire ont été mis en place. Nous avons ensuite développé des outils numériques spécifiques permettant la modélisation de sa géométrie et de son comportement biomécanique multi-échelles, qui ont été mis à profit afin d'optimiser les caractéristiques de la matrice compte tenu du cahier des charges établi.

De plus, des caractérisations biologiques ont montré que la matrice était compatible avec la culture de cellules souches, et était susceptible d'accueillir la formation d'un néo-tissu. Par ailleurs, nous avons mis en place un bioréacteur spécifique permettant d'imposer à la matrice de support des cycles de traction-torsion sous environnement contrôlé.

L'utilisation des informations locales issues de la modélisation biomécanique, afin d'interpréter ou d'optimiser les résultats de culture cellulaire sous sollicitations cycliques, constitue une perspective majeure du présent travail. Notre investigation permet en outre de penser qu'un nouveau biosubstitut pour le LCA pourrait prochainement être proposé.

Mots-clefs : ingénierie tissulaire, ligament croisé antérieur, biomécanique, biosubstitut, matrice de support, simulation par éléments finis, bioréacteur, mécanobiologie.

Abstract

Tissue engineering, which consists in replacing an injured tissue with a biodegradable scaffold seeded with cells, has the potential to overcome the limitations associated with current reconstructions strategies of the Anterior Cruciate Ligament (ACL). However, no relevant solution has been proposed yet, especially due to the variety of scientific fields involved in this approach.

In the current study, the key requirements for the design of a new scaffold have been listed from the current state of art. A scaffold based on P(LL85/CL15) fibers arranged into a multilayer braided structure has been proposed, and the tools needed to process this scaffold have been developed. Dedicated numerical tools have been proposed in order to predict the morphological and multiscale biomechanical behavior of the scaffold. These simulation tools have enabled to optimize the scaffold geometry in order to match the selected key requirements for ACL tissue engineering.

Moreover, preliminary biological assessments have shown that the scaffold was suited for the culture of stem cells and for tissue formation. In addition, a dedicated bioreactor has been developed in order to prescribe tension-torsion cycles within a controlled environment.

The use of local information issued from the biomechanical simulations open large perspectives as far as the optimization of culture conditions and the understanding of mechanisms that govern the formation of a ligamentous tissue are concerned. As a conclusion, the present study is likely to enable a new solution for ACL tissue engineering to emerge in the next years.

Keywords : computer-aided tissue engineering, biomechanics, anterior cruciate ligament, tissue-engineered construct, scaffold, bioreactor, finite element simulations, mechanobiology.

Remerciements

Citer l'ensemble des personnes qui ont été impliquées de près ou de loin dans l'accomplissement de ce travail de thèse paraît impensable, tant elles sont nombreuses.

Je me limiterai donc à celles dont le nom apparaîtrait en tête de liste, à commencer par mes deux directeurs de thèse Jean-François Ganghoffer et Rachid Rahouadj, pour m'avoir accordé leur confiance en m'accueillant au sein de leur équipe. Ils ont tous deux fait preuve d'un soutien à toute épreuve tout au long de ce travail de thèse, et ils m'ont laissé une grande liberté dans les directions que j'ai décidé d'adopter au sein de la problématique qui m'était confiée. Leurs expériences vastes et complémentaires m'ont été très profitables et ont permis, outre de mener à bien le travail qui m'était donné, de me conforter dans mon choix de mener une carrière académique. Je voudrais également remercier Fabrice Lemoine, directeur du LEMTA, d'avoir bien voulu m'accueillir au sein de son laboratoire et de m'avoir soutenu durant les trois années que j'y ai passé.

Mes remerciements vont également à Dominique Pioletti et David Mitton, qui m'ont fait le grand honneur d'accepter d'être les rapporteurs du présent travail. Merci également à Didier Mainard et Cécile Legallais d'avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je voudrais également exprimer toute ma gratitude à Damien Durville, avec qui une collaboration efficace et naturelle s'est instaurée, pour m'avoir fait profiter de ses compétences et de ses travaux en mécanique numérique. Merci également à Xiong Wang, qui a largement contribué à faire naître une problématique d'ingénierie tissulaire au sein du LEMTA, et qui a porté le développement du bioréacteur. Ma reconnaissance va également à Cédryck Vaquette, qui m'a précédé dans la mise en place de cette problématique, et avec qui j'ai pu établir une collaboration agréable et efficace.

Je tiens également à citer l'ensemble des stagiaires que j'ai eu le grand plaisir d'encadrer et de côtoyer durant cette thèse, et qui ont participé à son aboutissement : que Yang Liu, Adriana Sanz Mirabal, Thimothée Baudequin et Charlotte Piard soient vivement remerciés.

Je tiens tout particulièrement à remercier Natalia De Isla, pour son soutien sans faille et pour m'avoir fait profiter de son expérience et de sa pédagogie en ce qui concerne la biologie cellulaire.

Je souhaite également remercier Jean-Luc Six, Jérôme Babin et Cécile Nouvel du LCPM, pour la collaboration qui a été instaurée en ce qui concerne la synthèse des biopolymères.

Je tenais à remercier l'ensemble des personnels techniques qui ont rendu possibles les travaux de recherche qui vont être présentés ici. Alain Delconte et Michel Marchand, tout d'abord, que je remercie de m'avoir fait bénéficier de leur expertise en électronique et en instrumentation. Merci

aussi tout particulièrement à Monique Gentils et Ghislaine Cauchois, qui m'ont accueilli et épaulé avec une bonne humeur sans égale au sein du PPIA. Un grand merci également à Jean-Yves Morel, Franck Demeurie et Alain Gérard, pour avoir fabriqué rapidement les différents composants qui constituent les dispositifs mis en place dans ce travail de thèse. Merci à Laurent Schoumacker pour son expertise en porosimétrie. Je remercie également Annie Marc et Isabelle Chevalot du LRGP pour leur expertise concernant les bioréacteurs et la culture cellulaire. Je souhaite aussi remercier Sébastien Hupont et Dominique Dumas pour leur savoir-faire en imagerie et leur maîtrise de la plateforme PTIBC-IBISA.

Enfin, ma reconnaissance va à l'ensemble de mes proches qui ont participé avant et pendant ce travail de thèse à m'offrir le cadre permettant de la mener à bien : qu'ils soient tous chaleureusement remerciés.

Liste des abréviations

Acronymes

| | |
|--------|---|
| 2D | Bidimensionnel |
| 3D | Tridimensionnel |
| ADN | Acide désoxyribonucléique |
| ANOVA | Test statistique d'analyse de la variance (<i>ANalysis Of VAriance</i>) |
| ARN | Acide ribonucléique |
| AM | Antéromédial |
| bFGF | <i>Basic fibroblast growth factor</i> |
| CAO | Conception assistée par ordinateur |
| CFD | Mécanique des fluides numériques |
| CSM | Cellule souche mésenchymateuse |
| DAPI | 4',6'-diamidino-2-phénylindole |
| DIDT | Droit interne et demi-tendineux |
| EF | Éléments finis |
| EthD-1 | Ethidium homodimer-1 |
| FDA | <i>Food and drug administration</i> |
| GAGs | Glycoaminoglycanes |
| HBSS | <i>Hank's buffered salt solution</i> |
| HEPES | Acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique |
| IRM | Imagerie par résonance magnétique |
| ITAO | Ingénierie tissulaire assistée par ordinateur |
| LCA | Ligament croisé antérieur |
| LCP | Ligament croisé postérieur |
| μCT | Micro-tomographie |
| MEB | Microscop(i)e électronique à balayage |
| PCL | Poly-ε-caprolactone |
| PGA | Acide polyglycolique |
| PDGF | <i>Platelet-derived growth factor</i> |
| PDLA | Acide poly(D-lactique) |
| PID | Proportionnel intégral dérivé |

Avant-propos

| | |
|--------------|--|
| PL | Postérolatéral |
| PLCL | Co(poly-lactide- ϵ -caprolactone) |
| PLLA | Acide poly(L-lactique) |
| PLGA | Acide poly(lactique-co-glycolique) |
| RGD | Acide arginine-glycine-aspartique |
| SEC | Chromatographie d'exclusion stérique |
| TGF- β | <i>Transforming growth factor β</i> |
| THF | Tétrahydrofurane |
| TRITC | Tetra méthyle rhodamine iso thio cyanate, dérivé de la rhodamine |
| UV | Ultraviolet |
| VER | Volume élémentaire représentatif |

Notations

| | |
|-----------|--|
| X | Scalaire |
| X | Tenseur |
| X_i | $i^{\text{ème}}$ composante de la grandeur X |
| (,) | Produit scalaire |
| . | Produit simplement contracté |
| : | Produit doublement contracté |
| \otimes | Produit tensoriel |

Variables

| | |
|-------------------------------------|---|
| A_0 | Section initiale des fibres |
| a, b, c | Paramètres de la fonction d'érouissage du matériau |
| C | Tenseur de rigidité |
| C_k | Élément de contact situé sur la géométrie intermédiaire au point d'abscisse ζ_k |
| d₁, d₂ | Vecteurs directeurs des sections des poutres dans la configuration de référence |
| D₁, D₂ | Vecteurs directeurs des sections des poutres dans la configuration de référence |
| D_i | Diamètre nominal de la couche i |
| d_{fibre} | Diamètre des fibres |
| ϵ | Déformation conventionnelle |
| ϵ_0 | Seuil de déformation élastique |
| ϵ_{octa} | Déformation octaédrique |

Avant-propos

| | |
|--|---|
| $\varepsilon_I, \varepsilon_{II}, \varepsilon_{III}$ | Déformations principales selon les directions principales I, II et III |
| E | Module d'élasticité |
| \mathbf{E} | Tenseur de déformation de Green-Lagrange |
| \mathbf{F} | Gradient de la transformation |
| F_0 | Prétension imposée |
| $\mathbf{h}_1, \mathbf{h}_2$ | Variations des vecteurs directeurs des sections dans la configuration actuelle |
| h | Hauteur séparant les deux plateaux du dispositif de tressage |
| \mathbf{I} | Tenseur identité |
| k_c | Coefficient de pénalité au niveau de l'élément de contact C |
| θ | Rotation de chaque fibre durant la cinématique de tressage selon l'axe de la tresse |
| \varnothing_c et \varnothing_f | Diamètres intérieurs de la chambre et de la filière de l'extrudeuse |
| λ | Allongement |
| L | Longueur actuelle de l'échantillon |
| L_0 | Longueur initiale de l'échantillon |
| l | Direction longitudinale |
| μ | Coefficient de frottement |
| N_i | Nœud i |
| \mathbf{N}_c | Direction normale à l'élément de contact C |
| ξ | Point matériel |
| p | Seuil de pénétration pour la définition des interactions de contact |
| \mathbf{P} | Premier tenseur de Piola-Kirchhoff |
| P_i | Pas de tressage de la couche i |
| R | Rayon du cylindre enrouleur de l'extrudeuse |
| \mathbf{R} | Vecteur rotation |
| \mathbf{R}_N | Composante normale de l'interaction de contact-frottement |
| \mathbf{R}_T | Composante tangentielle de l'interaction de contact-frottement |
| s | Abscisse curviligne |
| \mathbf{S} | Second tenseur de Piola-Kirchhoff |
| t_1, t_2 | Directions transverses |
| T | Effort mesuré lors d'un essai de traction |
| \mathbf{u} | Déplacement dans la configuration actuelle |
| \mathbf{U} | Déplacement dans la configuration de référence |
| \mathbf{u}_{ad} | Ensemble des champs de déplacement cinématiquement admissibles |

Avant-propos

| | |
|--------------|--|
| u_{\max} | Seuil de déplacement tangentiel pour l'interaction de contact-frottement |
| V_p | Vitesse du piston de l'extrudeuse |
| \mathbf{v} | Déplacement virtuel |
| Ω | Vitesse de rotation du cylindre enrouleur de l'extrudeuse |
| \mathbf{w} | Fonction de base de l'interpolation par éléments finis |
| w_{cf} | Travail virtuel de l'interaction de contact-frottement d'un élément de contact |
| W_{cf} | Travail virtuel total des interactions de contact-frottement |
| W_{int} | Travail virtuel des efforts internes |
| \mathbf{x} | Position dans la configuration actuelle |
| \mathbf{X} | Position dans la configuration de référence |
| Y | Fonction d'écroutissage du matériau |
| ζ_k | Abscisse du point k sur la géométrie intermédiaire |

Abbreviations administratives

| | |
|-------------|---|
| 3SR LAB | Laboratoire Sols-Solides-Structures-Risques, Grenoble |
| ENSEM | École Nationale Supérieure d'Électronique et de Mécanique, Nancy |
| LAEGO | Laboratoire Environnement, Géomécanique et Ouvrages, Nancy |
| LCPM | Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, Nancy |
| LEMTA | Laboratoire d'Énergétique et de Mécanique Théorique et Appliquée, Nancy |
| LPMT | Laboratoire de Physique et Mécanique Textiles, Mulhouse |
| LRGP | Laboratoire Réactions et Génie des Procédés, Nancy |
| PPIA | Physiopathologie et Pharmacologie et Ingénierie Articulaires, Nancy |
| PTIBC-IBISA | Plateforme d'Imagerie et de Biophysique Cellulaire du biopôle de Nancy. |

Avant-propos et organisation du mémoire

La réparation du ligament croisé antérieur (LCA) par les moyens actuels entraîne souvent des complications à long terme qui soulèvent le besoin de substituts de LCA plus performants. Le défi qui consiste à améliorer ces moyens de réparations repose donc sur une problématique clinique importante et, compte tenu des coûts des potentielles complications liées à la réparation du LCA, s'intègre également dans une problématique socio-économique. La méthode de l'ingénierie tissulaire, qui consiste à remplacer le tissu lésé par un biosubstitut constitué de cellules réparatrices ensemencées dans une matrice de support biodégradable, possède un potentiel très prometteur dans la constitution de nouvelles sources de substituts de LCA. L'ingénierie tissulaire en général, appliquée au LCA en particulier, a suscité un intérêt croissant depuis les années 1990 comme nous pouvons le constater ci-dessous (Illustration 0-a). Ce domaine de recherche est hautement pluridisciplinaire par nature, et fait appel à des compétences issues de la biomécanique, des biomatériaux, de la biochimie, de la biologie cellulaire, du génie des procédés et du domaine clinique. En particulier, le cahier des charges associé à la conception et à la réalisation d'une matrice de support adaptée à la réparation du LCA est très exigeant : contraintes biologiques, biochimiques, morphologiques et biomécaniques. Ces exigences s'appliquent à la fois à l'échelle macroscopique

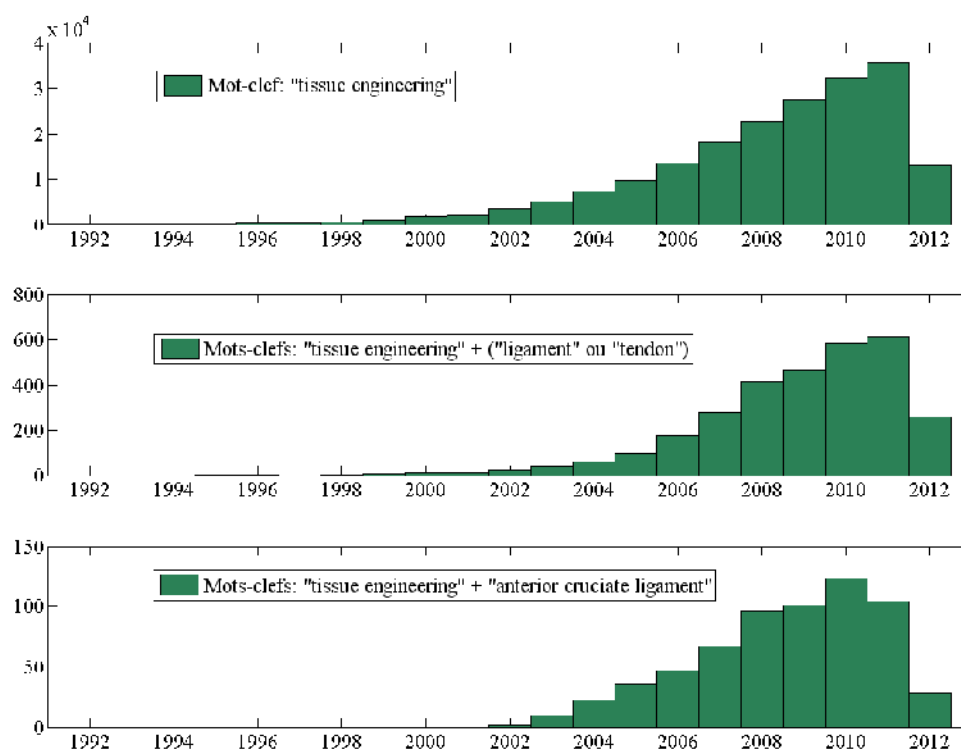


Illustration 0-a: Nombre de citations contenant les mots-clefs "tissue engineering" (ingénierie tissulaire), "tissue engineering" | (ligament ou tendon), et "tissue engineering" | "anterior cruciate ligament" (LCA) entre 1992 et aujourd'hui d'après la base de données Web of Science.

de l'articulation, où la fonction physiologique du LCA doit être assurée durant la période de réhabilitation, et à l'échelle microscopique des cellules, où des stimuli mécaniques doivent être fournis de manière à provoquer la réponse biologique attendue. Dans le présent travail, nous proposons de concevoir, fabriquer, caractériser et modéliser une nouvelle matrice de support susceptible de constituer un biosubstitut pour la réparation du LCA lésé. En particulier, une approche d'ingénierie tissulaire assistée par ordinateur sera présentée pour la première fois pour ce type de tissu. Nous nous intéresserons également à présenter des protocoles de culture ainsi qu'un nouveau bioréacteur, qui auront pour but de se diriger vers la proposition d'un biosubstitut cliniquement pertinent. La démarche sera principalement tournée vers la biomécanique, mais présentera toutefois des connexions permanentes avec les différentes disciplines liées à l'ingénierie tissulaire.

Ce mémoire de thèse sera constitué de cinq chapitres.

Dans un premier chapitre, l'ensemble des éléments bibliographiques nécessaires à comprendre la fonction et les propriétés natives du LCA, les moyens de reconstruction actuellement utilisés et les limites qui y sont associées, ainsi que le cahier des charges que doit satisfaire cette matrice de support vont être énoncés. Face à ce cahier des charges, un état de l'art de l'ingénierie tissulaire du ligament (et tendon) sera dressé et critiqué.

Dans une seconde partie de ce mémoire, nous nous intéresserons à proposer une matrice de support potentiellement capable de satisfaire ce cahier des charges. Les outils nécessaires à la fabrication de cette nouvelle matrice de support à l'échelle du laboratoire seront développés et évalués. Nous verrons que l'une des particularités premières de cette matrice résidera dans sa capacité à présenter différentes propriétés en fonction d'une série de paramètres du procédé de fabrication.

Dans un troisième chapitre, des outils numériques spécifiques permettant de modéliser la géométrie et le comportement mécanique de la matrice de support à l'échelle des fibres qui la constituent seront présentés et évalués. Ces outils seront en particulier utilisés afin de déterminer une configuration de matrice permettant de satisfaire le cahier des charges énoncé en première partie de ce mémoire.

Dans un quatrième chapitre, des essais préliminaires concernant la caractérisation biologique de la matrice seront rapportés. Nous nous assurerons tout d'abord de la biocompatibilité de la matrice proposée, puis nous présenterons un protocole permettant d'ensemencer des cellules souches à l'intérieur de cette matrice ainsi que des résultats de cultures statiques qui ont été effectuées à partir de cette matrice. Nous verrons que la démarche d'ingénierie tissulaire du ligament implique une culture dynamique au sein d'un bioréacteur ; par conséquent, un bioréacteur

dédié à une application au cas du LCA sera présenté à l'issue de ce quatrième chapitre, et quelques résultats préliminaires concernant son utilisation seront également rapportés.

Enfin, nous tenterons dans le cinquième et dernier chapitre de dresser un bilan critique concernant la pertinence clinique de la matrice de support proposée. Nous nous intéresserons tout particulièrement à lister les points forts et les limitations de cette matrice, et à proposer de futures directions qui pourraient permettre à terme de s'orienter vers une application clinique. Dans un second temps, nous dresserons un bilan des outils numériques développés dans le cadre du présent travail, et nous envisagerons quelques-unes des nombreuses possibilités que ces outils offrent. En particulier, nous verront qu'ils permettront d'obtenir des informations locales concernant l'environnement cellulaire durant les cultures dynamiques qui seront prochainement effectuées par le biais du bioréacteur présenté dans ce mémoire. De plus, nous aborderons une autre perspective intéressante qu'offre ce travail de thèse en ce qui concerne la modélisation des transports de masse à l'intérieur de la matrice de support proposée. Enfin, nous tenterons de dresser une conclusion générale sur l'approche qui a été adoptée dans ce travail de thèse, et en particulier en ce qui concerne son adéquation avec les différentes directions que va probablement emprunter la recherche en ingénierie tissulaire cette prochaine décennie.

Afin d'illustrer l'organisation de ce mémoire et de faciliter sa lecture, un schéma synoptique est donné ci-dessous (Illustration 0-b).

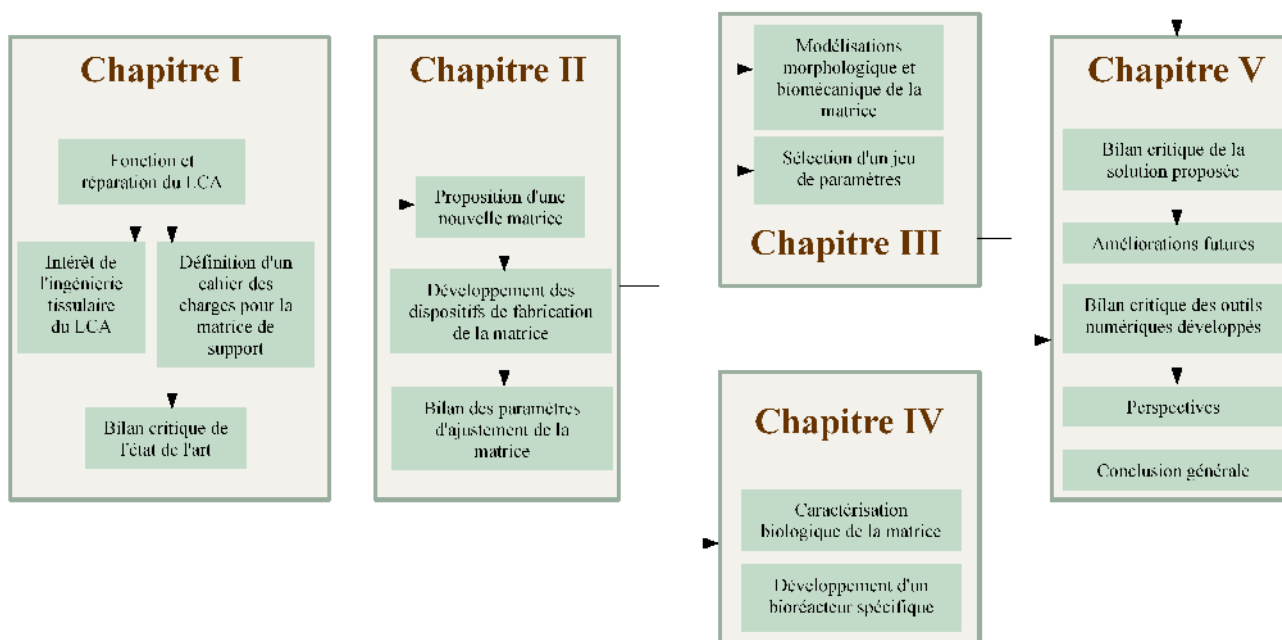


Illustration 0-b: Schéma synoptique de l'organisation du mémoire.

Sommaire

| | |
|--|-----|
| I.État de l'art : ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur (LCA)..... | 27 |
| 1.Introduction..... | 28 |
| 2.Anatomie et composition..... | 29 |
| 3.Fonction et sollicitations physiologiques..... | 33 |
| 4.Propriétés mécaniques..... | 38 |
| 5.Lésions et réparation..... | 43 |
| 6.Ingénierie tissulaire du LCA..... | 52 |
| 7.Cahier des charges pour la conception d'une matrice de support..... | 57 |
| 8.État de l'art :matériaux et architectures..... | 65 |
| 9.Conclusion..... | 74 |
| II.Proposition et fabrication d'une matrice de support..... | 77 |
| 1.Introduction..... | 78 |
| 2.Proposition d'une matrice de support..... | 79 |
| 3.Fabrication de la matrice proposée..... | 80 |
| 4.Résultats et conclusion..... | 90 |
| III.Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support..... | 93 |
| 1.Introduction : ingénierie tissulaire assistée par ordinateur (ITAO)..... | 94 |
| 2.Morphologie de la matrice de support..... | 95 |
| 3.Comportement mécanique de la matrice de support..... | 107 |
| 4.Sélection d'un jeu de paramètres pour la matrice de support..... | 135 |
| 5.Discussion et conclusion..... | 142 |
| IV.Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur..... | 145 |
| 1.Introduction..... | 146 |
| 2.Protocoles expérimentaux..... | 146 |
| 3.Essais biologiques préliminaires..... | 152 |
| 4.Culture dynamique et bioréacteur..... | 160 |
| 5.Discussion et conclusion..... | 169 |
| V.Bilan et perspectives..... | 173 |
| 1.Introduction..... | 174 |
| 2.Bilan concernant la solution proposée..... | 175 |
| 3.Outils numériques : bilan et applications..... | 182 |
| 4.Conclusion générale..... | 197 |
| Bibliographie..... | 201 |
| Annexes..... | 219 |

Index des illustrations

| | |
|---|----|
| Illustration 0-a: Nombre de citations contenant les mots-clefs "tissue engineering" (ingénierie tissulaire), "tissue engineering +(ligament ou tendon)", et "tissue engineering" + "anterior cruciate ligament" (LCA) entre 1992 et aujourd'hui d'après la base de données Web of Science. | 13 |
| Illustration 0-b: Schéma synoptique de l'organisation du mémoire..... | 15 |
| Illustration I 1: Mouvements anatomiques liés à l'articulation du genou gauche. Adapté de [Woo1999]. | 28 |
| Illustration I 2: Représentation schématique du LCA du genou droit composé des faisceaux antéromédial (orange) et postérolatéral (bleu) (a) en extension et (b) en flexion à 90° [Bicer2010]..... | 29 |
| Illustration I 3: (a) Insertions des faisceaux AM et PL, des ménisques médial (MM) et latéral (ML) et du LCP sur le tibia. Adapté de [Kato2010]. (b) faisceaux PL et AM isolés [Zantop2006], et dans l'articulation en extension (c) et à 110° de flexion (d) [Duthon2006]..... | 30 |
| Illustration I 4: Architecture multi-échelles du ligament, allant de la molécule de collagène (nanomètre) à gauche jusqu'au ligament (millimètre) à droite. Adapté de [Cowin2000]..... | 32 |
| Illustration I 5: Différents protocoles visant à quantifier la fonction et les sollicitations physiologiques du LCA (a) Analyse de la cinématique du genou par imagerie [Li2005] (b) Mesure directe par insertion de jauges au niveau du LCA [Beynon1998a] (c) Reproduction de la cinématique physiologique sur un genou cadavérique [Woo1999]..... | 34 |
| Illustration I 6: Différents protocoles visant à évaluer les propriétés mécaniques en traction du LCA natif. (a) Essai de traction sur un complexe tibia-LCA-fémur, les extrémités osseuses étant fixées dans des cylindres métalliques [Jones1995] (b) Essai de traction sur un complexe tibia-LCA-fémur, avec serrage directe des deux os sur les mors de la machine de traction [Noyes1974] (c) Essai de traction sur le LCA seul maintenu directement entre les mors de la machine de traction [Kennedy1976]..... | 39 |
| Illustration I 7: Courbe de réponse typique du LCA en traction uniaxiale [Karmani2003]..... | 40 |
| Illustration I 8: Différents moyens de fixation utilisés pour l'ancrage du substitut de LCA dans les tunnels osseux selon les protocoles classiques. (a) Fixation par l'insertion de vis d'interférence entre la greffe et le tunnel osseux (b) Agrafe fixant la greffe sur la paroi osseuse (c) Système transfixant venant s'insérer dans la boucle formée par la greffe (d) Système endobouton, venant également maintenir la boucle formée par la greffe..... | 45 |
| Illustration I 9: Représentation simplifiée des sources d'autogreffes les plus communément utilisées: Fascia lata, droit interne et demi-tendineux (DIDT) et tendon rotulien (intervention de Keneth-Jones)..... | 48 |
| Illustration I 10: (a) Exemple de reconstruction classique mono-faisceau. (b) Exemple de reconstruction anatomique à double faisceau. Le second protocole semble permettre de mieux recouvrir la cinématique normale du genou [Smith2009][Yasuda2010][Plaweski2011]..... | 50 |

Index des illustrations

| | |
|--|----|
| Illustration I 11: Intervention utilisant le DIDT dans le cas d'une reconstruction à double faisceau. (a) Faisceaux AM et PL utilisés: ici, une fixation unique est utilisée pour l'insertion fémorale. (b) Dispositif chirurgical lors de l'intervention (c) Vue arthroscopique durant l'intervention. Adapté de [Kato2010]..... | 51 |
| Illustration I 12: Visualisation des tunnels et des fixations d'une reconstruction à double faisceau obtenues à partir de résultats de tomographie 3D. (a) vue postérieure (b) vue sagittale (c) vue dans le plan transversal. Adapté de [Yasuda2010]..... | 52 |
| Illustration I 13: Représentation schématique des différentes étapes (au niveau du patient et à l'échelle de la clinique) et des différentes échelles de temps associées à la réparation du LCA par ingénierie tissulaire..... | 56 |
| Illustration I 14: Implantation d'un biosubstitut dans un genou porcine [Fan2008]..... | 57 |
| Illustration I 15: Modèle de mécanorégulation adapté de [Prendergast1997]. L'environnement local représenté par une combinaison de la déformation octaédrique et de l'écoulement permet de prédire vers quel phénotype cellulaire les cellules vont s'orienter..... | 60 |
| Illustration I 16: Exemples de matrices possédant (a) une taille de pores homogène et (b) un gradient de taille de pores du centre à la périphérie de la matrice. Il a été montré que la viabilité et la prolifération étaient supérieures dans le second cas [Ahn2010]. Adapté de [Ahn2010]..... | 64 |
| Illustration I 17: Structures de quelques polymères synthétiques couramment utilisés en ingénierie tissulaire du ligament..... | 69 |
| Illustration I 18: Exemples d'architectures obtenues par (a) élimination d'un agent porogène (b) prototypage rapide (c) électrospinning. Adapté de [Ma2004]..... | 70 |
| Illustration I 19: Différentes matrices proposées pour l'ingénierie tissulaire du LCA. (a) Matrice torsadée composée d'un total de 540 fibres de soies [Altman2002] (b) Matrice tressée rectangulaire avec des morphologies différentes dans les parties intra-articulaire et intra-osseuses [Cooper2005] (c) Matrice tressée-torsadée avec deux différents assemblages (en haut: torsadage puis tressage, en bas: tressage puis torsadage) [Freeman2007] (d) Matrice hybride composée d'un tricot de soie bidimensionnel enroulé sur lui-même [Fan2008] (e) Même tricot que le précédent enroulé autour d'une tresse de soie [Fan2009]..... | 72 |
| Illustration II 1: Schéma illustratif d'une structure tressée circulaire multicouche, adaptée d'un brevet de 1975 [Richardson1975]. Ici, cette structure est utilisée pour augmenter les pressions admissibles par des tubes perméables utilisés pour la filtration des fluides..... | 79 |
| Illustration II 2: Schéma de fonctionnement d'une extrudeuse classique..... | 81 |
| Illustration II 3: Extrudeuse développée au laboratoire. (a) Vue d'ensemble sur la chambre et les dispositifs de refroidissement et d'enroulement. (b) Vue en coupe de la chambre thermostatée (c) Vue d'ensemble de l'extrudeuse montée sur la machine de traction..... | 82 |

Index des illustrations

| | |
|--|-----|
| Illustration II 4: (a) Vue d'ensemble de l'extrudeuse et de la partie commande montées sur la machine de traction (b) Extrusion d'une fibre de polymère..... | 83 |
| Illustration II 5: Comparaison entre les diamètres mesuré et théorique, ce dernier étant issu de l'hypothèse de conservation du volume pendant la mise en forme..... | 84 |
| Illustration II 6: Réponses typiques en traction des fibres de P(LL97/CL3), P(LL85/CL15) et P(LL70/CL30) (échelle semi-logarithmiques) | 86 |
| Illustration II 7: Schéma de principe du tressage circulaire, ici pour deux groupes de quatre fibres. Adapté de [Rapaport2006]..... | 88 |
| Illustration II 8: (a) Exemple de matrice de support tressée multicouche en PLCL. L'une des fibres de la couche extérieure de la matrice a été colorée en noir, de manière à visualiser sa trajectoire au sein de la structure (b) Matrice en cours de tressage..... | 89 |
| Illustration III 1: Détermination de la géométrie de tresses carrées à partir de l'analyse du procédé de tressage. Adapté de [Sun2004]..... | 96 |
| Illustration III 2: Cinématique du procédé de tressage. Entre chaque étape successive, chaque groupe de fibres (dont certaines ici sont numérotées) alterne entre les diamètres D_{int} , D et D_{ext} , et tourne d'un angle $\pm\theta$ | 96 |
| Illustration III 3: (a) Détermination des trajectoires à partir de la cinématique des fibres durant le tressage. (b) Création de tubes sous l'hypothèse de rayon constant. (c) Géométrie finale..... | 97 |
| Illustration III 4: Algorithme de construction de la géométrie tressée multicouche..... | 98 |
| Illustration III 5: Exemple d'architecture tressée multicouche obtenue à l'issue de l'algorithme de modélisation géométrique..... | 99 |
| Illustration III 6: Comparaison des diamètres extérieurs des matrices réelles et virtuelles. Matrice de 9 couches, $d_{fibre}=200\ \mu m$, $h=100\ mm$ | 100 |
| Illustration III 7: (a) Imprégnation des matrices dans une résine d'Araldite® suivies de coupes au microtome permettant d'obtenir des sections de la matrice réelle (b) Détection des fibres dans les sections obtenues..... | 101 |
| Illustration III 8: (a) Superposition de deux coupes réelles et virtuelles (b et c) Répartition moyenne de l'intensité des niveaux de gris de l'image en fonction du rayon (b) et de l'angle (c) pour l'ensemble des matrices virtuelle. Représentation tridimensionnelle à gauche et bidimensionnelle à droite..... | 102 |
| Illustration III 9: Intensité des niveaux de gris moyenne en fonction du rayon (à gauche) et en fonction du rayon sous forme d'un diagramme de Fourier (à droite) pour les sections des matrices réelles et virtuelles..... | 102 |

Index des illustrations

| | |
|--|-----|
| Illustration III 10: Réseau de pores obtenu par le calcul avec dans une matrice de 8 couches. La couleur de chaque pore est associée à son diamètre..... | 104 |
| Illustration III 11: Comparaison entre la distribution de tailles de pores obtenues par calcul dans la matrice virtuelle, par calcul dans les sections de la matrice réelle, et par porosimétrie mercure..... | 106 |
| Illustration III 12: Réponse typique en traction d'une fibre de P(LL85/CL15) et modèle élastoplastique correspondant.L'axe des abscisses représente la déformation totale de la fibre..... | 110 |
| Illustration III 13: Vecteurs directeurs D1 et D2 dans une section quelconque d'abscisse curviligne s pour les configurations de référence et actuelle..... | 112 |
| Illustration III 14 : Algorithme de recherche de contact entre deux fibres. Une géométrie intermédiaire est construite dans une zone de proximité, puis utilisée pour générer des éléments de contact constitués de paires de points matériels susceptibles d'entrer en contact..... | 114 |
| Illustration III 15 : Géométrie hélicoïdale utilisée pour modéliser chaque fibre dans la configuration de référence..... | 116 |
| Illustration III 16: Définition des niveaux, des corps rigides et des repères utilisés pour le pilotage des conditions aux limites. Chaque niveau possède deux extrémités gauche (g) et droite (d), auxquelles sont associés des corps rigides Ci et des repères locaux {L,T1,T2} et {l,t1,t2}..... | 117 |
| Illustration III 17: Types de conditions aux limites imposées afin de simuler un essai de traction (ici $E_{zz} = 0,09$) à partir d'une configuration de référence (matrice de 5 couches, $h=100$ mm, $d_{\text{fibre}}=165$ μm).La configuration initiale est calculée en imposant un pré-tension de 0,5 N séparément sur chaque couche..... | 120 |
| Illustration III 18: (a) Efforts et (b) moments dans chaque couche en fonction de la déformation de Green-Lagrange E_{zz} pour la simulation d'un essai de traction ($E_{zz}=0.01$) sur une matrice de cinq couches. Les couches sont numérotées du centre à la périphérie de la matrice..... | 121 |
| Illustration III 19: Effet du coefficient de frottement sur la réponse en traction d'une matrice de cinq couches..... | 123 |
| Illustration III 20: Estimation d'un effet Poisson apparent réalisée en considérant les variations relatives du diamètre externe de la matrice en fonction de la déformation E_{zz} lors d'un essai de traction uniaxiale (5 couches, $h=100$ mm, $d_{\text{fibre}}=165\mu\text{m}$). | 124 |
| Illustration III 21: (a) Géométrie issue de l'analyse de la cinématique de tressage (b) Configuration initiale issue de l'équilibre mécanique (c) Superposition des deux géométries. (d) et (e): partie centrale de la matrice avec et sans représentation du maillage. (matrice de 5 couches, $h=100$ mm, $d_{\text{fibre}}=165$ μm)..... | 126 |
| Illustration III 22: Comparaison entre les géométries d'une matrice réelle (8 couches, $d_{\text{fibre}}=200$ μm , $h=100$ mm) et de la configuration initiale correspondante. (a) Comparaison entre les diamètres extérieurs moyens (b) Distribution des fibres dans les sections des matrices..... | 127 |

Index des illustrations

| | |
|--|-----|
| Illustration III 23: (a) Vue en coupe du montage de traction. Le déplacement est imposé par contact avec des cylindres de résine contenant les extrémités de la matrice (b)..... | 128 |
| Illustration III 24: Paramètres retenus décrivant la réponse en traction d'une matrice : rigidité, toe region et limite d'élasticité..... | 128 |
| Illustration III 25: Comparaisons entre les données expérimentales (exp.) et la moyenne des résultats des simulations (sim.) pour des tests en traction uniaxiale sur des matrices de 1, 3 et 5 couches (dfibre=165 µm, h=100 mm)..... | 130 |
| Illustration III 26: Définition des niveaux, des corps rigides et des repères utilisés pour le pilotage des conditions aux limites dans le cas de deux faisceaux A et B. Chaque niveau possède deux extrémités gauche (g) et droite (d), auxquelles sont associés des corps rigides C et des repères locaux..... | 131 |
| Illustration III 27: Simulation d'un essai de traction sur deux faisceaux torsadés. A partir de la configuration de référence (a), les différentes étapes sont : (b) le calcul de la configuration initiale pour les deux faisceaux séparés, (c) le rapprochement des deux faisceaux, (d) le torsadage des deux faisceaux, et (e) l'essai de traction..... | 133 |
| Illustration III 28: Comparaison des réponses de deux structures simple et double faisceaux, pour un même nombre de fibres..... | 134 |
| Illustration III 29: Influence du diamètre des fibres (bleu, à gauche), du paramètre h (rouge, au milieu) et du nombre de couches (vert, à droite) sur la distribution de taille de pores (en µm)..... | 136 |
| Illustration III 30: Histogramme des tailles de pores au sein de la matrice sélectionnée..... | 140 |
| Illustration III 31: (a) Distribution spatiale et taille des pores à l'intérieur de la matrice choisie (b) taille des pores en fonction de leur distance à l'axe de la matrice..... | 140 |
| Illustration III 32: Résultats de la simulation d'une traction uniaxiale de la matrice sélectionnée..... | 141 |
| Illustration III 33: Efforts et moments dans la matrice sélectionnée causés par un contraction isométrique des quadriceps à 15° de flexion (Exercice 1) ainsi que par des squats avec cordes élastiques (Exercice 2)..... | 142 |
| Illustration IV 1: Évolution d'une cellule souche mésenchymateuse. Adapté de [Fisher2007]..... | 148 |
| Illustration IV 2: Résultat de l'étude de biocompatibilité réalisé pour deux polymères (P(LL85/CL15) et P(LL97/3)) et deux concentrations (2000 et 5000 cellules/puit) différents. Résultats issues d'un test AlmarBlue® (section IV. 2.3.2). | 154 |
| Illustration IV 3: Évolution de l'ADN sur des échantillons (N=5) de matrices. Résultats issus d'un test Picogreen® (section IV. 2.3.2)..... | 156 |
| Illustration IV 4: Prolifération de CSM ovines dans la matrice. Images issues de microscopie à balayage électronique à | |

Index des illustrations

| | |
|--|-----|
| (a) J3 (b) J7 (c) J14 (d) J21 (e) J28. La barre d'échelle correspond à 2mm..... | 157 |
| Illustration IV 5: Prolifération de CSM ovines dans la matrice. Images issues de microscopie confocale à (a) J3 (b) J7 (c) J14 (d) J21 (e) J28. Le cytosquelette d'actine est marqué en rouge, tandis que le noyau des cellules est visible en bleu. L'échelle sur chaque image correspond à 250 μm | 157 |
| Illustration IV 6: Exemple de matrice utilisée pour la culture statique. Image obtenue grâce à l'autofluorescence des matrices dans le vert (excitation à 488 nm).Image obtenue à l'aide d'un microscope à fluorescence..... | 159 |
| Illustration IV 7: Cellulesensemencées sur la matrice de support à (a) J1 et (b) J7. Images issues de la superposition de plusieurs acquisitions réalisées pour des plans focaux séparés de 10 μm , et avec une excitation à 514 nm, permettant de visualiser l'autofluorescence des fibres ainsi que les noyaux cellulaires marqués à l'EthD-1..... | 159 |
| Illustration IV 8: (a) Fonctionnement général du bioréacteur (b) Zoom sur l'une des six chambres..... | 162 |
| Illustration IV 9: Vue générale du bioréacteur en fonctionnement..... | 163 |
| Illustration IV 10: Schéma de la circulation du milieu de culture dans l'enceinte du bioréacteur. | 164 |
| Illustration IV 11: (a) Interface logicielle utilisée pour le pilotage du bioréacteur. (b) Définition CAO du bioréacteur et du futur capteur de force qui viendra équiper l'une des six chambres (en rouge)..... | 165 |
| Illustration IV 12: Dispositifs de sécurité installés sur le bioréacteur..... | 166 |
| Illustration IV 13: (a) matrice en culture au sein d'une chambre du bioréacteur. (b) et (c) cellulesensemencées sur la matrice de support à (b) 200 000 cellules/matrice et (c) 600 000 cellules/matrice. Images issues de la superposition de plusieurs acquisitions réalisées pour des plans focaux séparés de 15 μm , et avec une excitation à 514 nm, permettant de visualiser l'autofluorescence des fibres ainsi que les noyaux cellulaires marqués à l'EthD-1..... | 168 |
| Illustration V 1: Exemples d'améliorations envisageables afin de renforcer le caractère ajustable de la matrice de support proposée..... | 177 |
| Illustration V 2: Géométries issues d'une acquisition en tomographie à rayons X. (a) Application de l'algorithme de reconstruction dédié aux matériaux fibreux à un échantillon de matrice. (b) Superposition de cinq acquisitions pour divers états de déformation en traction-compression (c) Application de l'algorithme de recherche des pores à une géométrie issue de la tomographie..... | 185 |
| Illustration V 3: Traitement des contacts entre fibres. Il est possible à partir des résultats des simulations de discriminer les polygones du maillage auxquels les extrémités des éléments de contact appartiennent, pour les contacts entre (a) les fibres de couches différentes ou (b) les fibres d'une même couche..... | 187 |
| Illustration V 4: Simulation de deux exercices de réhabilitation classiques impliquant des sollicitations importantes à l'échelle du LCA (section I.3.3.)..... | 189 |

Index des illustrations

| | |
|---|-----|
| Illustration V 5: Distribution des déformations octaédriques lors des exercices 1 (a) et 2 (b) dans chaque couche de la matrice. Les couches sont numérotées du centre à la périphérie de la matrice..... | 189 |
| Illustration V 6: Modélisation d'une circulation de milieu de culture dans une matrice de 6 couches (statique), pour une circulation initiale dans le plan transverse de la matrice. (a) Vitesse du fluide dans la matrice (normalisée) pour une vitesse d'entrée de 0,5 (b) Contraintes de cisaillement (normalisées) induites localement par la circulation du milieu fluide..... | 194 |
| Illustration V 7: Simulation de l'advection d'un traceur à travers une matrice de 6 couches..... | 194 |
| Illustration V 8: Base d'une modélisation de la circulation de milieu de culture à l'intérieur d'une chambre du bioréacteur conduisant à la détermination des conditions aux limites à appliquer au fluide au voisinage de la matrice de support.. | 195 |
| Illustration 1: Effet de la vitesse d'allongement sur la réponse en traction des fibres de (a) P(LL70/CL30) (b) P(LL85/CL15) (c) P(LL97/CL3)..... | 221 |
| Illustration 2: Effet du temps de vieillissement à température ambiante pour le P(LL70/CL30)..... | 222 |
| Illustration 3: Réponse typique des fibres de P(LL85/CL15) conservées à -18°C deux et cinq semaines..... | 223 |
| Illustration 4: Évolution au cours du temps de la contrainte dans des fibres de P(LL85/CL15) pour des déformations totales imposées de 1.6 et 2%..... | 224 |
| Illustration 5: Définition du pas de tressage P0 | 225 |
| Illustration 6: Définition de l'angle de tressage α (a) sur le dispositif de tressage et (b) sur la tresse en cours de fabrication..... | 225 |
| Illustration 7: Variation du pas P0 en fonction de la hauteur h séparant les deux plateaux du dispositif de tressage et pour différents diamètres de fibres..... | 226 |
| Illustration 8: Variation du pas $P_i - P_0$ en fonction du nombre de couches pour différents diamètres de fibres et pour h fixé..... | 227 |
| Illustration 9: Surfaces des moindres carrés utilisées pour modéliser (a) le pas de tressage initial P0 de la première couche (b) l'évolution du pas de tressage en fonction du nombre de couches..... | 228 |
| Illustration 10: Schéma des chambres du bioréacteur..... | 232 |
| Illustration 11: Schéma hydraulique de l'alimentation des chambres du bioréacteur..... | 233 |

Index des tables

| | |
|---|------------|
| Tableau I 1: Déformations dans le faisceau AM du LCA associées à différents types d'exercices de réhabilitation, mesurées directement par l'insertion d'une jauge de déformation. Adapté de [Beynnon1998a]..... | 37 |
| Tableau I 2: Revue partielle concernant les propriétés en traction uniaxiale du LCA natif humain..... | 41 |
| Tableau II 1: Synthèse des principaux critères retenus pour la proposition d'une matrice adaptée à l'ingénierie tissulaire du LCA..... | 78 |
| Tableau III 1: Comparaison entre les valeurs de la rigidité, de la toe region et de la limite d'élasticité issues des données expérimentales (N=2) et des simulations mécaniques (N=5), pour des matrices composées de 1,3 et 5 couches de fibres de 165 µm de diamètre..... | 130 |
| Tableau III 2: Influence du nombre de couches, du diamètre de fibre et du paramètre h sur la distribution de tailles de pores à l'intérieur de la matrice. Le signe (*) signifie que l'effet du paramètre étudié est significatif (ANOVA, p<0,05) sur la quantité considérée..... | 136 |
| Tableau III 3: Influence du nombre de couches, du diamètre de fibre et du paramètre h sur les caractéristiques de la réponse en traction de la matrice..... | 137 |
| Tableau III 4: Synthèse de l'effet des paramètres du procédé sur certaines propriétés effectives de la matrice de support. | 138 |
| Tableau V 1: Matrices proposées dans la littérature pour l'ingénierie tissulaire du LCA et limitations associées..... | 176 |
| Tableau 1: Effet de la vitesse d'allongement sur le module d'élasticité en MPa des fibres de P(LL70/CL30), de P(LL85/CL15 et de P(LL97/CL3)..... | 220 |
| Tableau 2: Effet du temps de vieillissement à température ambiante sur le module d'élasticité en MPa des fibres de PLCL..... | 222 |

I. État de l'art : ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur (LCA)

Chapitre I

| | |
|---|----|
| I.État de l'art : ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur (LCA)..... | 27 |
| 1.Introduction..... | 28 |
| 2.Anatomie et composition..... | 29 |
| 2.1.Anatomie et structure..... | 29 |
| 2.2.Composition..... | 31 |
| 3.Fonction et sollicitations physiologiques..... | 33 |
| 3.1.Protocoles expérimentaux..... | 33 |
| 3.2.Fonction physiologique..... | 34 |
| 3.3.Sollicitations physiologiques..... | 36 |
| 4.Propriétés mécaniques..... | 38 |
| 4.1.Protocoles expérimentaux..... | 38 |
| 4.2.Réponse typique en traction..... | 40 |
| 4.3.Facteurs influants..... | 42 |
| 5.Lésions et réparation..... | 43 |
| 5.1.Lésions..... | 43 |
| 5.2.Protocoles chirurgicaux..... | 45 |
| 5.2.1 Points importants de la ligamentoplastie..... | 45 |
| 5.2.2 Source des greffes utilisées..... | 47 |
| 5.3.Limites des pratiques actuelles et perspectives..... | 49 |
| 6.Ingénierie tissulaire du LCA..... | 52 |
| 6.1.Historique et applications de l'ingénierie tissulaire..... | 52 |
| 6.2.Terminologie..... | 54 |
| 6.3.Intérêt pour la reconstruction du LCA et hypothèses de travail..... | 55 |
| 7.Cahier des charges pour la conception d'une matrice de support..... | 57 |
| 7.1.Considérations biologiques et biochimiques..... | 58 |
| 7.2.Considérations biomécaniques à l'échelle cellulaire..... | 59 |
| 7.3.Considérations biomécaniques à l'échelle articulaire..... | 61 |
| 7.4.Considérations morphologiques..... | 63 |
| 7.5.Considérations cliniques..... | 64 |
| 8.État de l'art :matériaux et architectures..... | 65 |
| 8.1.Etat de l'art : matériaux utilisés..... | 65 |
| 8.1.1 Matériaux naturels..... | 65 |
| 8.1.2 Matériaux synthétiques..... | 66 |
| 8.2.Etat de l'art : architectures utilisées..... | 69 |
| 8.2.1 Structures non fibreuses..... | 69 |
| 8.2.2 Structures fibreuses..... | 71 |
| 9.Conclusion..... | 74 |

1. Introduction

Avant de s'intéresser à proposer une alternative aux moyens de réparation du Ligament Croisé Antérieur (LCA) utilisés actuellement en clinique, il est nécessaire de définir les propriétés et fonctions de ce tissu ainsi que les lésions qui y sont associées et les différentes méthodes qui ont été imaginées pour y remédier. Dans cette optique, et en nous appuyant sur la littérature abondante à ce sujet, nous allons dans ce chapitre présenter les différentes propriétés du LCA et de l'environnement dans lequel il s'intègre, ainsi que les interventions chirurgicales qui sont ou ont été les plus couramment utilisées dans le cas d'une rupture de ce dernier. Nous utiliserons dans toute cette partie le repère représenté ci-dessous (Illustration I 1) pour définir la nature des différents mouvements ou sollicitations qui sont associés à l'articulation du genou.

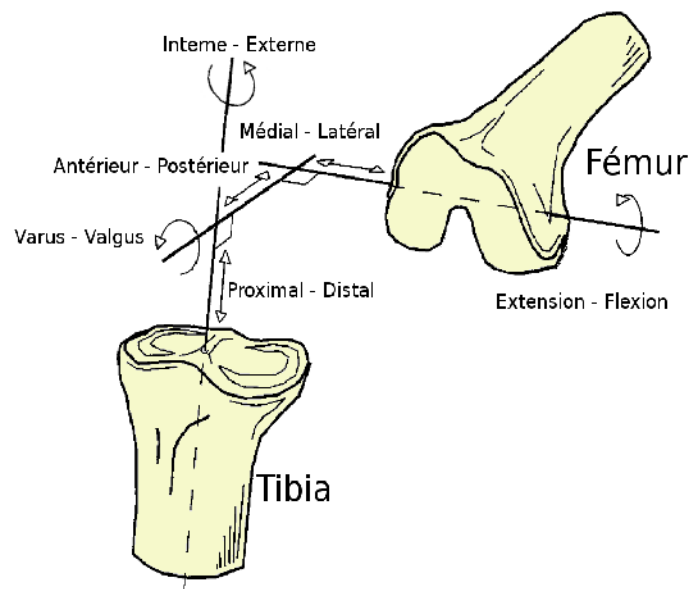


Illustration I 1: Mouvements anatomiques liés à l'articulation du genou gauche. Adapté de [Woo1999].

Dans un second temps, nous présenterons la méthode de l'ingénierie tissulaire, et nous verrons en quoi elle peut constituer une alternative intéressante aux méthodes actuelles de réparation du LCA. La démarche d'ingénierie tissulaire nécessite l'utilisation d'une matrice de support, et nous tenterons donc de déterminer une liste de critères qui doivent gouverner la conception d'une telle matrice dans le cas de la réparation du LCA. Enfin, nous présenterons les biomatériaux et les architectures qui ont été envisagées dans la littérature en ce qui concerne l'ingénierie tissulaire du ligament.

2. Anatomie et composition

2.1. Anatomie et structure

Le LCA constitue, avec le ligament croisé postérieur (LCP), le pivot central de l'articulation du genou. Si l'on s'en réfère à une définition d'ordre anatomique, le LCA « s'insère dans l'aire intercondyloire antérieure en arrière de la corne antérieure du ménisque médial, et monte vers l'arrière et le dehors pour se terminer sur la face axiale du condyle latéral du fémur, dans sa moitié postérieure, selon une ligne d'insertion verticale » [Chevallier1998][Woo2006]. Le ligament croisé postérieur est situé juste en arrière de lui. Ces deux ligaments sont "croisés" l'un par rapport à l'autre: lorsque le tibia effectue un mouvement de rotation en dedans, ils ont tendance à s'enrouler ensemble.

Les dimensions du LCA rapportées dans la littérature peuvent varier suivant les études et les protocoles de mesure utilisés, et varient également fortement d'un patient à l'autre. Elles sont comprises entre 7 et 12 mm pour la largeur et entre 22 et 41 mm pour la longueur avec une moyenne de 30mm [Li2005][Duthon2006][Zantop2006][Bicer2010]. Sa section est irrégulière, et elle occupe dans sa partie intermédiaire une aire de 40 à 54 mm² [Unwin2010].

La fixation du LCA sur le tibia et le fémur s'effectue progressivement *via* une zone de transition faite de fibrocartilage, qui devient de plus en plus minéralisée lorsque l'on se rapproche de

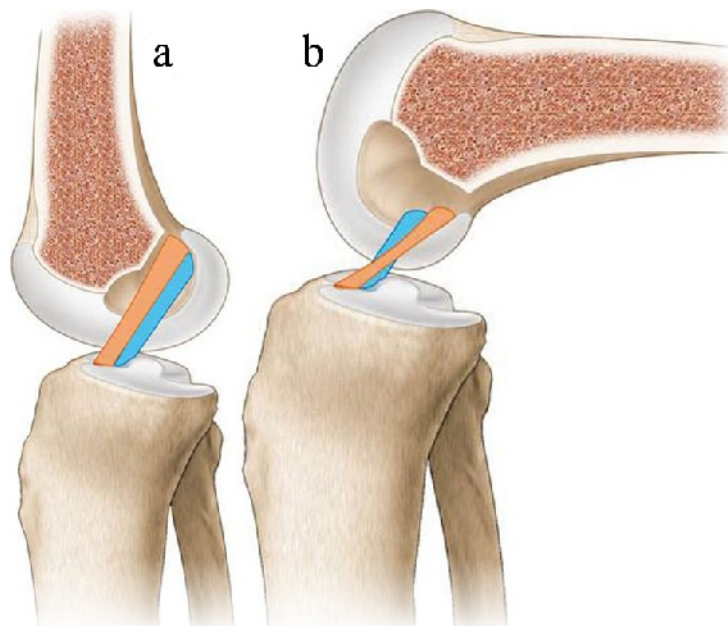


Illustration I 2: Représentation schématisique du LCA du genou droit composé des faisceaux antéromédial (orange) et postérolatéral (bleu) (a) en extension et (b) en flexion à 90° [Bicer2010].

I. Etat de l'art: ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur (LCA)

l'os, diminuant ainsi les effets de concentration de contraintes qui peuvent découler d'un changement abrupt de matériau [Arnoczky1983][Karmani2003][Zantop2006][Bicer2010]. L'insertion tibiale du LCA est plus grande est plus résistance que son insertion fémorale [Arnoczky1983].

Le LCA est abondamment innervé (près de 1% de sa section est constituée de tissu neuronal [Bicer2010]) par l'intermédiaire du tibia, ce qui lui confère les propriétés de proprioception [Arnoczky1983][Duthon2006] du LCA qui seront évoquées par la suite. Il est en revanche assez peu vascularisé, ce qui est partiellement à l'origine de sa faible cicatrisation spontanée lors d'une lésion [Cooper2005]. Néanmoins, quelques réseaux d'artères mineures sont présentes, notamment pour l'alimentation de la paroi synoviale qui enveloppe le LCA [Arnoczky1983][Karmani2003]. Le liquide synovial présent dans l'articulation du genou agit principalement comme lubrifiant, et permet également les échanges métaboliques lorsque la vascularisation n'est plus assurée [Vunjak-Novakovic2004].

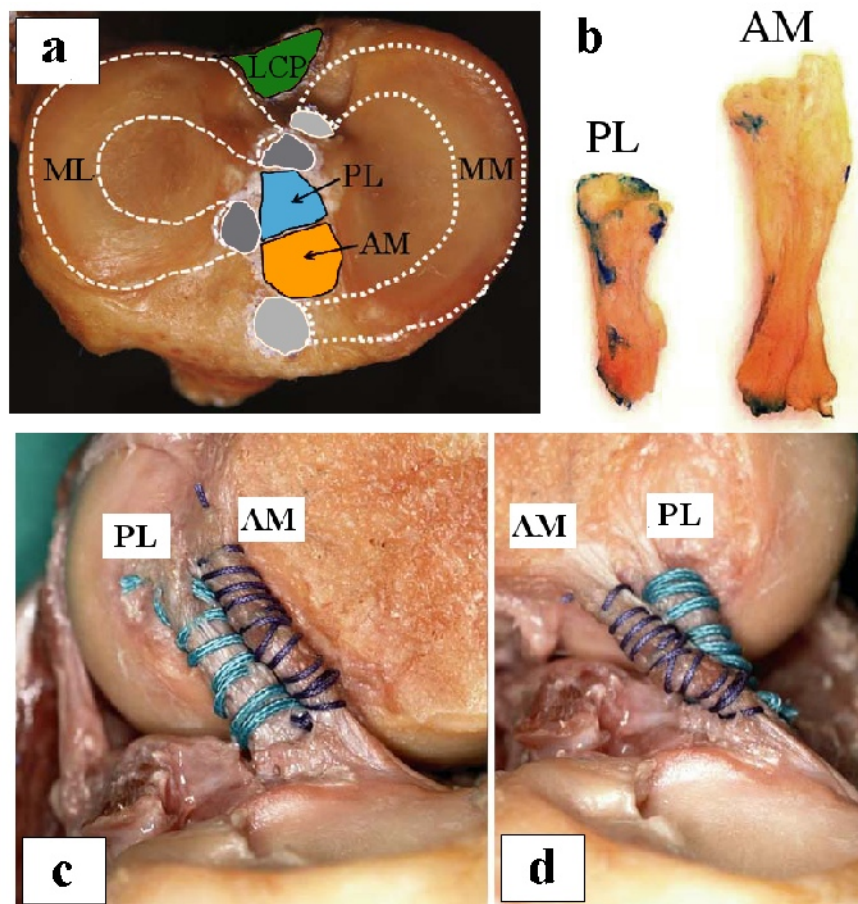


Illustration 1 3: (a) Insertions des faisceaux AM et PL, des ménisques médial (MM) et latéral (ML) et du LCP sur le tibia. Adapté de [Kato2010]. (b) faisceaux PL et AM isolés [Zantop2006], et dans l'articulation en extension (c) et à 110° de flexion (d) [Duthon2006].

L'idée communément admise est que le LCA est constitué de deux faisceaux distincts (Illustration I 2, Illustration I 3) [Amis1991][Gabriel2004][Duthon2006][Shen2007][Bicer2010][Kato2010][Katouda2011][Amiri2011], nommés faisceaux antéromédial (AM) et postérolatéral (PL) en raison de leur arrangement au niveau de l'insertion tibiale du LCA. Ces deux faisceaux s'enroulent ensemble lors de la flexion du genou [Bicer2010], et leur fonction peut varier considérablement selon le type de sollicitation ou l'angle de flexion du genou [Butler1989][Takai1993][Mommersteeg1997][Zantop2006][Yasuda2010]. Un faisceau intermédiaire est parfois distingué, mais il est la plupart du temps considéré comme une part du faisceau AM [Unwin2010]. La longueur du faisceau PL est significativement plus petite que celle du faisceau AM [Butler1989][Hosseini2009][Bicer2010], avec 22.5 mm pour le premier contre 34 mm pour le second en extension complète [Duthon2006]. La circonférence du faisceau AM isolé est environ 1.3 fois plus grande que celle du faisceau PL, et l'aire de leurs insertions fémorales et tibiales sont respectivement 1.1 et 1.2 fois plus grande pour le AM que pour le PL [Katouda2011].

La séparation du LCA en différents faisceaux n'est cependant pas claire d'un point de vue histologique [Dargel2007][Bicer2010], et n'est visible que pour seulement un tiers des données obtenues par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM) [Kaya2010]. En réalité, le modèle de séparation du LCA en deux ou trois faisceaux distincts est parfois considéré comme simpliste, dans la mesure où certains auteurs le considèrent comme un complexe ligamenteux dont les fibres jouent un rôle fonctionnel différent suivant la position de l'articulation [Arnoczky1983][Mommersteeg1997][Karmani2003][Zantop2006][Amiri2011].

2.2. Composition

Une connaissance précise de la composition du ligament et des proportions entre ses composants est essentielle, car elle permet notamment de différencier le tissu ligamenteux du tissu tendineux [Vunjak-Novakovic2004]. Du strict point de vue de la définition néanmoins, nous rappellerons qu'un ligament lie deux os tandis qu'un tendon lie un muscle à un os. Le tissu composant le LCA est un tissu conjonctif fibreux dense et peu vascularisé, formé d'un réseau tridimensionnel de cellules appelées fibroblastes (environ 20% du volume total) noyées dans une matrice extracellulaire composée d'eau (67 à 70% du poids net), de collagènes (plus de 80% du poids sec [Vunjak-Novakovic2004]), d'élastine, de glycoaminoglycanes (GAGs) et de protéoglycanes [Woo2006]. L'ensemble cellules et matrices extracellulaires forme une structure tridimensionnelle complexe. La matrice extracellulaire du ligament peut-être décomposée en deux parties distinctes, la substance fondamentale d'une part et la partie fibreuse de l'autre. La substance fondamentale est composée majoritairement d'eau et de macromolécules. Elle a la consistance d'un

gel et remplit l'espace entre les fibres et les cellules, améliorant ainsi l'adhérence cellulaire et la stabilité du squelette de la structure fibrillaire.

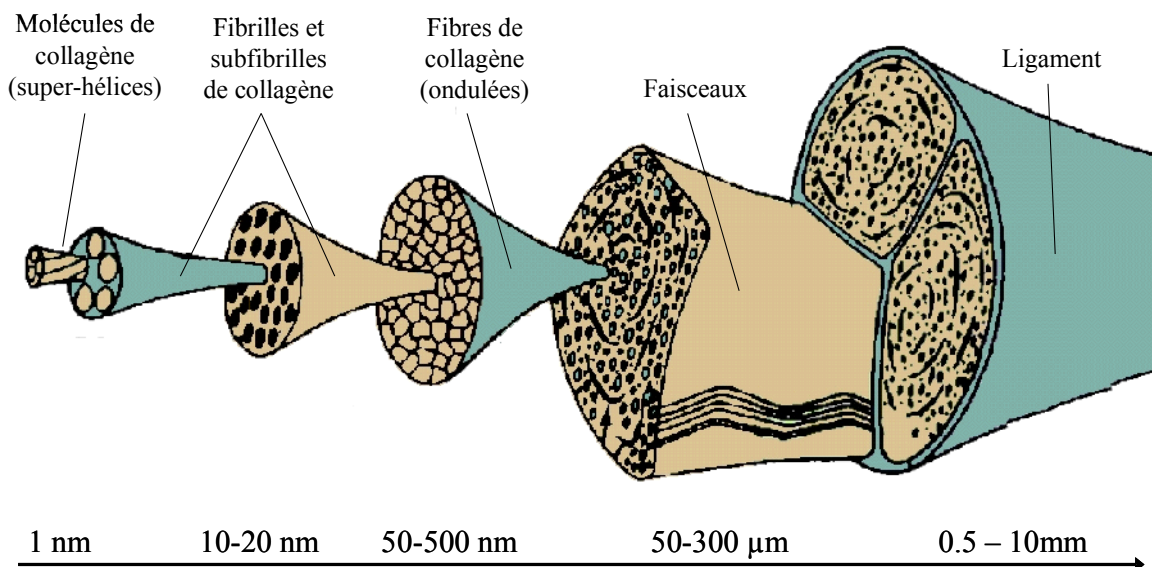


Illustration I 4: Architecture multi-échelles du ligament, allant de la molécule de collagène (nanomètre) à gauche jusqu'au ligament (millimètre) à droite. Adapté de [Cowin2000]

La structure fibreuse de la matrice extracellulaire est, comme pour la plupart des tissus vivants, hautement hiérarchisée (Illustration I 4) [Cowin2000]. Cette hiérarchie se décompose en six niveaux bien distincts, le premier étant la molécule de collagène (nanomètre) et le sixième étant le ligament (millimètre). Les molécules de collagène secrétées par les fibroblastes, au premier niveau de cette hiérarchie, sont présentes sous formes de super-hélices (hélices composées elle-même d'hélices) qui se regroupent pour former des fibrilles puis des subfibrilles, dont l'échelle est la dizaine de nanomètres. Ces fibrilles forment ensuite les fibres de collagène (échelle du micron), regroupées en différents faisceaux (séparés par des membranes appelées endoténon) pour enfin constituer le ligament. La structure fibreuse du ligament croisé antérieur est composée de fibres hétérotypiques de collagènes de type I, III et V et, dans une moindre part, d'élastine et de collagènes de type II, IX, X, XI et XII [Woo2006]. Ces différents types de collagènes confèrent au ligament ses propriétés mécaniques, le collagène de type I participant davantage à la résistance du ligament que le collagène de type III qui lui confère son élasticité. Ses deux collagènes I et III sont les plus présents dans le LCA, dans un ratio 9:1 [Altman2002].

On notera enfin que la structure du ligament est fortement anisotrope, car ces niveaux hiérarchiques sont principalement orientés selon la direction longitudinale, favorisant ainsi les propriétés mécaniques du ligament en traction. De plus, les fibres de collagène possèdent une

structure ondulée [Kennedy1976] (Illustration I 4), permettant au ligament une légère déformation due à l'alignement des fibres sans contraintes induites. Enfin, la structure fibreuse macroscopique du LCA forme globalement une hélicoïde [Arnoczky1983][Butler1989][Vunjak-Novakovic2004], ce qui implique que les sollicitations auxquelles le LCA est soumis ne peuvent pas se résumer à de la traction pure [Butler1989][Li2005].

La brève description de l'anatomie et de la composition du LCA qui vient d'être faite prête tout naturellement à analyser sa fonction au sein de l'articulation ainsi que son comportement mécanique, ce qui fera l'objet des deux sections suivantes.

3. Fonction et sollicitations physiologiques

3.1. Protocoles expérimentaux

La définition de la fonction du LCA peut se faire de manière qualitative par des considérations d'ordre purement clinique. Cependant, la quantification de sa fonction physiologique exacte et des sollicitations auxquelles il est soumis au quotidien nécessite des protocoles de mesure délicats à mettre en œuvre, tant les fonctions des différents tissus qui composent l'articulation sont parfois difficiles à dissocier.

On peut séparer deux approches parmi les protocoles qui ont été principalement utilisés: la première consiste à mesurer la cinématique de l'articulation du genou *in situ* lors de différents exercices, tandis que la seconde vise à reproduire artificiellement les mouvements ou efforts physiologiques sur des genoux cadavériques afin de quantifier les sollicitations qui en résultent au niveau du LCA. Dans le premier cas, la cinématique du genou a notamment été acquise par des méthodes basées sur l'imagerie à résonance magnétique (IRM) *via* un recalage d'image par fluoroscopie [Li2005][Hosseini2009] (Illustration I 5.a), et par marquage radiographique [Garbelotti2007]. Des approches de dynamique inverse, qui consistent à calculer les efforts dans un tissu connaissant la cinématique de ses insertions et son comportement mécanique, ont également été utilisées [Toutoungi2000]. Enfin, l'insertion directe de jauges de déformation [Bach1997] [Beynon1998a][Fleming2001] (Illustration I 5.b) sur les tissus a également permis de quantifier directement les sollicitations auxquelles le LCA était soumis.

Dans le second cas, il est nécessaire de reproduire les mouvements complexes de l'articulation qui impliquent des rotations et des translations dans les trois dimensions de l'espace [Woo1999]. Différents montages ont donc été proposés afin d'imposer à des genoux cadavériques une cinématique la plus physiologique possible [Markolf1990][Amis1991][Berns1992][Takai1993]

[Fujie1996][Woo1999][Gabriel2004][Li2006][Zantop2007][Amiri2011] (Illustration I 5.c). Une description précise d'un système de coordonnées est également nécessaire [Fujie1996] [Beynnon1998][Watanabe2000]. La fonction de tout ou partie du LCA peut être alors évaluée (1) par l'insertion directe de différents capteurs [Markolf1990][Wascher1993] (2) par dynamique inverse, à partir du déplacement de l'articulation induit par un effort donné [Mommersteeg1997] (3) en étudiant l'évolution de ce déplacement (ou de l'effort dans le cas où on impose un déplacement) lorsque l'un ou l'autre tissu ou faisceau du ligament est retiré [Butler1989][Amis1991] [Beynnon1998][Watanabe2000][Gabriel2004].

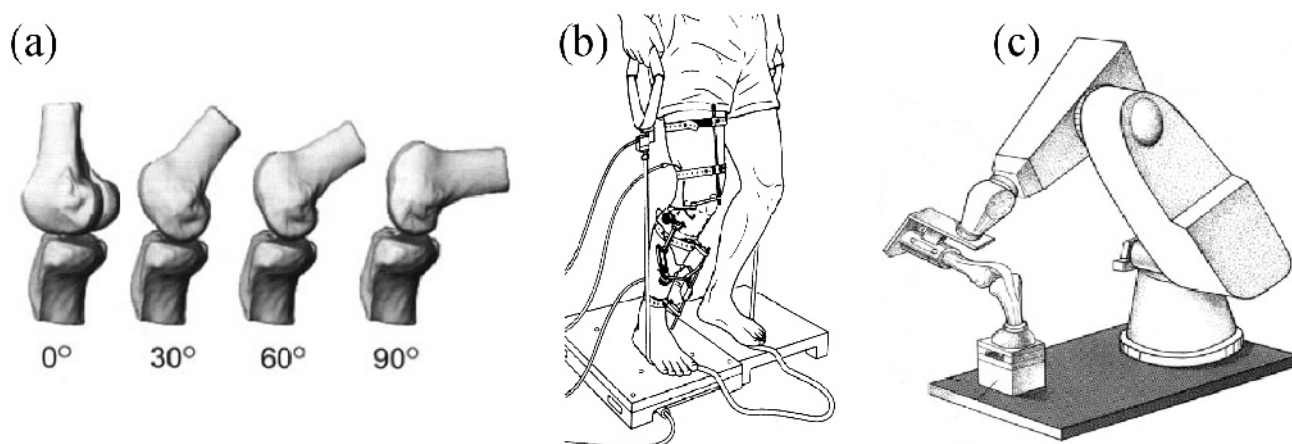


Illustration I 5: Différents protocoles visant à quantifier la fonction et les sollicitations physiologiques du LCA (a) Analyse de la cinématique du genou par imagerie [Li2005] (b) Mesure directe par insertion de jauges au niveau du LCA [Beynnon1998a] (c) Reproduction de la cinématique physiologique sur un genou cadavérique [Woo1999].

On notera que ces protocoles consistant à étudier des genoux cadavériques sont néanmoins difficiles à mettre en place en ce qui concerne l'approvisionnement en échantillons, leur conservation, les conditions des essais ou encore les montages nécessaires pour imposer et/ou mesurer des efforts et des déplacements dans toutes les directions de l'espace.

3.2. Fonction physiologique

La disposition des deux ligaments croisés leur permet de se compléter dans leur rôle quant à la stabilité du genou : ils empêchent tous deux les mouvements de tiroir antéropostérieur et l'hyperrotation du tibia par rapport au fémur. Le LCA est le principal opposant à la translation du tibia d'arrière en avant par rapport au fémur d'autant plus que le genou est fléchi [Butler1989] [Takai1993][Mommersteeg1997][Karmani2003][Dargel2007][Bicer2010]. Il limite également la

rotation interne du tibia dans l'axe de la diaphyse fémorale [Frank1997][Andersen1997][Zantop2006][Dargel2007][Zantop2007][Bicer2010]. Un rôle secondaire lui est également attribué dans la limitation des contraintes de varus-valgus [Fleming2001][Karmani2003]. Bien entendu, les autres tissus de l'articulation du genou sont également impliqués dans la restriction de ces mouvements, et peuvent donc compenser dans une certaine mesure l'instabilité du genou due à un fonctionnement anormal du LCA [Frank1997][Andersen1997].

Le rôle du LCA dans la limitation du tiroir antéro-postérieur est attribué généralement au faisceau AM, tandis que la stabilité en rotation est plus attribuée au faisceau PL [Zantop2006][Shen2007][Zantop2007][Poellinger209][Kaya2010][Katouda2011] qui se tend lors d'une rotation interne ou externe [Unwin2010]. En considérant la position et la longueur de différents faisceaux du ligament à différents angles de flexion du genou, il a été montré que le maintien de l'articulation se distribue progressivement des faisceaux postérieurs vers les faisceaux antérieurs lors de la flexion [Takai1993][Mommersteeg1997][Bach1997][Watanabe2000][Gabriel2004][Duthon2006][Hosseini2009][Unwin2010][Bicer2010][Amiri2011]. Cette caractéristique implique qu'au moins une partie du LCA soit tendue quel que soit le degré de flexion du LCA [Arnoczky1983][Lattermann2005]; les deux faisceaux sont donc complémentaires. Bien que la limitation de la rotation du tibia par rapport au fémur soit principalement assurée par les ligaments collatéraux et la forme des condyles et du ménisque [Amis1991][Duthon2006], la disposition du LCA lui permet également de s'opposer aux moments de torsion agissant au niveau de l'articulation du genou [Dargel2007]. L'application externe de moments dans diverses directions a permis de montrer que des efforts supérieurs à 150 N au sein du LCA pouvaient être provoqués par des sollicitations en hyperflexion, hyperextension et hyperrotation, soulignant l'intérêt du LCA lors de divers types de sollicitations [Wascher1993]. Une hyperrotation n'entraîne en revanche aucune déformation significative au niveau du faisceau AM [Berns1992], ce qui conforte l'idée que le faisceau PL est davantage responsable de la stabilité du genou en rotation que le faisceau AM. Les fibres latérales ne semblent pas être de première importance dans la limitation du tiroir antéro-postérieur [Mommersteeg1997] et sont peu sollicitées lors d'une flexion du genou [Garbelotti2007]. De même le faisceau intermédiaire pris en compte dans certaines études supporte des charges bien moindres que les faisceaux AM et PL [Bach1997]. Nous noterons également que l'hypothèse de non-interaction entre les différents faisceaux, à la base des études citées, a été validée en séparant physiquement différents faisceaux [Takai1993].

Le LCA ne s'oppose pas à de petits déplacements en translation ou en rotation et permet une certaine laxité de l'articulation pour de faibles sollicitations. Les propriétés du LCA permettent en effet un tiroir antéro-postérieur de 3 à 5 mm dans des conditions physiologiques normales [Woo1999][Dargel2007]. De même, les rotations totales interne-externe et en varus-valgus résultant

de l'application externe de moments sont comprises entre 20° et 40° et entre 4° et 12° respectivement selon l'angle de flexion [Wascher1993][Andersen1997]. Nous verrons par la suite que cette laxité de l'articulation peut être en partie expliquée par la réponse en traction du LCA qui est fortement non-linéaire, en raison notamment du caractère ondulé des fibres qui le constituent (Illustration I 4).

Enfin, une fonction proprioceptive importante est également attribuée au LCA, ce qui permet un réflexe de contraction des muscles du genou lorsqu'il est déformé et donc un « feedback » sur la cinématique du genou [Frank1997]. En effet, comme le LCA est l'unique structure antagoniste du mouvement de translation tibiale antérieure générée par le quadriceps, les mécano-récepteurs du LCA influent sur la fonction de ce dernier [Frank1997][Karmani2003].

3.3. Sollicitations physiologiques

Dans cette section, par « sollicitations physiologiques » nous entendrons les sollicitations qui résultent d'un mouvement ordinaire du genou, et plus particulièrement des mouvements qui sont induits par les exercices de réhabilitation classiques qui font suite à une reconstruction du LCA et par une activité quotidienne. Nous excluons ici les sollicitations qui peuvent, par exemple, être induites par la pratique d'un sport à risque. Nous ne présenterons pas non plus dans cette section la réponse *in vitro* du LCA, qui sort du cadre des sollicitations physiologiques et sera traité dans la section suivante (I.4.). Un point important pour la suite mérite d'être soulevé : nous considérerons que les sollicitations imposées au LCA dans le cadre de ces activités sont induites par le déplacement de ses insertions, et non par des efforts qui lui sont directement appliqués (comme cela peut être le cas pour l'os). Ainsi, nous nous intéresserons tout particulièrement aux études visant à quantifier *in situ* les déformations physiologiques plutôt que les efforts au sein du LCA, les derniers étant dépendants des propriétés mécaniques du tissu ligamenteux et donc en particulier de l'âge du patient. Il pourra être intéressant néanmoins d'avoir une idée de ces efforts *in situ*, notamment en ce qui concerne les moyens qui doivent être utilisés afin de fixer le substitut dans l'articulation.

Les protocoles de mesure *in situ* détaillés ci-dessus ont permis d'acquérir des données quant aux déformations moyennes auxquelles est soumis tout ou partie du LCA lors d'exercices de réhabilitation classiques. Nous nous intéresserons tout particulièrement aux mesures effectuées sur des sujets sains et jeunes et non sur des genoux cadavériques. L'insertion directe de capteurs de déformation a permis de quantifier les déformations au sein du faisceau AM, seul faisceau atteignable avec un arthroscopie, durant divers exercices de réhabilitation [Beynon1998a]. Quelques exercices classiques et les déformations qu'ils engendrent au niveau du faisceau AM du LCA selon cette étude sont répertoriés dans le Tableau I 1.

I. Etat de l'art: ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur (LCA)

| Déformation mesurée | Type d'exercice |
|---------------------|---|
| > 4% | <ul style="list-style-type: none"> • contraction des quadriceps à 15° (couple en extension de 30Nm) • squats (flexions sur jambe) avec cordes élastiques |
| 3% - 4% | <ul style="list-style-type: none"> • flexion/extension active avec bottes de 45N • test de Lachman (charge antéro-postérieure de 150N) • squats (flexions sur jambe) |
| 2% - 3% | <ul style="list-style-type: none"> • flexion/extension active • contractions simultanée des quadriceps et biceps fémoraux à 30° • contraction des quadriceps fémoraux à 30° (couple en extension de 30Nm) |
| < 2% | <ul style="list-style-type: none"> • bicyclette • flexion/extension passive • contraction des biceps fémoraux (couple en flexion de 10Nm) • contraction des quadriceps fémoraux (couple en extension de 30Nm) à plus de 60° • contractions simultanées des quadriceps et biceps fémoraux à plus de 60° |

Tableau I 1: Déformations dans le faisceau AM du LCA associées à différents types d'exercices de réhabilitation, mesurées directement par l'insertion d'une jauge de déformation. Adapté de [Beynnon1998a].

Avec ce même protocole, l'effet de l'application du poids du corps sur les déformations dans le LCA a été quantifié [Fleming2001]. Il apparaît que le LCA est davantage maintenu en tension lorsque le poids du corps est appliqué, mais que les déformations maximales enregistrées pour différents types de sollicitations demeurent inchangées. Il est néanmoins nécessaire de souligner que les mesures rapportées ci-dessus ne peuvent être utilisées qu'à condition de garder à l'esprit les imprécisions qui y sont inévitablement associées, notamment en raison de la forte variabilité des résultats et de la zone restreinte du LCA pour laquelle ces déformations ont été mesurées. En effet, l'hétérogénéité de la répartition des déformations au sein du LCA due à sa géométrie complexe a été particulièrement soulignée [Butler1989][Bach1997][Beynnon1998a][Hosseini2009].

En reconstruisant l'articulation du genou à partir d'imagerie 3D, la déformation moyenne au sein du LCA a été évaluée pour plusieurs angles de flexion avec ou sans le poids du corps, et en décomposant ou non le LCA en différents faisceaux [Hosseini2009]. Il a été montré que l'application (statique) de tout le poids du corps sur un seul genou impliquait des déformations dans le LCA comprises entre 1.2% et 4.6% suivant l'angle de flexion, avec un maximum atteint à 30° [Hosseini2009]. Le même type d'étude a permis de quantifier la torsion au sein du LCA due à une flexion complète du genou, et il a été montré que la forme globalement hélicoïdale du LCA passait de 10° à 45° de torsion lorsque la flexion du genou passe de 0 à 90° [Li2005]. Cette forme globalement hélicoïdale entraîne un couple au niveau des insertions osseuses lorsque le fémur est éloigné du tibia [Li2005], couple qui a été relié de façon quasi-linéaire à l'effort de traction sur un

modèle canin [Butler1983] et pourrait contribuer à la stabilité du genou en rotation.

Des méthodes de dynamique inverse ont permis également d'estimer les efforts au sein du LCA durant divers exercices de réhabilitation classiques [Toutoungi2000]. Pour les trois types de mouvements considérés (« squats », contractions isométriques et flexions isocinétiques), les efforts maximaux calculés n'ont pas dépassé 400 N. Il faut noter que ces résultats doivent être considérés en gardant à l'esprit les nombreuses simplifications effectuées lors de l'application des méthodes de dynamique inverse. En outre, la plupart des études effectuées sur des genoux cadavériques ont confirmé cette limite supérieure de 400 N [Markolf1990][Wascher1993][Mommersteeg1997], bien que les efforts ou mouvements imposés au genou lors de ces expériences ne correspondent pas nécessairement à des sollicitations physiologiques.

4. Propriétés mécaniques

Les études concernant la biomécanique du LCA sont nombreuses et apparaissent dès le milieu du XX^{ème} siècle [Smith1966]. De part sa forme et sa fonction, le LCA (et/ou ses faisceaux) est souvent considéré comme principalement sollicité en traction uniaxiale, et les études visant à caractériser la réponse mécanique du LCA selon d'autres types de sollicitations sont très rares, sinon inexistantes. Dans cette section, nous allons donc tenter de définir la réponse biomécanique typique du LCA natif en traction uniaxiale. Nous noterons cependant que des études *in vitro* ont montré que la charge à rupture du LCA était plus faible lors d'essais de traction-torsion que lors d'essais de traction pure, d'autant plus que la torsion s'effectue rapidement, ce qui a conforté l'idée d'une éventuelle participation des effets de torsion dans la rupture du LCA [Azangwe2002].

4.1. Protocoles expérimentaux

De nombreuses études ont tenté de caractériser le comportement mécanique du LCA natif en traction. Elles sont cependant difficiles à confronter, tant les résultats obtenus peuvent facilement varier en fonction du protocole utilisé. En particulier, les résultats sont différents si l'on étudie le LCA avec ses insertions osseuses ou le LCA seul, auquel cas des précautions particulières doivent être prises pour éviter le glissement entre le tissu et le moyen de préhension utilisé sans pour autant le détériorer [Noyes1984]. Dans le cas de l'utilisation de complexes tibia-LCA-fémur, la rupture du LCA peut survenir au niveau des insertions osseuses, surtout lors de tests effectués à faibles taux de déformation [Noyes1974] : on parle dans ce cas de rupture par avulsion. Il est alors difficile de distinguer les déformations du LCA de celles de ses insertions osseuses ; des moyens vidéos peuvent cependant aider à établir ces différentes déformations [Woo1999]. De plus, une attention

I. Etat de l'art: ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur (LCA)

particulière doit être apportée à la position relative du fémur et du tibia, de sorte que le LCA soit effectivement soumis à de la traction uniaxiale. On trouve dans la littérature différents types de dispositifs (Illustration I 6), et il est donc inévitable que les résultats obtenus soient difficilement comparables. Les propriétés du LCA peuvent être considérées du point de la vue de la structure (rigidité, force à rupture, allongement à rupture, énergie absorbée) ou bien, à partir de mesures de sa section et de sa longueur, du point de vue du matériau (module tangent, contrainte à rupture, déformation à rupture, densité d'énergie de déformation) [Woo2006]. Plusieurs auteurs ont ainsi été confrontés à la difficulté de mesurer proprement la longueur ou la section du LCA en vue de tracer une courbe de réponse en contrainte-déformation [Noyes1974][Berns1992][Chandrashekar2006]. De même, la définition d'une valeur pertinente pour la déformation exige que le LCA soit aligné selon l'axe de l'essai de traction, ce qui n'est pas toujours le cas et peut mener à des erreurs, compte-tenu notamment de l'allure hélicoïdale du LCA [Noyes1976].

On notera également qu'il est essentiel d'observer un protocole de conservation rigoureux des LCA entre le moment du prélèvement et le moment de l'essai [Beynon1998]. Certains auteurs préconisent des essais à la température du corps humain et dans un liquide qui équivaut à un fluide physiologique normal [Beynon1998], tandis que d'autres auteurs effectuent leurs essais à

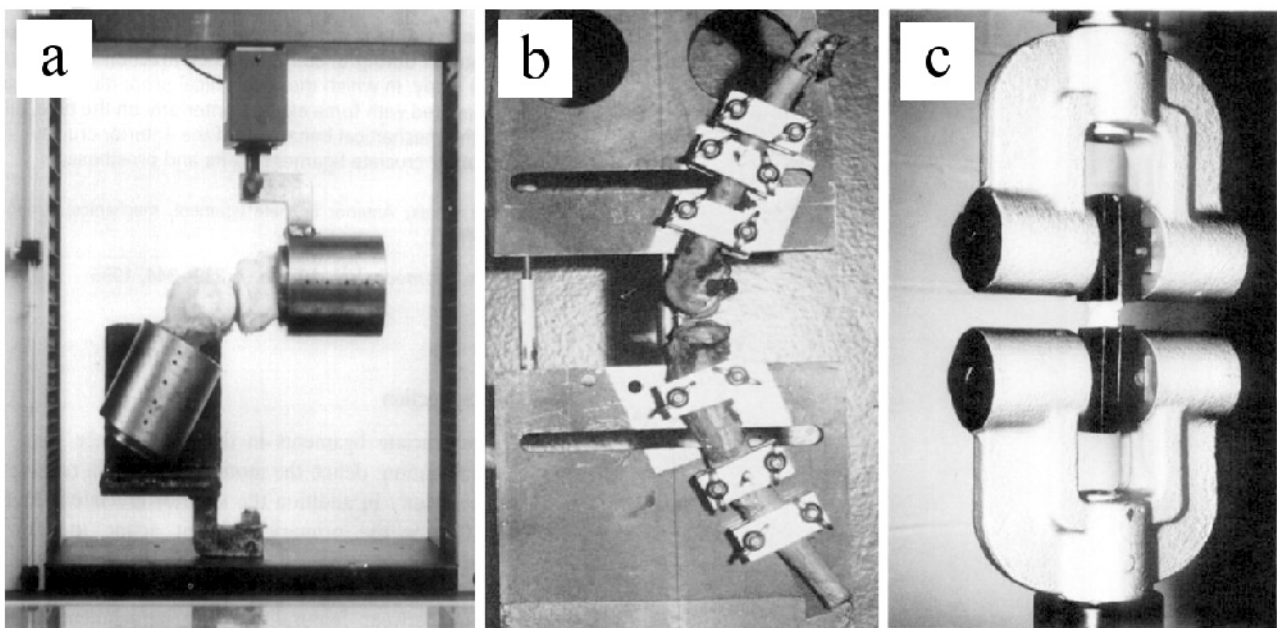


Illustration I 6: Différents protocoles visant à évaluer les propriétés mécaniques en traction du LCA natif. (a) Essai de traction sur un complexe tibia-LCA-fémur, les extrémités osseuses étant fixées dans des cylindres métalliques [Jones1995] (b) Essai de traction sur un complexe tibia-LCA-fémur, avec serrage direct des deux os sur les mors de la machine de traction [Noyes1974] (c) Essai de traction sur le LCA seul maintenu directement entre les mors de la machine de traction [Kennedy1976].

température ambiante et sans immerger le tissu [Kennedy1976] ou en l'aspergeant régulièrement [Jones1995][Pioletti1999]. Par ailleurs, lors d'essais cadavériques de traction sur des LCA, il convient de préciser les causes de la mort du donneur pour prendre en compte les causes éventuelles d'effets antemortem [Noyes1976].

La difficulté d'approvisionnement en LCA humains d'origine cadavérique, *a fortiori* en ce qui concerne des LCA de patients jeunes, a souvent amené les auteurs à étudier le comportement du LCA en utilisant des modèles animaux comme le singe [Noyes1974][Noyes1976], le chien [Butler1983][Keira1996], le veau [Pioletti1999] ou le lapin [Sekiguchi2001]. Cependant, chaque ligament est unique dans sa croissance, son développement et son vieillissement, et il peut être délicat d'extrapoler à l'homme les résultats obtenus sur un type de ligament ou sur un modèle animal [Woo2006], d'autant plus en ce qui concerne le passage entre quadrupède et bipède [Beynon1998].

4.2. Réponse typique en traction

La réponse mécanique du LCA en traction ne dépend pas uniquement des propriétés des fibres qui le constituent mais aussi de l'arrangement des fibrilles de collagène et des faisceaux de fibres, des proportions de ses différents composants et, de façon plus méconnue, de la substance fondamentale dans laquelle cette architecture est noyée [Noyes1974]. Globalement, le LCA est une structure tridimensionnelle fortement anisotrope du fait de la direction privilégiée des fibres de collagène [Woo2006]. La courbe de réponse effort-allongement qui résulte d'un test de traction

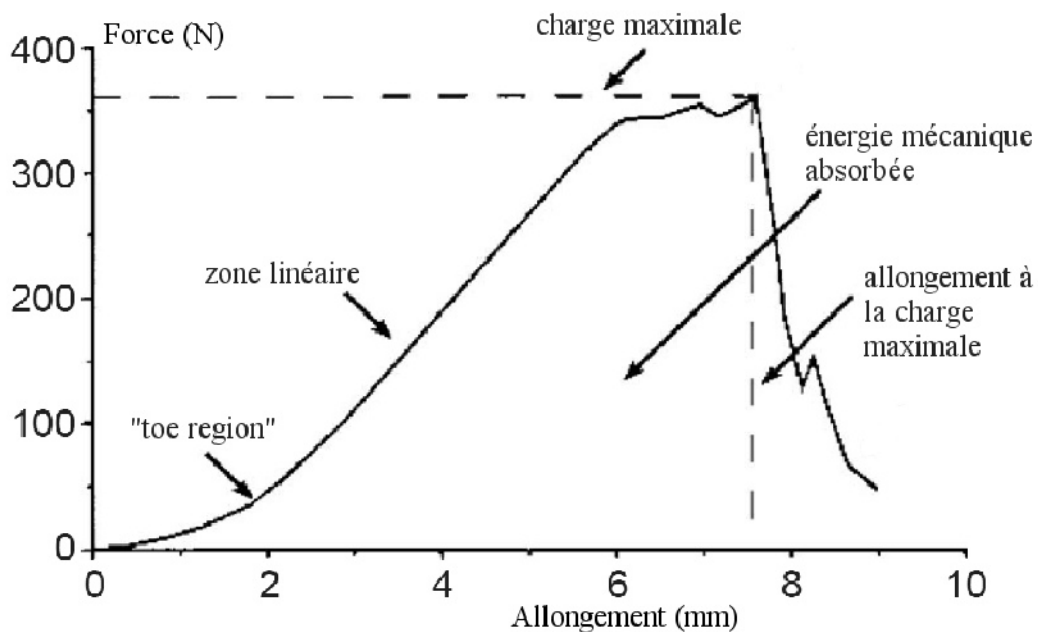


Illustration I7: Courbe de réponse typique du LCA en traction uniaxiale [Karmani2003]

I. Etat de l'art: ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur (LCA)

uniaxiale sur un LCA est globalement non-linéaire et convexe (Illustration I 8).

La première partie de cette courbe, dénommée par l'anglicisme « toe region » ou « courbe en J » en français, est présente dans les premiers pourcents de déformation du LCA. Elle est souvent expliquée par la suppression du caractère ondulé des fibres de collagène [Kennedy1976][Woo1999], mais les glissements interfibrillaires et le cisaillement de la substance fondamentale peuvent également jouer un rôle [Karmani2003]. Cette zone autorise des mouvements physiologiques normaux sans induire d'efforts importants [Woo1999][Woo2006] et permet donc une certaine laxité de l'articulation. La seconde partie de la courbe effort-allongement est quasi-linéaire et résulte du recrutement puis de l'élongation des fibres de collagène : c'est elle qui est utilisée pour mesurer la rigidité du LCA [Karmani2003]. La rigidité du LCA est responsable de la restriction des mouvements relatifs entre ses deux insertions, et elle constitue donc une de ses caractéristiques primordiales. La dernière partie traduit la rupture progressive des fibres de collagène.

Une revue partielle de la littérature portant sur les propriétés mécaniques du LCA humain (obtenues à partir de protocoles comparables) en termes de charge maximale, déformation à charge maximale, rigidité, module tangent et énergie absorbée (Illustration I 8) est rapportée dans le tableau ci-dessous (Tableau I 2). Nous soulignerons notamment la variation des valeurs obtenues suivant les études considérées.

| Référence | | Taux de déformation / vitesse de traction | Charge maximale (N) | Déformation à la charge maximale (%) | Rigidité (N/mm) | Module tangent (MPa) | Energie absorbée (Nm) |
|---------------------|------------------------|---|----------------------|--------------------------------------|------------------|----------------------|-----------------------|
| [Jones1995] | 40-60 ans >60ans | 500mm/min | 1171±339 1057±269 | | 205±44 167±56 | | 4,5±1.4 4,7±1.9 |
| [Chandrashekar2006] | | 100s ⁻¹ | 1526±658 | 28±7 | 250±102 | 113±45 | 5,9±3.7 |
| [Kennedy1976] | | 125mm/min 500mm/min | 482±28 638±23 | 30,8±2.3 35,8±2.8 | | | |
| [Noyes1976] | 48-86 ans 16-26 ans | 100s ⁻¹ | 734±266 1730±660 | 30±10 44±8 | 129±39 182±56 | 65±24 111±26 | 4,9±2.4 12,8±5.5 |

Tableau I 2: Revue partielle concernant les propriétés en traction uniaxiale du LCA natif humain.

Les interactions complexes qui agissent entre les fibres de collagène, l'élastine, les protéoglycanes, la substance fondamentale et l'eau impliquent que le comportement du LCA dépende du temps et de l'histoire des chargements [Pioletti1999][Wren2003] [Karmani2003] [Woo2006][Ciarletta2008]. Le LCA est donc un tissu viscoélastique, qui montre une certaine hystérésis lors de cycles de chargement [Butler1989][Woo1999][Ciarletta2008], ainsi que des

phénomènes de relaxation de contrainte et de fluage [Smith1966][Woo1999][Provenzano2002a][Abramowitch2004][Woo2006][Pena2008]. Ce caractère viscoélastique a pour effet de permettre au LCA d'ajuster sa longueur et son état de contraintes internes en fonction de l'historique du chargement [Frank1997], et ainsi de le protéger contre une rupture en fatigue [Woo1999]. Il a été montré qu'un chargement cyclique (et donc une activité sportive) augmente la rigidité du LCA de lapin ainsi que la laxité (relâchement) de l'articulation [Sekiguchi2001], laxité qui disparaît bien entendu après une période de repos [Dargel2007][Woo1999]. Cela a été mis en exergue par le biais de différents types d'essais dynamiques qui ont été réalisés sur des tissus similaires [Wren2003] : il a été montré en effet que la contrainte maximale liée à des cycles répétés d'amplitude fixe diminue au cours du temps, traduisant ainsi un effet d'adoucissement de ce type de matériau, et que des cycles à efforts constants impliquent des déformations croissantes.

4.3. Facteurs influants

Comme vu précédemment, le LCA présente –ainsi que la plupart des tissus biologiques- un caractère viscoélastique, qui été largement démontré [Noyes1974][Pioletti1999][Pioletti2000] et modélisé [Provenzano2002a][DeVita2006][Pena2008][Kahn2008][Ciarletta2008] pour différents types de ligaments ou tendons. En particulier, la déformation à rupture, la charge à rupture et l'énergie absorbée augmentent de façon significative avec le taux de déformation [Noyes1974]. L'effet du taux de déformation sur les propriétés du complexe os-LCA-os est d'autant plus prononcé qu'il influe sur la proportion des ruptures par avulsion [Noyes1976], et constitue donc un facteur important dans la caractérisation du comportement mécanique du LCA. De plus, la variation de la réponse mécanique de ce type de tissu en fonction de l'histoire des chargements [Wren2003][Ciarletta2008] implique un effet prononcé du pré-conditionnement des échantillons lors des essais expérimentaux [Woo2006].

Le sexe est un facteur hautement influant en ce qui concerne les lésions du LCA, qui sont trois fois plus fréquentes chez les femmes que chez les hommes [Woo2006]. Les propriétés structurelles (charge à rupture, rigidité) aussi bien que les propriétés intrinsèques du matériau (contrainte à rupture, module d'élasticité) sont en effet plus élevées chez les hommes que chez les femmes, indépendamment des autres facteurs (taille, poids, dimensions du LCA) [Chandrashekar2006]. L'immobilisation ou l'exercice peuvent avoir également des conséquences très significatives sur les propriétés du LCA, bien que réversibles par la remobilisation dans le cas d'une inactivité prolongée [Woo1999][Karmani2003][Woo2006]. En effet, un LCA canin dont l'état de contrainte est chroniquement relâché par diminution de la distance fémur-tibia voit sa section augmenter dans les 6 semaines qui suivent l'opération, et ses propriétés mécaniques diminuer dans les 12 semaines

[Keira1996], ce qui démontre l'existence de réactions métaboliques et mécaniques. L'âge a des effets démontrés sur les propriétés du LCA [Noyes1976][Beynon1998][Karmani2003][Chandrashekar2006], et la proportion de rupture par avulsion augmente avec l'âge du patient [Noyes1976][Jones1995] ce qui tend à réduire la résistance mécanique du complexe fémur-LCA-tibia. Des études ont également montré que les données anthropométriques du patient avaient un effet sur les propriétés du LCA [Jones1995][Chandrashekar2006]. Enfin, le LCA est sensible au taux d'œstrogène, ce qui pourrait en partie expliquer la prédisposition des athlètes féminines à la lésion du LCA [Karmani2003].

5. Lésions et réparation

5.1. Lésions

Ces dernières décennies, la banalisation de la pratique de sports à caractère traumatique pour les articulations (particulièrement le basketball, le handball, le football ou le ski [Unwin2010]) a entraîné une nette augmentation du nombre de lésions au niveau du LCA. Cette augmentation est notamment accentuée par la pratique croissante de ces sports chez les femmes, qui sont plus exposées à des lésions du LCA [Unwin2010]. En France, par exemple, on estime à 20 000 par an le nombre de ruptures du LCA au cours d'accidents de ski [Viateau2011]. Il a été estimé que la rupture du LCA intervenait dans près de 50% des traumatismes du genou [Marchaland2000]. Ces lésions proviennent principalement de quatre types de mouvements : une hypertorsion du tibia (80% des ruptures du LCA), une rotation de type valgus/externe (courante en ski), une hyperextension du genou (par exemple lors d'un « shoot » dans le vide ou d'un « tackle » en football) ou une flexion accompagnée d'une translation postérieure (courant lors d'accidents de la route) [Karmani2003]. La combinaison de plusieurs types de mouvements, parmi lesquels les déplacements antéro-postérieurs et médio-latéraux, et les rotations internes-externes ou en valgus-varus, accentuent d'autant plus la déformation du LCA *in situ* conduisant au risque de rupture [Berns1992]. La plupart des ruptures interviennent en général lors d'un changement de direction ou d'un arrêt brutaux lorsque le genou est en pleine extension et le pied en contact avec le sol, typiquement lors de sports à pivots où les athlètes sont amenés à changer de direction alors que leur poids se concentre brutalement sur une seule jambe [Dargel2007][Unwin2010].

Parfois, le LCA n'est que partiellement rompu et garde une certaine continuité. L'évolution de ce type de blessure peut alors se diriger vers une rupture complète si une majeure partie du LCA a été touchée ou, plus rarement, vers un retour progressif à l'activité s'il a été peu atteint [Noyes1989]. Si la gaine synoviale qui enveloppe le LCA a été rompue, une cicatrisation spontanée est

impossible; sinon, dans quelques cas, une cicatrisation est possible *via* la migration des fibroblastes de cette paroi vers le site lésé [Karmani2003]. Quel que soit le degré de la rupture partielle, les risques de blessures dans les années suivant la lésion sont largement accentués, et la fonctionnalité de l'articulation n'est jamais entièrement recouverte [Noyes1989].

Dans la plus grande majorité des cas, lors d'une lésion du LCA, les deux extrémités rompues du ligament se rétractent et s'éloignent l'une de l'autre, empêchant toute cicatrisation spontanée, et l'acte chirurgical devient nécessaire (de préférence dans les 12 mois qui suivent la lésion [Unwin2010]). La rupture du LCA est rarement isolée et implique dans 80% des cas d'autres tissus comme les ménisques [Karmani2003] ou les ligaments médiaux collatéraux [Dargel2007]. Ce type de lésion altère inévitablement la cinématique du genou, et peut entraîner une dégradation à long terme des tissus avoisinants [Frank1997][Woo1999][Karmani2003]. Entre autres, les ligaments collatéraux [Kanamori2000][Dargel2007] ou les structures postéro-latérales du genou [Kanamori2000] qui compensent alors l'instabilité du genou peuvent se dégrader et entraîner des usures anormales des cartilages du fémur et du tibia, donnant alors lieu à de l'arthrose [Butler1989] [Kanamori2000][Gao2010][Bicer2010][Unwin2010], maladie articulaire douloureuse et souvent difficile à traiter [Frank1997]. De plus, le LCA étant le principal opposant au tiroir antéro-postérieur, sa rupture implique une laxité accrue pour ce type de mouvement [Kanamori2000], provoquant ainsi une instabilité potentiellement dangereuse pour l'articulation. Cette instabilité due à une rupture du LCA est d'autant plus marquée que l'innervation, et donc la fonction proprioceptive, est généralement rompue en même temps que le LCA (et n'est d'ailleurs pas recouverte après réparation [Frank1997]).

Le diagnostic pré-opératoire est basé sur de nombreux facteurs, parmi lesquels l'émission d'un bruit sourd (« pop » en anglais) lors de la rupture, une enflure importante du genou dans les heures suivant l'accident, et/ou une cinématique anormale caractérisée par divers tests cliniques [Karmani2003][Unwin2010]. La validation du diagnostic final requiert souvent une étape d'imagerie de type radiographie, arthroscopie, IRM, arthrographie ou arthrométrie [Karmani2003]. Elle débouche la plupart du temps sur une intervention chirurgicale visant à reconstruire le tissu lésé. La chirurgie du LCA est, bien entendue, suivie d'une phase de rééducation et donc d'une absence de travail prolongée, ce qui offre à la réparation du LCA l'aspect d'un double défi médical et économique [Karmani2003]. En effet, le coût des ruptures de LCA dues aux seuls accidents de ski en France est estimé à 300 millions d'euros par an si l'on inclut l'intervention, la rééducation et les arrêts de travail qui y font suite [Viateau2011].

5.2. Protocoles chirurgicaux

5.2.1 Points importants de la ligamentoplastie

La réparation du LCA rompu par simple suture des deux extrémités, avec ou sans tissu de consolidation, a été abandonnée à cause des ruptures à long terme qui y faisaient suite [Frank1997]. En général, la rupture du LCA est traitée par un acte chirurgical appelé ligamentoplastie. Le temps idéal qui sépare la date d'apparition de la lésion et celle de la reconstruction n'a pas été clairement défini notamment à cause de certaines études contradictoires [Frank1997]. Il n'existe pas une unique méthode de reconstruction du LCA, et le choix de celle-ci se fait au cas par cas en fonction de l'ampleur de la lésion, de l'état du genou avant la lésion, du phénotype du patient et de ses pratiques sportives [Lewis1989][Frank1997][Dargel2007]. L'efficacité de l'acte chirurgical est dépendant d'un certain nombre de paramètres qui vont être brièvement abordés ci-après, parmi lesquels l'emplacement anatomique du tissu de remplacement, le moyen de fixation ou le programme de réhabilitation utilisé [Noyes1984][Butler1989][Lewis1989][Frank1997][Li2006][Dargel2007].

Premièrement, le ligament de substitution est mis en place dans l'articulation par l'intermédiaire de petits tunnels osseux, au niveau du tibia et du fémur, dans lesquels il est ensuite fixé. Ces tunnels sont percés grâce à un foret qui doit déboucher dans l'articulation à l'endroit exact des attaches normales du ligament. Nous noterons que le tunnel fémoral n'est pas nécessairement débouchant à l'extérieur de l'articulation (Illustration I 8), car il peut être effectué à partir de

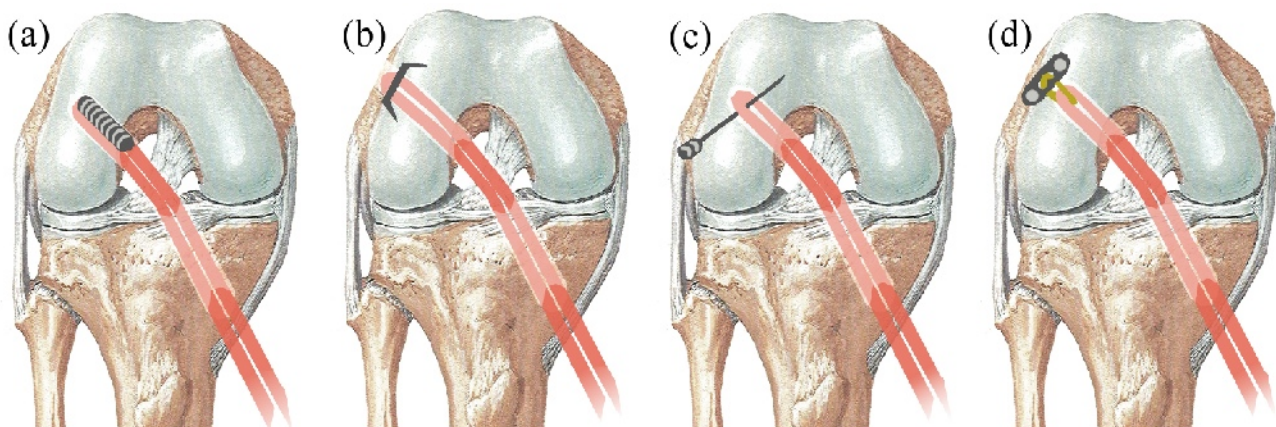


Illustration I 8: Différents moyens de fixation utilisés pour l'ancrage du substitut de LCA dans les tunnels osseux selon les protocoles classiques. (a) Fixation par l'insertion de vis d'interférence entre la greffe et le tunnel osseux (b) Agrafe fixant la greffe sur la paroi osseuse (c) Système transfixant venant s'insérer dans la boucle formée par la greffe (d) Système endobouton, venant également maintenir la boucle formée par la greffe.

l'intérieur de l'articulation. Un écart dans l'une ou l'autre direction de l'emplacement du tunnel osseux par rapport à l'insertion osseuse d'origine a d'importantes conséquences sur la cinématique du genou postopératoire [Zantop2006][Dargel2007]. L'emplacement anatomique idéal de ces tissus osseux est encore soumis à débat à ce jour [Frank1997][Karmani2003a][Bicer2010]. L'emplacement de la fixation de la greffe au sein de ces tunnels osseux est également important [Frank1997][Karmani2003a], la rigidité de la greffe étant évidemment d'autant plus grande que sa fixation est proche de l'entrée du tunnel osseux [Dargel2007]. Il existe de nombreux moyens de fixation de la greffe dans les tunnels de fixation, dont les principaux sont les vis d'interférence (permanentes ou résorbables) qui se placent entre la paroi du tunnel osseux et le nouveau ligament, les agrafes, et les systèmes « transfixant » et « endobouton » (Illustration I 8) [Lattermann2005].

Des comparaisons entre les propriétés mécaniques des complexes os/greffe/os en fonction des moyens de fixation [Karmani2003a][Dargel2007] permettent de voir combien ils peuvent influencer sur le résultat de la ligamentoplastie. En effet, on considère que la charge maximale admissible par le complexe fixation-greffe-fixation équivaut à 50% de celle admissible par la greffe seule dans les premiers temps après l'opération [Frank1997]. On constate également souvent que le ligament de substitution offre une plage de déformation plus grande que celle du ligament d'origine à cause des mobilités qui subsistent dans le système de fixation [Dargel2007]. Ces moyens de fixation sont capables de résister à des efforts de seulement 500 à 1000 N [Unwin2010] ; ainsi, il peut paraître inutile de proposer un ligament de substitution qui dépasse cette valeur sans changer le moyen de fixation.

La prétension appliquée à la greffe lors de sa pose peut être également sujette à controverse [Frank1997], car elle peut à la fois augmenter la stabilité du genou [Andersen1997] et diminuer sa mobilité en supprimant le pied de la « toe region » présentée précédemment. De plus, le caractère viscoélastique du LCA et de ses reconstructions induisent une relaxation de cette prétension lors de cycles répétés, et/ou à un allongement du ligament qui peut à son tour diminuer la stabilité du genou [Karmani2003a][Dargel2007]. Une éventuelle torsion initiale de l'implant visant à reproduire le caractère hélicoïdal du LCA et le couple associé a également été proposée [Li2005], mais n'a pas clairement fait l'objet d'un consensus.

On notera également que l'angle de flexion du genou lors de la pose du tissu de substitution joue un rôle important dans le résultat obtenu [Butler1989][Dargel2007]. En effet, la longueur du LCA variant en fonction de l'angle de flexion du genou, sa fonction lors de mouvements physiologiques pourra être considérablement altérée suivant que l'on place le substitut du LCA à différents angles de flexion et avec différentes prétensions.

On notera enfin que des facteurs comme l'état de l'articulation avant opération (laxité, blessures

éventuelles des tissus adjacents, ...), la nature et l'intensité des pratiques du patient, ainsi que le protocole de réhabilitation adopté (immobilisation et exercices) ont évidemment leur rôle dans la réussite de la ligamentoplastie [Lewis1989]. En effet, l'intervention chirurgicale est nécessairement suivie d'une phase de rééducation dont le but principal est de récupérer l'extension et la flexion complètes du genou, de réhabiliter les muscles entourant le genou, d'encourager une démarche normale, de supprimer l'enflement de l'articulation et de restaurer la symétrie des membres inférieurs [Unwin2010]. En général, le patient opéré du LCA retrouve son activité quotidienne 3 mois après l'opération, et peut reprendre son activité sportive 6 mois après [Vieira2009]. L'importance que le patient accorde à la rééducation fonctionnelle demeure un facteur largement déterminant pour la guérison d'une telle lésion [Karmani2003a][Grinsven2010]. Des programmes de réhabilitation accélérée ont été proposés et semblent avoir des effets satisfaisants sur le retour du patient à l'activité [Frank1997][Karmani2003a], mais ne font toujours pas l'objet d'un réel consensus.

5.2.2 *Source des greffes utilisées*

L'utilisation de prothèses synthétiques a été très populaire durant les années 1980, car elle permettait un retour rapide à l'activité. Une grande variété de prothèses synthétiques a été mise sur le marché et utilisée pour le remplacement du LCA, utilisant tantôt du polytétrafluorethylène (Gore-Tex®), des polyesters (Dacron®) des fibres de carbone (Plastafil®) ou encore du polypropylène (Kennedy Ligament-Augmentation Device®) [Vunjak-Novakovic2004]. Les reconstructions par prothèses artificielles ont été néanmoins abandonnées dans leur quasi-totalité, car pouvaient se rompre ou s'allonger plastiquement par fatigue [Grood1976], mais également par fluage et par abrasion avec les angles des tunnels tibial et fémoral, ce qui créait des débris dans la synovie conduisant à plusieurs types de pathologies dégénératives. Un programme de suivi de 855 prothèses synthétiques pendant 15 ans a montré qu'entre 40% et 78% d'entre elles avaient rompu à cause des débris abrasifs, de réactions tissulaires ou de limitations mécaniques [Frank1997][Vunjak-Novakovic2004]. Néanmoins, nous pourrions noter que de récents travaux utilisant des nouvelles prothèses synthétiques « bioactives » et « biointégrables » semblent montrer des résultats intéressants à court terme sur des modèles animaux [Viateau2011].

Une allogreffe utilise un tissu humain d'origine cadavérique, pouvant provenir de différents tissus (tendon rotulien, tendon d'Achille, fascia lata... [Karmani2003a]). La quantité de tissus disponibles [Zantop2006][Petrigliano2006] et l'âge moyen des donneurs limitent l'étendue des reconstructions par allogreffe. Cependant, l'utilisation des allogreffes pour la ligamentoplastie reste courante aux États-Unis notamment [Kato2010]. La xéno greffe utilise un tissu d'origine animale

I. Etat de l'art: ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur (LCA)

pour remplacer le LCA lésé, et offre donc plus de disponibilités quant à la quantité de tissus disponibles. En revanche, l'utilisation de LCA d'origine bovine n'a pas été approuvée par la *Food and Drug Administration* (FDA) et n'est donc pas (ou plus) pratiquée [Vunjak-Novakovic2004]. De manière générale, les allogreffes et xélogreffes sont peu pratiquées car elles mènent souvent à des réactions immunitaires importantes et possèdent un risque important de transmission de maladies [Vunjak-Novakovic2004].

Face aux limites des prothèses synthétiques et des allogreffes, les interventions chirurgicales de réparation du LCA consistent à l'heure actuelle en majorité à utiliser une greffe autologue (ou autogreffe), c'est-à-dire un tissu prélevé sur le patient. La nature de ces greffes peut être principalement de trois types : le tendon rotulien (intervention de Kenneth Jones), les tendons de la patte d'oie (tendons des muscles ischiojambiers Droit Interne et Demi-Tendineux, DIDT) ou plus rarement le fascia lata (sorte de cloison fibreuse à la face externe de la cuisse) (Illustration I 9) [Frank1997][Karmani2003a]. L'intervention de Kenneth Jones, qui consiste à prélever le tiers central du tendon rotulien avec une petite barrette osseuse à chaque extrémité, est la plus largement pratiquée [Karmani2003a]. Il a été montré que les propriétés mécaniques de ce tendon, en termes de rigidité et de résistance à la rupture, dépassaient celles du LCA natif [Noyes1984][Butler1989][Karmani2003a]. L'utilisation du fascia lata ou des tendons des muscles de la patte d'oie (DIDT) semble montrer également des résultats satisfaisants [Noyes1984][Karmani2003a][Smith2009]. La greffe prélevée est généralement dédoublée (Illustration I 8), et sa boucle est maintenue par divers moyens de fixation dans le tunnel fémoral. Nous noterons également la possibilité de minimiser l'instabilité en rotation du genou due à la rupture du LCA de façon extra-articulaire (intervention de

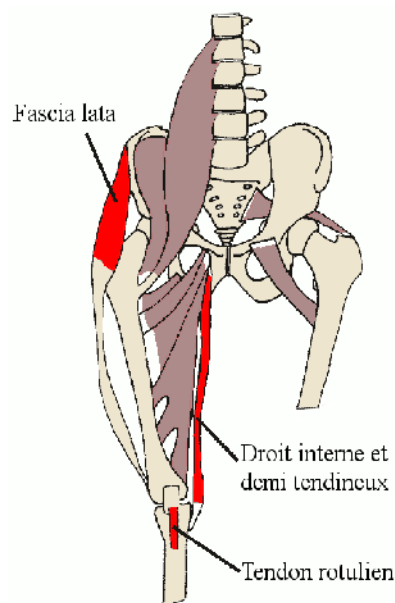


Illustration I 9: Représentation simplifiée des sources d'autogreffes les plus communément utilisées: Fascia lata, droit interne et demi-tendineux (DIDT) et tendon rotulien (intervention de Kenneth-Jones).

Lemaire), c'est-à-dire en compensant la fonction perdue du LCA par la mise en place d'un substitut de ligament à la périphérie de l'articulation ; cette intervention est cependant maintenant rarement pratiquée. Malgré les différences de propriétés mécaniques entre les différentes sources d'autogreffes, les études visant à orienter le choix du tissu de prélèvement n'ont pas réussi à trouver une supériorité significative d'une méthode sur une autre [Frank1997][Moraiti2010][Grinsven2010]. Ces autogreffes permettent, dans le meilleur des cas, une revascularisation et éventuellement une ligamentisation du tissu de remplacement impliquant un remodelage de sa structure de collagène [Karmani2003a].

5.3. Limites des pratiques actuelles et perspectives

Bien que les méthodes de reconstruction par autogreffe offrent des résultats satisfaisants à court terme, les reconstructions actuelles ne sont pas optimales en ce qui concerne les propriétés mécaniques du ligament reconstruit ou la restauration de la cinématique normale du genou [Noyes1984][Lewis1989][Li2006][Woo2006][Dargel2007][Gao2010][Moraiti2010].

Du point de vue de la cinématique, il a été montré que, pendant la marche, les mouvements d'un genou qui a subi une ligamentoplastie étaient plus proches de ceux d'un genou avec une rupture du LCA non traitée que de ceux d'un genou sain [Gao2010]. La comparaison entre des genoux cadavériques sains et les mêmes genoux sans LCA et avec un LCA reconstruit ont montré que les restrictions du tiroir antéro-postérieur et de la rotation interne étaient significativement moins assurée par la reconstruction que par le LCA natif [Li2006]. En particulier, certaines études conduisent à penser que la laxité en rotation devrait être davantage considérée [Li2005][Lattermann2005][Kato2010]. En effet, il semble que les méthodes actuelles soient satisfaisantes dans la reconstruction du faisceau AM, mais le soient moins dans celle du faisceau PL [Gabriel2004][Zantop2006][Shen2007]. Ces résultats quant à la modification de la cinématique du genou peuvent également être le résultat de la perte de la fonction proprioceptive du LCA et donc du comportement neuromusculaire de l'articulation [Moraiti2010]. Ces éléments apportent des éléments de réponse concernant l'apparition de dégénération du cartilage ou l'arthrose qui peuvent faire suite à une reconstruction du LCA [Frank1997][Li2006][Zantop2006][Gao2010]. Il a également été montré qu'une reconstruction du LCA sur un genou entraînait par compensation une modification de la cinématique du second genou [Moraiti2010]. Nous noterons que les résultats de la reconstruction sur la stabilité du genou peuvent être très variables d'une intervention à une autre [Lewis1989]. Des études de suivi à long terme ont montré que moins de 50% des patients ayant subi une lésion du LCA retournaient à leur niveau d'activité, et que les radiographies de 90% des patients montraient des dégénérescences sept ans après la reconstruction du LCA [Lattermann2005].

Il semble que les propriétés intrinsèques de l'autogreffe au moment de l'implantation ne soient pas la cause des modifications observées de la cinématique du genou. Nous soulignerons néanmoins que, même si avant l'opération les propriétés de différentes sources d'autogreffes utilisées sont proches [Noyes1984] ou supérieures [Unwin2010] à celles du LCA natif, leur prélèvement ainsi que leur fixation dans les tunnels osseux ont un rôle très néfaste sur la rigidité et la résistance à la rupture de la greffe [Dargel2007]. Ces autogreffes ont tendance à s'affaiblir après l'implantation [Butler1989][Unwin2010], en particulier à cause de nécroses tissulaires post-implantatoires [Noyes1984][Frank1997][Karmani2003a]. Ces nécroses sont notamment dues au fait que le tissu de remplacement est alimenté par l'intermédiaire du liquide synovial qui atteint difficilement l'intérieur du tissu [Vunjak-Novakovic2004].

Face à ces limites inhérentes aux moyens de reconstruction actuels, certains auteurs ont émis l'idée que la reconstruction séparée des deux faisceaux AM et PL du LCA pourrait conduire à des résultats supérieurs [Christel2005][Zantop2006][Lattermann2005][Shen2007][Hosseini2009][Bicer2010] (Illustration I 10). En effet, plusieurs auteurs évoquent la difficulté de reproduire la structure multi-faisceaux du LCA à partir d'un seul tissu [Takai1993][Mommersteeg1997][Gabriel2004] et soulèvent l'intérêt de se diriger vers des reconstructions qui reproduisent les déformations non homogènes du LCA [Hosseini2009][Bicer2010], contrairement aux protocoles classiques qui reconstruisent essentiellement le faisceau AM du LCA [Unwin2010]. Les techniques opératoires à deux faisceaux proposées dans ce sens ne cessent d'émerger (Illustration I 11, Illustration I 12) [Lattermann2005][Shen2007][Yasuda2009][Smith2009][Yasuda2010][Kato2010]

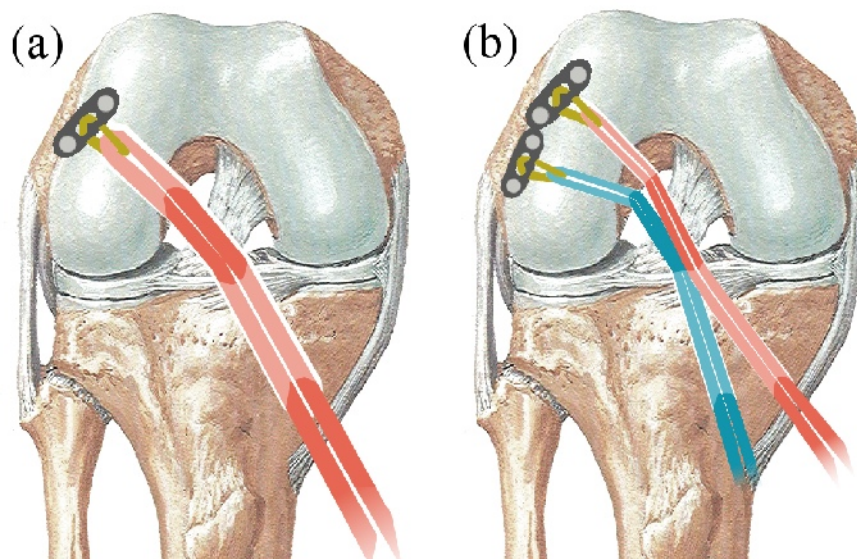


Illustration I 10: (a) Exemple de reconstruction classique mono-faisceau. (b) Exemple de reconstruction anatomique à double faisceau. Le second protocole semble permettre de mieux recouvrer la cinématique normale du genou [Smith2009][Yasuda2010][Plaweski2011]

I. Etat de l'art: ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur (LCA)

et sont désormais utilisées de façon routinière dans un nombre croissant de services [Unwin2010]. Comme le faisceau AM du LCA est plus tendu en flexion et le faisceau PL en extension, le premier faisceau est généralement posé à 45-90° de flexion et le second à 0-20° de flexion [Unwin2010] [Kato2010]. De manière à respecter plus fidèlement l'anatomie du LCA, la greffe doit être plus large pour la reconstruction du faisceau AM que pour le faisceau PL [Smith2009][Katouda2011].

Des données à long terme concernant l'issue des reconstructions à deux faisceaux ne sont, pour l'instant, que peu disponibles [Lattermann2005][Zantop2006][Shen2007][Unwin2010] [Plaweski2011], mais les premiers résultats semblent montrer une supériorité significative de la reconstruction anatomique à double faisceau sur les reconstructions classiques, en particulier pour ce qui touche au rétablissement de la cinématique du genou [Smith2009][Yasuda2010] [Plaweski2011].

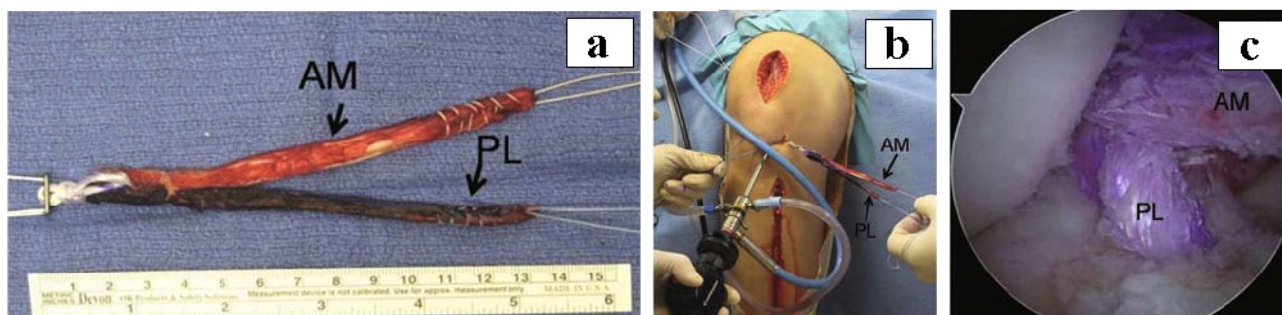


Illustration I 11: Intervention utilisant le DIDT dans le cas d'une reconstruction à double faisceau. (a) Faisceaux AM et PL utilisés: ici, une fixation unique est utilisée pour l'insertion fémorale. (b) Dispositif chirurgical lors de l'intervention (c) Vue arthroscopique durant l'intervention. Adapté de [Kato2010]

Néanmoins, dans les différents types de protocoles et de sources d'autogreffes détaillés ci-dessus, il est nécessaire de modifier des tissus sains pour réparer un tissu lésé, démarche qui n'exclut pas le risque d'obtenir deux tissus moyennement recouverts [Dargel2007]. En effet, des douleurs au niveau du site donneur apparaissent pour des reconstructions utilisant le tendon rotulien [Karmani2003a], et une atrophie du muscle ou des tendinites ne sont pas à exclure dans les mois suivant l'intervention pour les autogreffes en général, ce qui induit des périodes de réhabilitation prolongées [Vunjak-Novakovic2004]. Ces complications au niveau du site donneur constituent une limite inévitable à l'utilisation de greffes autologues.

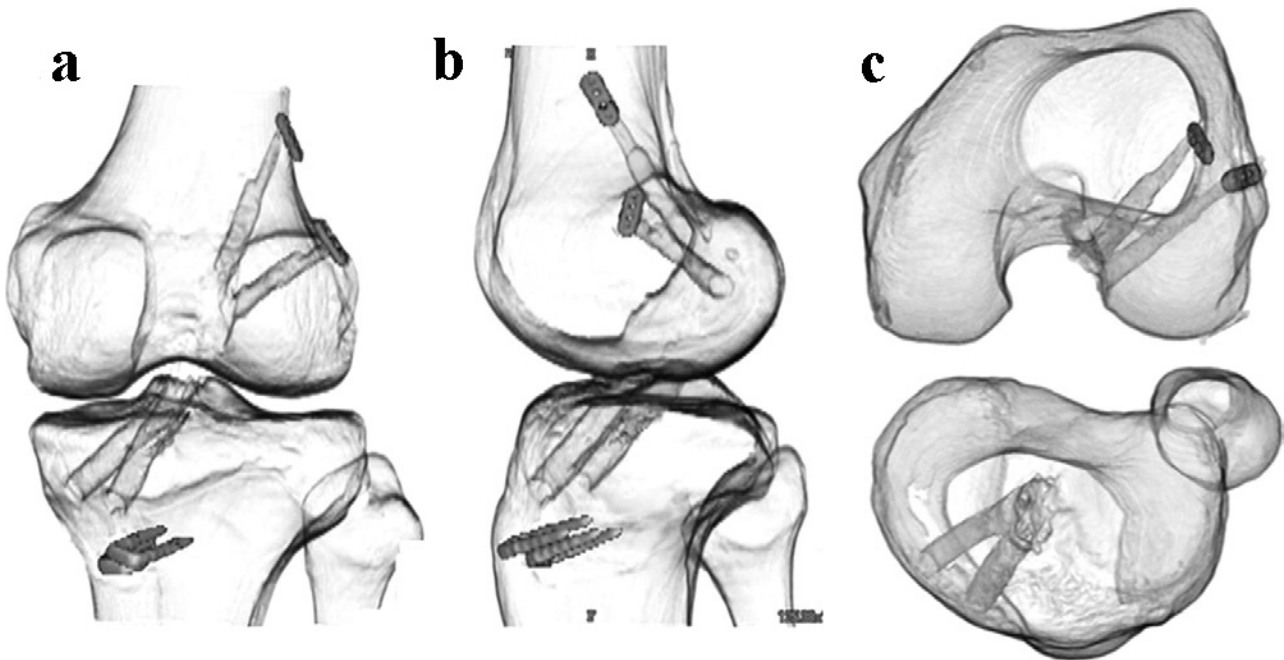


Illustration I 12: Visualisation des tunnels et des fixations d'une reconstruction à double faisceau obtenues à partir de résultats de tomographie 3D. (a) vue postérieure (b) vue sagittale (c) vue dans le plan transversal. Adapté de [Yasuda2010].

6. Ingénierie tissulaire du LCA

6.1. Historique et applications de l'ingénierie tissulaire

Il est difficile de discerner nettement les premières apparitions de l'ingénierie tissulaire, tant les domaines de recherches qui y sont impliqués sont nombreux et parfois anciens. En effet, la culture ou l'étude de l'activité des cellules, l'étude des facteurs de croissance, la chimie des polymères biodégradables et les procédés de fabrication tridimensionnels associés, la libération progressive de molécules actives, l'immunologie appliquée, la mécanique des tissus biologiques, les études biomécaniques du système articulaire ou encore les capteurs à usage biomédical et leurs applications sont autant de domaines antérieurs et/ou contemporains au concept d'ingénierie tissulaire et qui ont permis l'émergence de celui-ci. Cependant, on peut affirmer que l'apparition de l'ingénierie tissulaire est issue d'une problématique clinique : la réparation d'un organe par autogreffe pose des problèmes relatifs au site donneur, les allogreffes sont disponibles en quantité limitée et entraînent des réactions immunitaires indésirables, et enfin l'utilisation de tissus synthétiques a souvent montré des limites tant au niveau de leurs performances mécaniques que de

leur intégration dans le métabolisme.

La première utilisation « officielle » du terme d'ingénierie tissulaire est attribuée à un des pionniers de la biomécanique et de la bioingénierie, le professeur Y.C. Fung, qui proposa en 1985 d'établir des liens entre le fonctionnement des cellules qui composent les tissus biologiques et la fonction de ces tissus. La définition générale la plus largement admise de l'ingénierie tissulaire a été publiée en 1993 dans la revue *Science* par Langer et Vacanti [Langer1993]: « L'ingénierie tissulaire est un domaine interdisciplinaire qui applique les principes des sciences de l'ingénieur et du vivant dans le but de développer des substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction tissulaire d'un organe. » Les premiers domaines d'application de l'ingénierie tissulaire ont concerné la reconstruction de l'os, du cartilage, des vaisseaux sanguins ou encore de la peau, applications qui correspondaient et correspondent encore certainement aux besoins les plus importants. Les applications de l'ingénierie tissulaire à la reconstruction de la peau sont les premières à avoir donné lieu à des produits disponibles sur le marché. En effet de nombreuses entreprises (*TransCyte*[®], *Dermagraft*[®], *Apligraf*[®], ...) proposent désormais des biosubstituts de peau constitués d'une matrice biodégradable et de cellules réparatrices. Des recherches ont également abouti (ou aboutissent actuellement) à des applications cliniques en ce qui concerne la reconstruction des reins, du pancréas, du foie, de vaisseaux sanguins, d'os ou du cartilage. Les perspectives offertes par l'ingénierie tissulaire prêtent à penser que des applications à davantage de tissus verront prochainement le jour, et que leurs utilisations cliniques vont se répandre fortement durant le XXI^{ème} siècle, en raison notamment du vieillissement général de la population.

Néanmoins, au regard des fortes subventions accordées à ce domaine cette dernière décennie [Ingber2006a], nous préciserons que peu d'approches ont atteint à ce jour une application clinique, en particulier en raison de la complexité du problème et du nombre de domaines scientifiques impliqués. Nous noterons également que les cliniciens semblent assez réticents face à cette nouvelle forme de médecine, et davantage d'études animales vont être nécessaires durant les prochaines années pour améliorer son acceptation dans les blocs opératoires [Hollister2009]. L'une des limites principales à laquelle l'ingénierie tissulaire est confrontée est de savoir quelles caractéristiques du tissu initial doivent être recouvrées pour permettre un retour à une fonction physiologique « normale ». Le concept d'*ingénierie tissulaire fonctionnelle* a alors vu le jour récemment ; il vise à souligner l'importance des considérations biomécaniques lors de la phase de conception d'un biosubstitut pour une application spécifique [Ingber2006a]. C'est précisément dans ce cadre que s'inscrivent les travaux qui vont être présentés dans les prochaines sections.

6.2. Terminologie

La définition « historique » de l'ingénierie tissulaire exposée précédemment sera également adoptée dans ce mémoire. Nous noterons que les termes « ingénierie tissulaire » et « génie tissulaire » ne sont pas différents et correspondent simplement à deux traductions du terme anglais "tissue engineering". Certains auteurs ont séparé trois approches différentes de l'ingénierie tissulaire [Laurencin2005][Cheung2007] : l'utilisation de matrices de support poreuses induisant une régénération tissulaire, l'utilisation de cellules isolées cultivées préalablement *in vitro*, et l'utilisation de facteurs de croissance. Dans ce mémoire, nous définirons plutôt l'ingénierie tissulaire comme une combinaison de ces trois approches, comme de nombreux auteurs le font de manière implicite [Petrigliano2006][Kimura2008][Liao2008][Benhardt2009]. On peut reconnaître deux rôles principaux à la matrice de support dans laquelle les cellules réparatrices vont êtreensemencées : d'une part, elle doit assurer provisoirement la fonction du tissu qui est remplacé ; de l'autre, elle sert de support pour la formation d'un « néo-tissu » [Vunjak-Novakovic2004]. Par définition, cette matrice doit donc être constituée d'un biomatériau (c'est-à-dire un matériau visant à être en contact avec un tissu biologique) à la fois biodégradable et biocompatible. Par le terme « biocompatible », nous entendrons la « faculté du matériau à remplir une fonction spécifique avec une réaction appropriée du tissu hôte » [Nair2007], c'est-à-dire qu'il doit pouvoir s'intégrer dans l'organisme sans provoquer de réaction adverse. Par « biodégradable », nous entendrons la capacité du matériau à se transformer avec le temps sous l'action d'organismes biologiques en des produits assimilables par le tissu hôte sans réaction adverse. Comme nous le verrons, la structure de cette matrice, ses propriétés mécaniques ainsi que ses propriétés de dégradation détermineront largement l'activité des cellules qui y seront ensemencées, ainsi que la composition et les caractéristiques du néo-tissu qui sera créé [Vunjak-Novakovic2004]. Le terme « biosubstitut » désignera l'ensemble formé par les cellules ensemencées, la matrice extracellulaire progressivement secrétée par ces cellules et la matrice de support (ou ce qu'il en reste suivant l'état d'avancement de sa dégradation).

Les cellules régénératrices, à la base du principe de l'ingénierie cellulaire, sont sensibles à leur environnement mécanique par une série de leviers qui constituent un vaste domaine de recherche regroupé sous le terme de « mécanotransduction » ; cet aspect sera traité de façon plus détaillée par la suite. La croissance de ces cellules doit évidemment être alimentée par de nombreux éléments nutritifs ou hormonaux que l'on nommera dans toute la suite « facteurs biochimiques ». Ces facteurs sont évidemment acheminés par l'intermédiaire d'un liquide dans lequel l'intégralité du processus de croissance est effectué, et que l'on nommera « milieu de culture ». Nous appellerons « bioréacteur » l'ensemble des appareils visant à contrôler *in vitro* l'environnement mécanique, physique et biochimique de la matrice, en permettant notamment l'apport et le contrôle des facteurs biochimiques, la circulation du milieu de culture, le contrôle de la température ainsi que les

sollicitations mécaniques éventuelles [Vunjak-Novakovic2004][Petrigliano2006][Butler2009]. Le bioréacteur a donc une place cruciale dans la recherche en ingénierie tissulaire, car il est notamment -avec la matrice- à la base du contrôle des stimuli mécaniques nécessaires à la formation d'un néo-tissu [Vunjak-Novakovic2004][Jeong2008][Benhardt2009].

6.3. Intérêt pour la reconstruction du LCA et hypothèses de travail

Dans le chapitre précédent dédié au LCA et à ses moyens de reconstructions, nous avons dressé un état des limitations des moyens actuels de reconstruction. Ces limitations concernent tout d'abord des problèmes d'instabilité chronique en rotation [Li2005], problèmes qui pourraient être en partie réglés ou tout du moins atténués par des reconstructions anatomiques double faisceau [Yasuda2010]. En ce qui concerne les sources de substituts utilisés, nous avons vu que les prothèses synthétiques n'offraient pas la tenue mécanique suffisante, et que les allogreffes ou xélogreffes posaient des problèmes d'immunocompatibilité [Vunjak-Novakovic2004][Freeman2009]. Dans le cas d'autogreffes, nous avons vu qu'il existait plusieurs problèmes à long terme concernant l'appauvrissement de la tenue mécanique de la greffe [Zantop2006], notamment à cause de nécroses post-implantatoires [Karmani2003a], qui sont la conséquence d'une alimentation difficile en nutriments provenant du liquide synovial [Vunjak-Novakovic2004]. De plus, nous avons vu que l'utilisation de ce type de substitut pouvait impliquer des douleurs au niveau des sites donneurs [Karmani2003a], et que, en conclusion, les démarches actuelles n'excluaient pas la possibilité d'obtenir deux tissus (site donneur et ligament de remplacement) moyennement recouverts [Dargel2007]. Le principe de l'ingénierie tissulaire offre donc des perspectives intéressantes dans la résolution de ces limitations [Altman2002][Laurencin2005][Lu2005][Petrigliano2006][Freeman2007][Freeman2009][Fan2009].

En effet le biosubstitut, issu des principes de l'ingénierie tissulaire, permet idéalement de contourner les problèmes à long terme en donnant place progressivement à un tissu biologique semblable au tissu natif [Petrigliano2006]. Les problèmes d'immunocompatibilité sont contournés en utilisant des cellules venant du patient, et les problèmes liés au site donneur n'ont plus lieu d'exister. Ainsi, les avantages potentiels d'une reconstruction du LCA utilisant le principe de l'ingénierie tissulaire justifient l'intérêt croissant de la recherche mondiale à ce sujet et les travaux qui vont être décrits tout au long de ce mémoire, d'autant plus si l'on considère les enjeux économiques qui y sont associés.

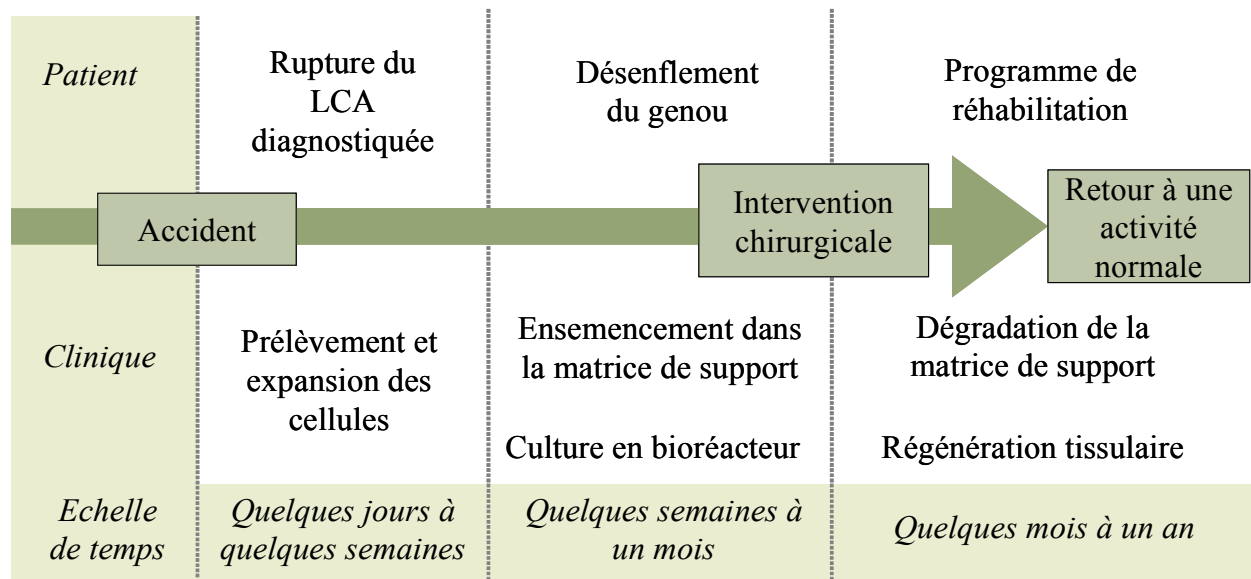


Illustration I 13: Représentation schématique des différentes étapes (au niveau du patient et à l'échelle de la clinique) et des différentes échelles de temps associées à la réparation du LCA par ingénierie tissulaire.

Face au défi scientifique que représente cette problématique, une série d'hypothèses de travail doit être dressée dès le début de ce mémoire. Nous allons tenter par la suite de proposer et de caractériser une matrice adaptée à la reconstruction du LCA par la méthodologie de l'ingénierie tissulaire. Nous ne remettons pas en cause les protocoles adoptés par les cliniciens lors de ligamentoplasties, et nous nous focaliserons donc uniquement sur la conception de matrices et de bioréacteurs adaptés au cas du LCA. Cela implique notamment que nous considérerons que les moyens de fixations classiques de substituts de LCA permettraient d'ancrer cette matrice dans les tunnels osseux de façon satisfaisante, hypothèse qui ne sera pas vérifiée dans ce travail. Le schéma d'une éventuelle réparation du LCA utilisant la matrice qui va être présentée dans ce mémoire sera le suivant (Illustration I 13): (1) une rupture du LCA est diagnostiquée chez le patient à partir des tests cliniques classiques : un prélèvement de cellules est alors effectué, par exemple au niveau de la crête iliaque dans le cas de l'utilisation de cellules souches (2) les cellules sont mises en culture, tandis que le genou blessé désenfle progressivement ; (3) les cellules sontensemencées au sein de la matrice, puis l'ensemble cellules-matrice est cultivé dans un bioréacteur pendant quelques jours ou semaines afin d'assurer une bonne adhésion cellulaire et une distribution uniforme au sein de la matrice, ainsi qu'un début de formation de tissu (4) le biosubstitut ainsi formé est utilisé en lieu et place de l'allogreffe employée durant les protocoles habituels (Illustration I 14), et la régénération tissulaire a lieu progressivement pendant la phase de réhabilitation alors que, dans le même temps, la matrice commence son processus de dégradation.

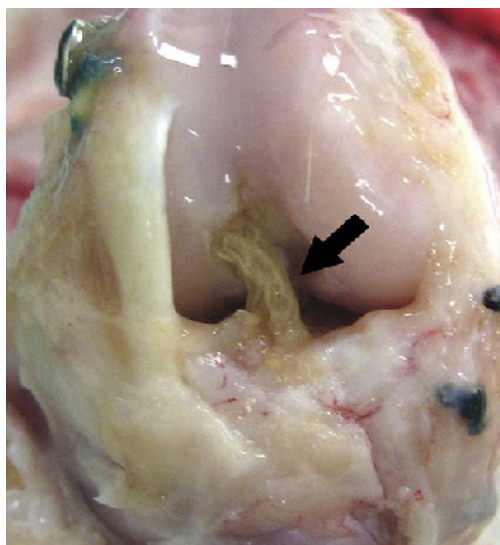


Illustration I 14: Implantation d'un biosubstitut dans un genou porcin [Fan2008].

L'hypothèse principale sur laquelle s'appuie cette démarche suppose la compensation de la dégradation de la matrice par la régénération tissulaire, de sorte que l'intégrité du néo-tissu soit conservé après l'implantation. Cette hypothèse est difficilement vérifiable sans passer par des implantations animales tant les phénomènes impliqués sont nombreux et interdépendants, implantations qui ne seront pas effectuées dans le cadre du travail présenté ici.

7. Cahier des charges pour la conception d'une matrice de support

Dans les sections suivantes, nous allons tenter de dresser un cahier des charges énonçant les principales caractéristiques que doit satisfaire une matrice adaptée à la reconstruction du LCA. Ce cahier des charges sera séparé en différentes catégories pour des raisons de clarté, mais il est essentiel de souligner que les contenus de ces catégories sont fortement liés. Une matrice adaptée devra donc nécessairement être issue d'un compromis, qui considérera à la fois l'échelle macroscopique du tissu à laquelle la matrice va devoir assurer la fonction physiologique du LCA, et l'échelle microscopique à laquelle les différentes conditions nécessaires à la formation de tissu devront être satisfaites. Il est crucial de rappeler qu'une liste exhaustive des caractéristiques que doit remplir cette matrice est loin d'être établie à ce jour [Byrne2007][Kang2010]. Les sections suivantes vont donc présenter celles qui ont été considérées comme les plus pertinentes dans le cadre de cette étude.

7.1. Considérations biologiques et biochimiques

Dans un premier temps, une matrice adaptée à la réparation du LCA doit être biocompatible et limiter le risque de transmission de maladies et d'infection. Nous devons donc notamment nous assurer qu'aucune trace de produits toxiques ne provienne de sa fabrication, de son stockage ou de son conditionnement. La matrice doit être aisément stérilisable [Almeida2010], soit par passage à l'autoclave, soit par passage à l'alcool ou à diverses sources de rayonnement. Elle doit être également biodégradable, et les produits issus de sa dégradation doivent être facilement assimilés par le métabolisme [Kwon2005][Cheung2007][Jones2007][Almeida2010]. Idéalement, la matrice doit se dégrader à une vitesse qui correspond à celle de la régénération tissulaire afin d'assurer une stabilité suffisante pendant la période de transition [Butler2000][Vunjak-Novakovic2004][Laurencin2005][Lu2005][Liu2008][Liao2008][Benhardt2009][Fedorovich2011]. Cependant, cette vitesse de dégradation idéale est difficile à fixer dans la mesure où elle dépend de la vitesse de formation de tissu, qui à son tour dépend de la microstructure et de la composition de la matrice. La formation de tissu et la dégradation de la matrice sont donc fortement corrélées, d'autant plus que la formation d'une couche de néo-tissu sur la matrice peut empêcher ou réduire sa dégradation [Sanz-Herrera2010]. De plus, la caractérisation *in vitro* de la dégradation de diverses matrices n'est pas nécessairement représentative de leurs véritables propriétés de dégradation lorsqu'elles sont implantées, et une caractérisation *in vivo* est souvent nécessaire [Fan2008]. Par exemple, la biodégradation de plusieurs biomatériaux fréquemment utilisés peuvent induire une réduction locale du pH impliquant des effets négatifs sur le métabolisme [Cheung2007][Li2011], effets qui sont difficiles à reproduire *in vitro*. Il a été montré que des vitesses de dégradation trop rapides pouvaient avoir un effet très négatif sur la régénération tissulaire [Sanz-Herrera2009]. Il sera donc considéré ici que la formation d'un néo-tissu est un processus long, et que des vitesses de dégradation très lentes doivent donc être privilégiées.

Le matériau constitutif de la matrice doit idéalement attirer les cellules et faciliter leur adhésion, leur motilité et leur prolifération, ce qui implique des propriétés de surfaces appropriées [Sengers2007][Leong2008][Park2009][Almeida2010]. En particulier, l'enrobage du biomatériau par certaines protéines peut être vu comme une bonne solution pour améliorer ces propriétés de surface [Leong2008]. Nous soulignerons également que la capacité du biomatériau à délivrer progressivement des éléments actifs notamment par l'encapsulation de diverses protéines offre des perspectives très intéressantes [Hollister2007][Hollister2009][Owen2010], en particulier pour limiter la réponse inflammatoire qui suit l'implantation [Lacroix2009]. Cependant, l'enrobage de la surface du matériau et l'encapsulation d'agents actifs ne seront pas traités dans les présents travaux, mais en constitueront l'une des perspectives les plus prometteuses.

7.2. Considérations biomécaniques à l'échelle cellulaire

Les cellules au sein du métabolisme sont constamment sujettes à des stimuli mécaniques qui sont dus à des sollicitations physiologiques du tissu sur lesquelles elles sont ancrées, qui peuvent provenir d'efforts imposés au tissu (dans le cas de l'os par exemple), de flux de cisaillement (parois des vaisseaux sanguins), ou de déplacements (cas du ligament). Ces stimuli mécaniques sont traduits par les cellules en réponses biochimiques, par le biais de mécanismes complexes de mécanotransduction [Ingber2006][Chen2008]. Ces procédés mécanobiologiques sont supposés rendre les tissus adaptés à leur fonction : par exemple, si une rigidité accrue du substrat résulte en des déformations plus faibles ressenties par les cellules (donc la sollicitation est contrôlée en effort et non en déplacement), on se dirigera plutôt vers de l'os, sinon vers un tissu mou [Lacroix2002a][Prendergast2007]. De nombreuses études expérimentales ont notamment montré que l'environnement mécanique de la cellule avait une influence sur sa forme et sa direction de migration privilégiée [Raeber2008], la composition de la matrice extracellulaire sécrétée [Altman2002a][Chiquet2003], leur différenciation [Altman2002a] et leur prolifération [Webb2006]. On comprendra donc que le simple fait d'ensemencer des cellules dans une matrice poreuse n'est pas suffisant pour obtenir la formation du tissu souhaité [Tsang2004], mais qu'un environnement micro-mécanique spécifique est également requis. En revanche, l'amplitude idéale de ces stimuli mécaniques ainsi que leur fréquence ou leur direction n'ont pas été clairement établies, et il est d'autant plus difficile d'établir un consensus que la réponse des cellules varie beaucoup en fonction des individus [Prendergast2007]. Un état des lieux complet des connaissances en mécanotransduction sortirait du cadre de ce mémoire et ne sera pas présenté ici ; en revanche, nous allons ci-après en présenter quelques notions qui seront utiles pour la suite.

De nombreux mécanismes sont impliqués lors de la sollicitation dynamique d'une matrice ensemencée de cellules, et il est généralement très difficile de les séparer expérimentalement [Sengers2007]. Ainsi, de nombreuses études ont rapporté des résultats contradictoires concernant, par exemple, les contraintes de cisaillement à imposer pour stimuler l'activité biologique : tandis que certains préconisent des contraintes de cisaillement supérieures à 0,5Pa [Bakker2001][McGarry2005], d'autres suggèrent que des contraintes supérieures à 5mPa ont un effet négatif sur la viabilité cellulaire [Milan2009]. Cela peut être dû à des différences concernant le protocole expérimental utilisé [Olivares2009], mais met également en exergue la méconnaissance de l'ensemble des mécanismes impliqués et le besoin de compléter la compréhension actuelle avec davantage de données expérimentales et de modèles théoriques. En ce qui concerne la différenciation cellulaire, plusieurs auteurs ont proposé des modèles de mécanorégulation visant à prédire vers quel phénotype cellulaire allait se diriger une cellule souche soumise à un environnement cellulaire donné. Ces modèles ont été comparés et confrontés à des observations *in*

vivo [Isaksson2006] en particulier dans le cas de la fracture osseuse, où l'environnement mécanique joue un rôle important dans les différentes étapes de différenciation qui se succèdent [Lacroix2002a] [Isaksson2006a]. Sans détailler le contenu de ces modèles, nous noterons que de nombreuses études récentes se basent sur le travail de *Prendergast et al.* [Prendergast1997] qui a formulé les stimuli mécaniques comme une combinaison de la déformation octaédrique et de la contrainte de cisaillement due au flux [Sandino2011] ou de la vitesse du flux [Lacroix2002][Byrne2007] [Olivares2009][Milan2010][Chen2011a], ces deux grandeurs étant liées dans le cas de fluides newtoniens. En effet, il a été montré que la déformation octaédrique était généralement supérieure à la déformation principale et représentait davantage la distorsion ressentie *a priori* par la cellule [Lacroix2006]. Nous rappellerons que la déformation octaédrique ε_{octa} s'exprime de la façon suivante [Olivares2009]:

$$\varepsilon_{octa} = \frac{2}{3} \sqrt{(\varepsilon_I - \varepsilon_{II})^2 + (\varepsilon_{II} - \varepsilon_{III})^2 + (\varepsilon_{III} - \varepsilon_I)^2} \quad (1)$$

avec ε_I , ε_{II} et ε_{III} les trois déformations principales. Il s'agit donc d'une déformation équivalente au sens de Von Mises. Ainsi, suivant ces deux sources de stimuli considérées comme représentatives de l'environnement micro-mécanique, on peut formuler une estimation de l'orientation cellulaire qui sera préférée localement (Illustration I 15). En comparant numériquement différents modèles de mécanorégulation dans le cas de la réparation d'une fracture d'un os long soumis à un chargement axial [Lacroix2002] et à de la torsion [Isaksson2006], il a été montré que la déformation octaédrique était le signal mécanique le plus significatif [Isaksson2006][Isaksson2006a], et que le modèle utilisant la déformation octaédrique ainsi que la vitesse du flux offrait les résultats les plus proches

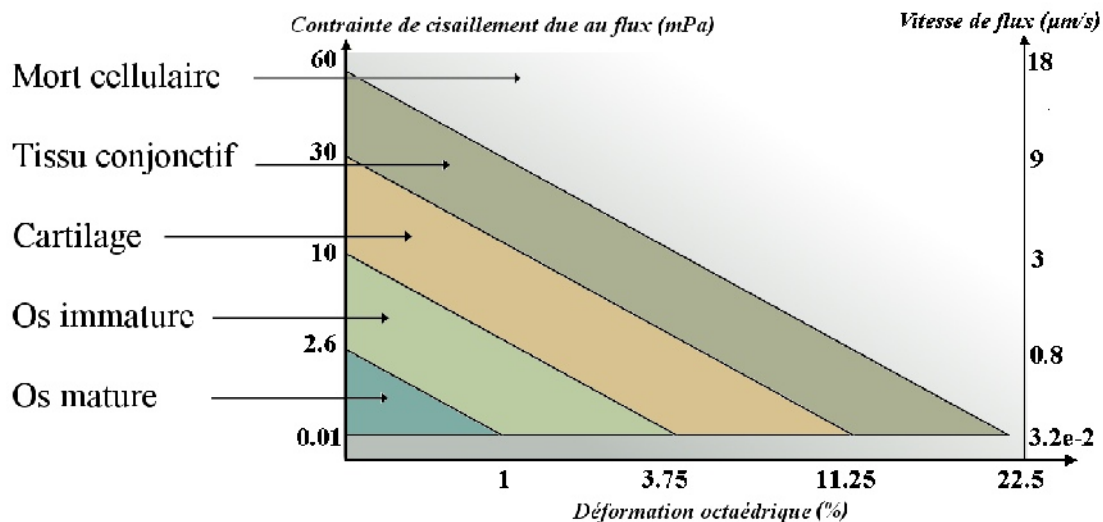


Illustration I 15: Modèle de mécanorégulation adapté de [Prendergast1997]. L'environnement local représenté par une combinaison de la déformation octaédrique et de l'écoulement permet de prédire vers quel phénotype cellulaire les cellules vont s'orienter.

des données expérimentales [Lacroix2002a]. Nous noterons néanmoins qu'aucun des algorithmes alors testés n'est parvenu à reproduire de façon exacte l'enchaînement des étapes de différenciation observées lors de la réparation d'une fracture.

Les sollicitations macroscopiques à l'origine de ces stimuli mécaniques peuvent être imposées soit *in vivo* par la fonction physiologique du tissu, soit *in vitro* par l'intermédiaire d'un bioréacteur [Sengers2007]. Dans le second cas, des sollicitations mécaniques dynamiques imposées à la matrice ont l'avantage de générer à la fois des déformations du substrat et un mouvement de l'environnement fluide, le second étant ajustable en faisant varier la vitesse de déformation [Milan2009]. L'intérêt d'un bioréacteur dynamique pouvant soumettre la matrice à des cycles de chargement répétés a donc été soulevé, en particulier dans le cas de l'ingénierie tissulaire du LCA, dans la mesure où il a été montré que des déformations cycliques avaient un effet positif sur la prolifération des fibroblastes et la production de matrice extracellulaire associée [Webb2006]. Les différents aspects qui touchent au bioréacteur seront traités dans une section ultérieure (IV.4.1.).

En résumé, nous noterons que les stimuli mécaniques locaux ont un effet avéré sur l'activité cellulaire et peuvent être influencés par les propriétés du matériau constitutif de la matrice, sa microstructure, la localisation des cellules au sein de cette matrice, et évidemment par les caractéristiques des sollicitations mécaniques et des conditions de flux imposées à l'échelle macroscopique [Sandino2011]. La culture des cellulesensemencées dans la matrice sous un environnement maîtrisé, c'est-à-dire en bioréacteur, s'avère donc nécessaire pour comprendre et éventuellement contrôler ces réponses biologiques. Même s'il est difficile d'intégrer directement ces aspects micro-mécaniques dans la phase de conception d'une matrice adaptée à la réparation du LCA, il sera intéressant de pouvoir les quantifier et de concevoir un bioréacteur adapté permettant d'imposer à l'échelle macroscopique les conditions de culture optimales pour fournir aux cellules un environnement micro-mécanique adapté. Nous préciserons que les propriétés intrinsèques du matériau qui constitue cette matrice ont également une nette influence sur l'activité cellulaire, car les cellules génèrent des forces (appelées contractiles) qui leur permettent de sonder leur substrat et d'adapter leur réponse en conséquence [Lo2000][Discher2005] en dehors des stimuli mécaniques qui leur sont imposés.

7.3. Considérations biomécaniques à l'échelle articulaire

Nous avons évoqué dans la section précédente quelques aspects mécaniques à l'échelle de la cellule qui peuvent avoir une influence sur la régénération tissulaire et donc sur la réussite d'une approche d'ingénierie tissulaire. Or, la matrice ne doit pas seulement permettre cette régénération tissulaire, mais doit aussi se substituer au tissu natif et remplir sa fonction physiologique durant la

période de transition qui va suivre son implantation. De nombreux auteurs en déduisent donc que les propriétés mécaniques de la matrice idéale au moment de l'implantation doivent être au plus proche de celles du LCA natif [Altman2002][Laurencin2005][Freeman2007][Freeman2009]. Dans ce mémoire, nous considérerons que l'ambition de la solution proposée n'est pas de régénérer un tissu identique au LCA natif, mais consiste à proposer une solution capable de remplir sa fonction lors d'une activité physiologique normale : cela constitue la base du concept d'ingénierie tissulaire *fonctionnelle*. Il semble en effet plus réaliste dans un premier temps de prétendre proposer un tissu compatible avec les sollicitations physiologiques imposées au LCA lors des activités de réhabilitation, plutôt que de concevoir une matrice capable de supporter des charges supérieures à 2000 N comme cela peut être le cas pour un LCA natif jeune [Karmani2003]. En outre, l'ancrage réalisé à travers les moyens de fixations actuellement disponibles est capable de supporter des efforts compris uniquement entre 600 et 800 N [Dargel2007], et il peut paraître ainsi inutile que la charge à rupture de la matrice dépasse cette limite.

La question ici est de déterminer quelles propriétés mécaniques du LCA doivent être considérées en priorité dans ce cahier des charges, et dans quelle mesure elles doivent être approchées [Butler2000]. Dans notre cas, nous allons privilégier les propriétés de rigidité, de non-linéarité (convexité de la courbe de réponse en traction) et de déformation d'entrée en plasticité. En effet, la rigidité du LCA lui permet de restreindre le déplacement relatif entre le tibia et le fémur, et elle doit être respectée : une matrice trop peu rigide entraînerait une instabilité de l'articulation, et une matrice trop rigide pourrait avoir des conséquences négatives sur la souplesse de l'articulation et les tissus alentours qui ne seraient pas assez sollicités. Comme nous l'avons observé dans le Tableau I 2, les valeurs rapportées pour la rigidité du LCA natif varient entre 120 et 250 N/mm. La convexité de la courbe de réponse présentée précédemment doit être également respectée de manière à assurer une mobilité suffisante de l'articulation et à limiter les sollicitations en fatigue et en fluage appliquées à la matrice [Laurencin2005]. Cela dit, la plage de déformation *fonctionnelle* de la « toe region » qui doit être reproduite ici est difficile à déterminer ; pour un LCA natif, nous savons cependant que cette valeur est comprise entre 1.5 et 4% [Karmani2003]. La matrice proposée doit évidemment supporter les déformations physiologiques quotidiennes de façon réversible : une déformation plastique de la matrice conduirait en effet à une laxité excessive de l'articulation [Vieira2009]. Nous soulignerons ici que le chargement à rupture de la matrice ne sera pas considérée comme essentiel dans un premier temps : les sollicitations imposées au niveau du LCA étant considérées comme contrôlées en déplacement et non en effort, la charge supportée par le LCA sera vue comme une conséquence de la déformation imposée en rapport à la rigidité du tissu. La rigidité en torsion du LCA peut également être vue comme une caractéristique importante dans la restauration de la stabilité en rotation de l'articulation ; les données expérimentales à ce

niveau sont néanmoins quasiment inexistantes. Nous pourrions donc nous limiter à préférer des valeurs élevées de rigidité en rotation.

La réponse mécanique du néo-tissu va être naturellement amenée à varier dans le temps, et il est donc crucial de rappeler que même si cette réponse est adaptée au moment de l'implantation, elle ne le sera pas nécessairement après quelques semaines d'implantation suivant que la formation du tissu aura suffisamment compensé la dégradation du matériau. Comme souligné précédemment, il est cependant difficile de prédire cette évolution tant les phénomènes impliqués sont nombreux et corrélés, et des essais *in vitro* et *in vivo* répétés seront donc nécessaires avant toute utilisation clinique. Enfin, même si la matrice proposée pourra montrer des propriétés viscoélastiques, elles ne seront pas comparées dans ce travail à celles du LCA natif. Nous nous contenterons de souligner que pour une application clinique, il sera nécessaire d'évaluer les caractéristiques de la matrice en fatigue et en fluage cyclique, en considérant par exemple 500 000 cycles de déformation de 2 à 3% à 1.6 Hz correspondant à l'exercice d'une marche rapide pendant une période de réhabilitation de 6 mois [Vieira2009].

7.4. Considérations morphologiques

La morphologie de la matrice proposée doit permettre aux cellules de migrer, de proliférer et d'être alimentées, ce qui implique une structure hautement poreuse [Vunjak-Novakovic2004] [Laurencin2005]. De plus, les vaisseaux sanguins responsables de la nutrition des tissus seront absents lors de l'implantation de la matrice dans l'articulation. La microstructure de la matrice doit donc permettre à la fois aux nutriments d'atteindre les cellules et aux déchets de biodégradation d'être évacués [Laurencin2005][Petrigliano2006][Melchels2010], ce qui implique que l'interconnectivité des pores ainsi que leur accessibilité de la surface de la matrice vers son cœur sont donc également des critères essentiels à prendre en considération. Cette interconnectivité des pores a d'ailleurs été significativement corrélée à la croissance de tissu dans plusieurs études [Jones2009][Lee2010]. Même si une porosité élevée et une large taille de pores paraît souhaitable, notamment pour la vascularisation du néo-tissu [Milan2009][Fedorovich2011], la matrice doit également présenter une surface suffisante pour l'adhésion des cellules et doit posséder des propriétés mécaniques suffisantes, ce qui implique une limite haute de porosité [Murphy2010]. Bien que la taille de pores idéale n'ait pas été encore véritablement sujette à consensus [Fierz2008], plusieurs études ont considéré qu'elle doit être « supérieure à 200-250 μm » pour la croissance des tissus mous [Cooper2005][Laurencin2005][Freeman2009]. Il a été montré que cette taille de pores était plus déterminante que la porosité effective de la matrice sur la régénération tissulaire [Sanz-Herrera2009]. Il sera utile de remarquer que lorsqu'il est soumis à des chargements, le réseau

poreux d'une matrice à tendance à se "refermer", le diamètre des pores ayant tendance à devenir ainsi plus petit que le diamètre mesuré au repos [Chen2008a]. De plus, même si la plupart des matrices proposées dans la littérature offrent une population de taille de pores quasiment homogène notamment à cause du procédé utilisé [Khoda2011], des gradients dans la microstructure peuvent être avantageux et sont d'ailleurs présents dans la plupart des tissus biologiques natifs [Leong2008] [Sudarmadji2011]. De tels gradients peuvent notamment permettre de limiter l'obstruction des pores situées en périphérie de la matrice due à une prolifération accrue des cellules [Sengers2007] [Chan2010][Chung2010][Murphy2010][Ahn2010].

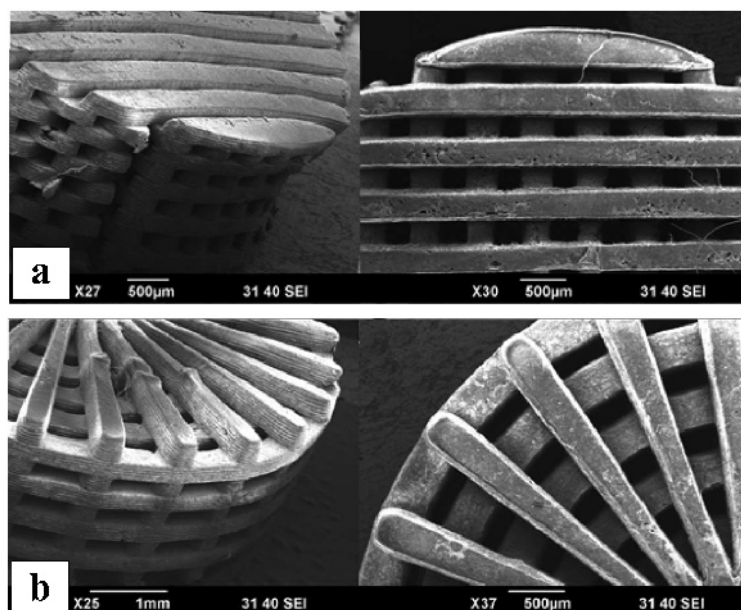


Illustration I 16: Exemples de matrices possédant (a) une taille de pores homogène et (b) un gradient de taille de pores du centre à la périphérie de la matrice. Il a été montré que la viabilité et la prolifération était supérieures dans le second cas [Ahn2010]. Adapté de [Ahn2010].

On notera que l'insertion de canaux au sein de la matrice a souvent été utilisée afin de provoquer la revascularisation du néo-tissu [Silva2006][Jiankang2007][Becker2009] [Melchels2010b] ou d'orienter la migration et la prolifération cellulaires [Leclerc2006]. Enfin, la dégradation de la matrice peut être considérablement influencée par sa morphologie, dans la mesure où les produits de la dégradation peuvent à leur tour accroître la vitesse de dégradation de la matrice, si sa morphologie ne permet pas à ces déchets d'être évacués [Chen2011a].

7.5. Considérations cliniques

Afin de se diriger vers une solution pertinente pour le remplacement du LCA, il est nécessaire

de considérer le contexte clinique dans lequel doit s'inscrire le substitut de LCA proposé dès le début de la phase de conception de la matrice. En particulier, nous pouvons noter la nécessité de ne pas trop s'éloigner du protocole opératoire connu et maîtrisé par les chirurgiens orthopédistes, de manière à s'assurer que la solution proposée pourrait être adoptée par les praticiens [Vunjak-Novakovic2004]. La matrice proposée doit être susceptible d'admettre une production à grande échelle, d'être stockée et acheminée facilement jusqu'au bloc opératoire, et d'être manipulée facilement par le praticien [Butler2000]. Comme nous l'avons vu précédemment, nous considérerons ici que l'ancrage de la matrice dans l'articulation se fera suivant les protocoles habituels : nous veillerons donc à offrir une longueur suffisante en supplément de la longueur anatomique du LCA. De plus, sur le plan morphologique, les dimensions de la matrice (ou les dimensions des deux matrices dans le cas d'une reconstruction double faisceau) doivent être compatibles avec l'espace disponible dans l'articulation.

8. État de l'art :matériaux et architectures

8.1. Etat de l'art : matériaux utilisés

De nombreux matériaux peuvent constituer des candidats potentiels pour l'ingénierie tissulaire. En particulier, des matériaux à base d'hydrogels (particulièrement le gel d'alginate [Nair2007] [Tritz2010]) ont été utilisés pour certaines applications en ingénierie tissulaire, notamment grâce à leur capacité de remplir des espaces de forme irrégulière [Ma2004]. Cependant, nous nous intéresserons ici à des matériaux susceptibles d'être mis en forme sous forme de fibres, qui permettront (comme nous le verrons ultérieurement) de reproduire davantage la grande rigidité du LCA dans la direction longitudinale [Horan2006]. Ces matériaux peuvent être classifiés en deux principaux groupes : les matériaux naturels d'une part, et synthétiques d'autre part [Liao2008].

8.1.1 *Matériaux naturels*

La soie peut constituer un candidat potentiel dans le choix d'un matériau naturel [Altman2002] [Fan2008][Liu2008][Chen2008a]. Elle présente des propriétés mécaniques élevées, un coût relativement faible et de faibles vitesses de dégradation [Vunjak-Novakovic2004][Liu2008] [Chen2008a] par le biais d'un processus de dégradation enzymatique [Ma2004]. Cela dit, une certaine cytotoxicité des fibres de soie constitue une limite certaine à son utilisation [Ma2004]. La sérécine, molécule potentiellement allergène, doit en être extraite avant son utilisation clinique [Altman2002][Vunjak-Novakovic2004][Liu2008][Chen2008a]. Des études ont rapporté que des

matrices en soie permettaient une bonne adhésion et prolifération cellulaires [Liu2008] ainsi que la synthèse de collagène et la différenciation vers un phénotype fibroblastique dans le cas d'une culture dynamique [Petrigliano2006]. Dans ce même groupe des matériaux naturels, le collagène (principal protéine de la matrice extracellulaire [Nair2007]) est un candidat évident et largement utilisé en ingénierie tissulaire [Liao2008]. Des fibres de collagène de type I purifiées d'origine animale ont été utilisées, et leur capacité à induire l'adhésion et la prolifération cellulaire ainsi que la déposition de matrice extracellulaire a été démontrée [Vunjak-Novakovic2004][Petrigliano2006][Chen2008a][Nirmalanandhan2008]. Cependant, les risques de réactions immunitaires et de transmission de maladies associées à l'utilisation de fibres de collagènes [Cheung2007][Liao2008], ainsi que leur vitesse de dégradation rapide, constituent des limites certaines à l'utilisation de ce matériau [Ma2004][Liao2008][Liu2008a][Vieira2009]. De plus, les propriétés mécaniques de ces fibres ne sont pas suffisantes pour supporter les charges répétées durant la phase de formation du néo-tissu, et leur utilisation dans l'ingénierie tissulaire du LCA est donc néanmoins limitée [Vunjak-Novakovic2004][Petrigliano2006][Fisher2007]. Ainsi, le collagène a été combiné à l'élastine [Daamen2005] et à la soie [Chen2008a], et les matrices correspondantes ont été évaluées en termes de biocompatibilité et biodégradation et ont montré des résultats satisfaisants. Nous noterons enfin parmi ces matériaux naturels certains polysaccharides comme l'alginate ou le chitosane [Ma2004] qui sont parfois utilisés, mais leur faible tenue mécanique tend à ne pas les privilégier dans le cas de l'ingénierie tissulaire du LCA.

8.1.2 Matériaux synthétiques

Face à ces matériaux à base de soie ou de collagène, des polymères biodégradables synthétiques ont été rapidement envisagés pour leur application dans l'ingénierie tissulaire du ligament, notamment grâce à la possibilité d'en contrôler la dégradation ou les propriétés mécaniques [Petrigliano2006][Freeman2009] et également grâce à leur reproductibilité [Cheung2007]. De plus, leur approvisionnement est (*a priori*) illimité, et ils ne montrent pas de risque de transmission de maladie [Freeman2009]. La dégradation en général hydrolytique des polymères synthétiques, en opposition avec la dégradation enzymatique des polymères naturels, varie moins en fonction du patient et du site d'implantation car elle dépend dans une moindre mesure des éléments biochimiques présents [Nair2007][Cheung2007]. Particulièrement, dans la famille des polyesters aliphatiques, l'acide polyglycolique (PGA) [Lu2005] et l'acide polylactique (PLA) [Laurencin2005][Lu2005][Puk2005][Kimura2008], ainsi que leur copolymère l'acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) [Cooper2005][Lu2005] sont probablement les plus utilisés dans l'ingénierie tissulaire [Ma2004]. Ces polymères se dégradent par hydrolyse de leurs liaisons esters [Chen2003][Ma2004][Nair2007], qui se traduit en une scission de la chaîne polymère en

généralant un acide et un alcool tous deux assimilables par l'organisme [Nair2007][Liu2008a]. Nous noterons que l'acide polylactique est disponible sous deux formes, l'acide poly(L-lactique) (PLLA) et l'acide poly(D-lactique) (PDLA), respectivement cristallin et amorphe [Hiljanen-Vainio1995]. Même si le second a parfois été utilisé seul ou associé à d'autres polymères [Meek2009], il présente une vitesse de dégradation plus rapide et il offre une moins bonne biocompatibilité que le premier [Liao2008] ainsi que des propriétés mécaniques plus faibles [Nair2007]. Ainsi, dans toute la suite de cette étude, l'abréviation PLA désignera en fait le PLLA. Le caractère relativement hydrophile du PGA résulte en une dégradation très rapide dans les milieux aqueux (perte de l'intégrité mécanique en deux à quatre semaines) [Anderson1997][Ma2004][Lu2005]. Le PGA semble donc montrer une dégradation trop rapide pour son utilisation dans l'ingénierie tissulaire du LCA [Lu2005]; en revanche, cette dégradation rapide ainsi que ses bonnes propriétés mécaniques initiales ($E \approx 12.5$ GPa) et sa biocompatibilité en font un matériau bien adapté à du fil de suture [Nair2007]. Le PLA quant à lui est hydrophobe, et ainsi montre un processus d'hydrolyse beaucoup plus lent que le PGA [Ma2004][Petrigliano2006][Nair2007][Liao2008], avec un temps de dégradation entre 1 et 2 ans [Cheung2007]. Si cette hydrophobicité peut être un avantage en ce qui concerne la vitesse de dégradation, nous verrons par la suite que cela peut s'avérer contraignant pour l'ensemencement des cellules. Le PLA est rigide ($E \approx 4.8$ GPa [Nair2007]) mais fragile [Chen2003][Kwon2005][Lopez-Rodriguez2006][Vilay2009], ce qui peut présenter un inconvénient de taille pour son utilisation dans un tissu ligamenteux qui doit pouvoir se déformer. En revanche, le PLA est très adapté notamment à la fabrication de divers matériels de fixation orthopédiques [Nair2007][Cheung2007]. Le PLGA issu de l'association du PGA et du PLA permet d'obtenir des vitesses de dégradation intermédiaires entre celles du PGA et du PLA, vitesses de dégradation qui dépendent de la proportion de chacun de ces constituants [Ma2004][Nair2007][Liao2008]. Il est également largement utilisé notamment pour du fil de suture (Vicryl®, Panacryl®,...)[Nair2007]. Il a été montré qu'une prolifération cellulaire était observée sur des matrices constituées de fibres de PLA [Laurencin2005][Lu2005], de PGA [Lu2005] et de PLGA [Cooper2005][Lu2005]. Cependant, même si les produits de dégradation de ces polyesters sont bien assimilés par le corps humain, ils n'en restent pas moins pour autant des acides qui tendent donc à faire augmenter le pH de la zone entourant la matrice [Liu2008a]. Cette augmentation locale du pH qui résulte de la dégradation du PLA a tendance à accélérer le processus de dégradation et à provoquer des réactions immunitaires [Cheung2007][Vieira2009]. Un autre polyester aliphatique, le poly- ϵ -caprolactone (PCL), est également largement utilisé [Oh2007] ; il présente des vitesses de dégradation nettement plus faibles que le PGA et le PLA [Chen2003][Ma2004][Cheung2007][Vieira2009], il offre un comportement mécanique caoutchoutique [Kwon2005] et une excellente biocompatibilité [Nair2007]. La vitesse de dégradation très lente du PCL est notamment mise à profit pour délivrer progressivement des substances dans l'organisme, dans le cas des produits contraceptifs par

exemple [Nair2007]. Le PCL est peu résistant (contrainte maximale ≈ 23 MPa) mais extrêmement déformable (déformation à rupture $>700\%$) [Nair2007].

Enfin, l'association du PCL et du PLA peuvent former le copolymère nommé co(poly-lactide- ϵ -caprolactone) (PLCL) qui a également été utilisé pour l'ingénierie tissulaire [Jeong2008]. Cette association du PLA et du PCL permet notamment de diminuer la température de transition vitreuse du matériau [Lu2008] et permet ainsi d'obtenir un matériau plus mou et flexible que le PLA seul et plus rigide que le PCL seul [Hiljanen-Vainio1995][Chen2003][Kwon2005][Melchels2010].

L'ajout de PCL permet également de diminuer l'augmentation locale de pH induite par la dégradation du PLA [Liao2008][Vieira2009]. Enfin, suivant les proportions de PLA et PCL, les propriétés de dégradation, l'hydrophilicité et les caractéristiques mécaniques peuvent être ajustées [Kwon2005][Liao2008][Lu2008]. Notamment, l'allongement à rupture et la contrainte maximale peuvent respectivement être multipliés par un facteur 5 et divisé par un facteur 2 lorsque la proportion de PCL varie de 10 à 40% dans le PLCL [Lu2008]. Il en est de même pour la dégradation du matériau : la perte de masse du PLCL passe de 35% à 5% en 200 jours lorsque le pourcentage de caprolactone passe de 60% à 90% [Lu2008]. Les deux polymères PCL et PLA ont également été caractérisés lorsqu'ils sont associés sous la forme d'un mélange et non d'un copolymère [Chen2003][Lopez-Rodriguez2006][Simoes2009][Vilay2009], ce qui implique des propriétés différentes mais toujours très dépendantes de la proportion des deux composants dans le matériau final. En effet, comme pour le cas du copolymère PLCL, l'ajout de PCL au PLA a tendance à diminuer sa rigidité et à augmenter sa ductilité [Chen2003][Lopez-Rodriguez2006][Simoes2009][Vilay2009]. La biocompatibilité [Jeong2004] et la dégradation *in vitro* et *in vivo* [Jeong2004a] (implantation sous-cutanée dans un modèle de souris) de matrices en P(LL50/CL50) ont été étudiées. Il a notamment été montré que la dégradation *in vivo*, bien que plus rapide que la dégradation *in vitro*, était néanmoins relativement lente avec moins de 20% de perte de masse *in vivo* en 15 semaines contre 5% *in vitro*. Au passage, nous soulignerons la notation qui sera utilisée dans toute la suite : le matériau noté P(LL x /CL y) désignera un copolymère contenant $x\%$ de PLLA et $y\%$ de PCL. Enfin, le PLCL offre une récupération élastique complète lors d'essais mécaniques cycliques [Jeong2004][Jeong2004a], ce qui le rend compatible avec une culture dynamique en bioréacteur. Certains effets de mémoire de forme du PLCL ont également été observés [Lu2008]. Nous noterons enfin que le PLCL semble montrer une post-cristallisation, car sa rigidité a tendance à augmenter dans les semaines qui suivent la synthèse du matériau [Hiljanen-Vainio1995].

Les polymères cités ci-dessus, dont la structure de certains est représentée Illustration I 17, ont été approuvés pour certaines applications cliniques humaines par la *Food and Drug Administration* (FDA) [Ma2004][Lu2005][Liao2008], organisme qui fait office de référence en matière de réglementation de l'usage de matériaux pour le biomédical.

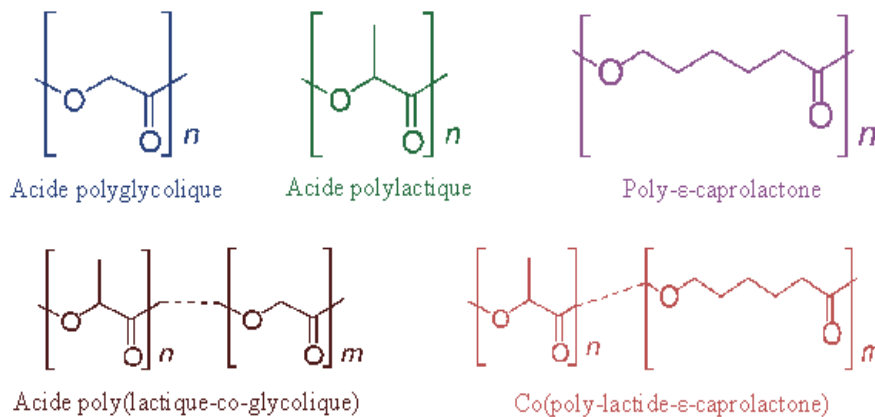


Illustration I 17: Structures des quelques polymères synthétiques couramment utilisés en ingénierie tissulaire du ligament.

Enfin, il a été montré que l'ajout de fibronectine à la surface des fibres avait un effet très positif sur la croissance cellulaire [Laurencin2005][Cooper2005][Lu2005][Puk2005][Benhardt2009]. La fibronectine est l'une des glycoprotéines extracellulaires les plus abondantes du corps humain [Lu2005], et elle tend à compenser les conséquences de la nature hydrophobe du PLA sur l'adhésion cellulaire [Liu2008a]. L'ajout de fibronectine semble également retarder la dégradation de la matrice dans le cas de l'utilisation de fibres de PGA [Lu2005]. L'ajout de RGD a également été proposée et semble bénéfique pour la prolifération cellulaire [Hersel2003][Liu2008a][Freeman2009], et également pour les propriétés mécaniques dans le cas de fibres de soie [Horan2006]. Enfin, la possibilité d'incorporer des agents biochimiques dans le matériau de manière à les délivrer localement et progressivement au fur et à mesure de leur dégradation ou en réponse à un chargement [Vunjak-Novakovic2004][Ma2004][Petrigliano2006][Fisher2007][Kimura2008] a largement intéressé la communauté scientifique. Encore une fois, l'enrobage des fibres ou l'encapsulation de substances bioactives dans le matériau ne seront pas traités dans ce mémoire, mais ouvriront des perspectives intéressantes pour la suite de ce travail.

8.2. Etat de l'art : architectures utilisées

8.2.1 Structures non fibreuses

Comme nous l'avons vu précédemment, le choix de l'architecture de la matrice est un point essentiel de la démarche d'ingénierie tissulaire, dans la mesure où elle va évidemment déterminer son comportement mécanique, mais aussi la manière dont les sollicitations macroscopiques seront transmises à l'échelle de la cellule [Nirmalanandhan2008]. Dans le cadre général de la conception

de matrices pour l'ingénierie tissulaire (non appliquée au ligament), de nombreuses architectures et plusieurs procédés d'obtention ont été proposés et évalués. Brièvement, les techniques les plus couramment utilisées visent à créer des mousses poreuses, soit par élimination d'un agent porogène incorporé au préalable dans le matériau [Chen2001][Ma2004] (Illustration I 18.a), soit en imposant une variation de température brutale qui se traduit par la création de deux phases dont les compositions diffèrent [Ma2004][Barnes2007]. Ces différentes techniques ne permettent pas d'ajuster finement l'architecture obtenue, si ce n'est la porosité ou la taille des pores de manière plus ou moins grossière [Melchels2010]. Ainsi, plusieurs méthodes d'obtention de structures complexes regroupées sous le nom de *prototypage rapide* se sont imposées cette dernière décennie dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, en raison de la variété et de la précision des géométries qu'elles permettent de fabriquer [Hutmacher2004][Tsang2004][Almeida2010][Elomaa2011] (Illustration I 18.b).

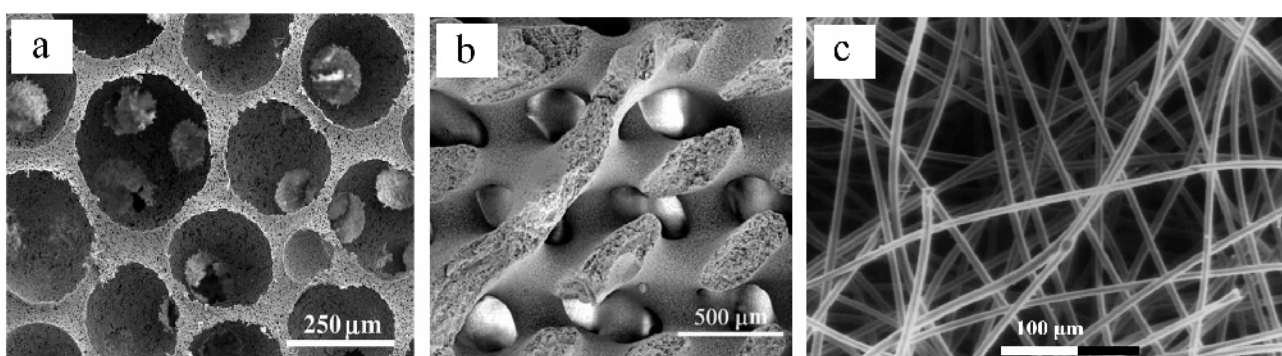


Illustration I 18: Exemples d'architectures obtenues par (a) élimination d'un agent porogène (b) prototypage rapide (c) électrospinning. Adapté de [Ma2004].

Ces méthodes ont d'ailleurs permis à la communauté scientifique d'imaginer un grand nombre d'architectures très complexes résultant d'une optimisation multi-critères en considérant par exemple la rigidité et la taille de pores dans la matrice [Hollister2002][Lin2004][Hollister2005], les contraintes de cisaillement induites par le flux, [Chen2010][Rainer2011] ou encore les propriétés de diffusivité de la matrice [Kang2010]. Les principes et les avantages des différentes méthodes de prototypage rapide ont été rassemblés à différentes reprises [Leong2003][Yeong2004][Tsang2004] : brièvement, elles consistent à déposer le matériau couche par couche de manière à obtenir une structure tridimensionnelle. L'un des principaux avantages est la possibilité de fabriquer des structures directement issues de la *Conception Assistée par Ordinateur* (CAO) [Moroni2005][Lee2008]. Dans la mesure où la principale limitation des méthodes de prototypage rapide réside dans le choix limité des matériaux, elles ont également été utilisées de manière à créer des moules dont les espaces libres peuvent être ensuite comblés par des mousses de polymère par exemple

[Jiankang2007][Hollister2009]. Cependant, même si les techniques de prototypage rapide sont largement utilisées pour l'ingénierie tissulaire de tissus comme l'os ou le cartilage, elles sont moins adaptées à des tissus sollicités en traction et non en compression comme c'est le cas pour notre application. En effet, les structures généralement isotropes issues de prototypage rapide ne présentent pas des propriétés mécaniques suffisantes en traction, et des structures à base de fibres ont été plutôt préférées pour l'ingénierie tissulaire des tissus mous comme nous allons le voir en section suivante.

8.2.2 Structures fibreuses

La technique dite de l'*électrospinning*, qui permet de former des fibres de polymère de très petit diamètre (pouvant être inférieur au micron) [Ma2004][Petrigliano2006][Barnes2007] (Illustration I 18.c), est couramment utilisées pour la fabrication de matrices et notamment pour l'ingénierie tissulaire de la peau [Jeong2008]. Bien qu'ouvrant des horizons intéressants, il n'est pas facile en utilisant cette méthode de fabriquer des structures tridimensionnelles avec un réseau de pores contrôlé et une résistance mécanique suffisante [Ma2004][Barnes2007]. De plus, l'absence d'arrangement des fibres peut induire des ruptures à long terme [Laurencin2005], car l'intégrité de la structure peut se rompre par fatigue, fluage ou abrasion [Freeman2009]. Ainsi, des techniques issues de l'industrie textile ont été généralement préférées pour la fabrication de matrices anisotropes comme c'est le cas pour le ligament. La première matrice capable d'approcher le comportement mécanique du LCA a été proposée en 2002 : elle consiste en une corde constituée de plusieurs niveaux hiérarchiques de fibres de soie torsadés entre eux [Altman2002] (Illustration I 19.a). Il a été montré que sa réponse en traction pouvait être très similaire à celle d'un LCA natif [Altman2002], et était ajustable en faisant varier divers paramètres de « torsadage » [Horan2006]. Cependant, les faibles espaces qui séparent les fibres de matrices torsadées rendent difficile la colonisation cellulaire [Chen2008a] : aucune considération morphologique n'a en effet été prise en compte dans la conception de cette matrice. En 2005, une équipe américaine a proposé et évalué des matrices basées sur des architectures tridimensionnelles tressées formées de fibres de PLA [Laurencin2005][Cooper2005][Lu2005] (Illustration I 19.b). Ces techniques de tressage 3D a permis de fabriquer des matrices offrant différentes tailles de pores, une bonne résistance à la rupture et des propriétés mécaniques comparables à celles du LCA natif [Laurencin2005]. En particulier, la matrice proposée présente des morphologies différentes dans les régions intra-articulaire et intra-osseuse, de manière à améliorer l'ancrage de la matrice dans les tunnels osseux [Laurencin2005][Cooper2005]. Des mesures concernant la morphologie de cette matrice en termes de diamètre de pore médian, de diamètre de pore le plus fréquent, d'aire superficielle et de porosité ont montré que ce type d'architecture était compatible avec la taille des pores souhaitée (>200-250

μm), avec un diamètre de pore le plus fréquent situé entre 175 et 233 μm suivant l'angle de tressage utilisé [Cooper2005]. Cependant, cette matrice offre globalement des pores de taille inférieure à cette taille idéale, avec une taille médiane des pores se situant entre 79 et 136 μm [Cooper2005]. La principale limite de la matrice proposée par cette équipe réside dans le matériau utilisé, qui offre une plage élastique et une durée de dégradation trop faibles en rapport au cahier des charges énoncé. La même équipe a également proposé une matrice basée sur une architecture tressée-torsadée [Freeman2007] (Illustration I 19.c), dans le but d'augmenter la longueur de la « courbe en J » ainsi que la déformation à rupture et la charge à rupture de la matrice tressée. L'amélioration minimale du comportement mécanique apportée par cette nouvelle architecture se fait cependant au détriment de ces propriétés morphologiques.

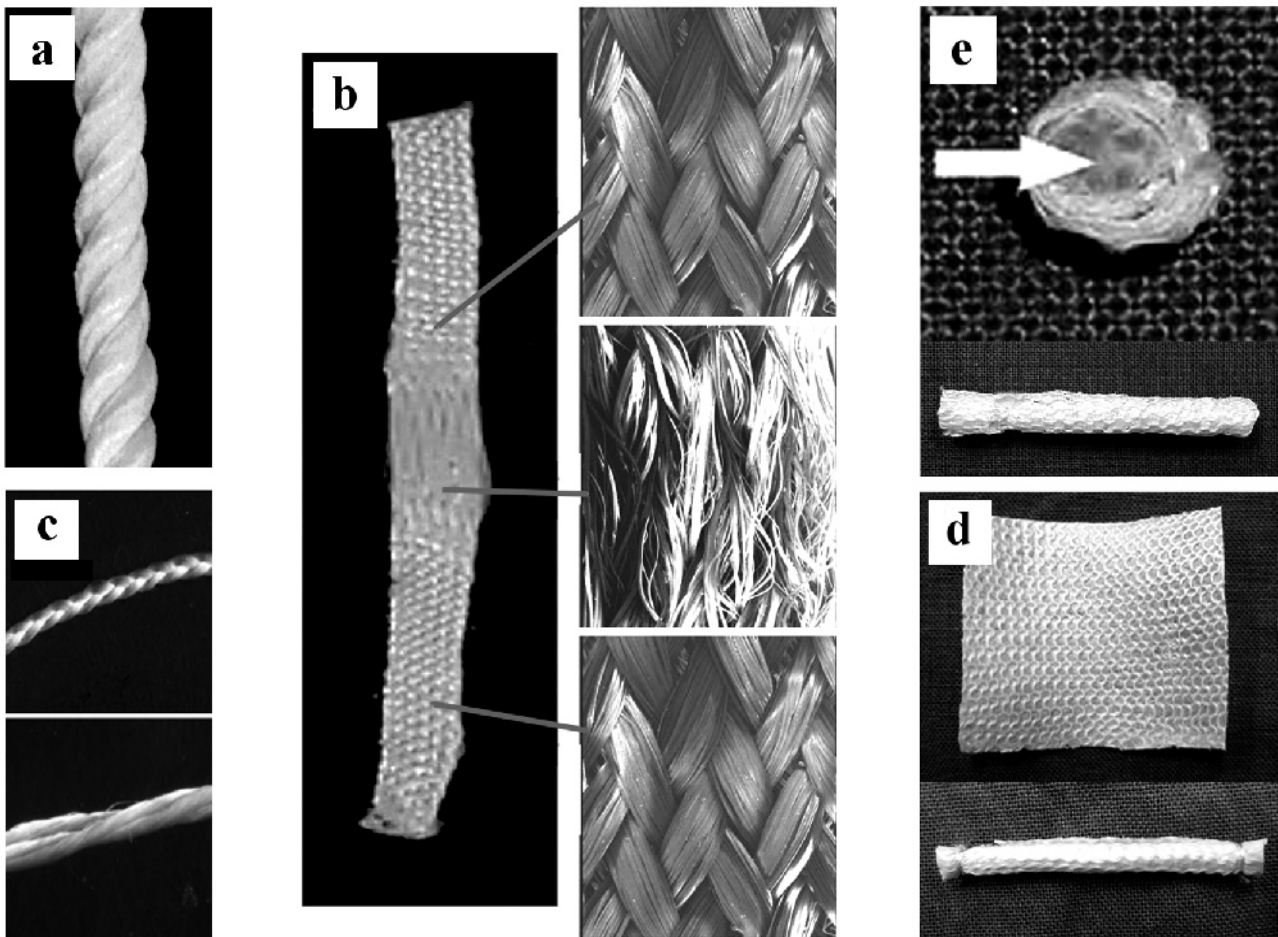


Illustration I 19: Différentes matrices proposées pour l'ingénierie tissulaire du LCA. (a) Matrice torsadée composée d'un total de 540 fibres de soies [Altman2002] (b) Matrice tressée rectangulaire avec des morphologies différentes dans les parties intra-articulaire et intra-osseuses [Cooper2005] (c) Matrice tressée-torsadée avec deux différents assemblages (en haut: torsadage puis tressage, en bas: tressage puis torsadage) [Freeman2007] (d) Matrice hybride composée d'un tricot de soie bidimensionnel enroulé sur lui-même [Fan2008] (e) Même tricot que le précédent enroulé autour d'une tresse de soie [Fan2009].

Une équipe de Singapour [Liu2008][Fan2008] a proposé une structure hybride composée d'un tricot de fibres de soie dont les pores sont remplis d'un réseau microporeux en soie (Illustration I 19.d). Ce tricot, en deux dimensions, est enroulé sur lui-même pour former une matrice ayant la forme d'un ligament. L'ajout de cette mousse est bénéfique pour la prolifération cellulaire et la sécrétion de matrice extracellulaire en comparaison avec un simple tricot [Liu2008]. Une forte production de matrice extracellulaire et une forte prolifération des cellules souches ont été observées lors de l'implantation de cette matrice dans un modèle de lapin [Fan2008]. Bien qu'offrant une structure multi-échelles intéressantes, cette matrice offre un réseau de pores assez petit ($<100 \mu\text{m}$ [Liu2008]) et des propriétés mécaniques trop faibles [Liu2008][Fan2008]. Nous noterons également la forte variabilité entre les propriétés mécaniques de différentes matrices lorsqu'elles ont été implantés *in vivo*, et également la forte diminution de ces propriétés durant les premières semaines d'implantation [Fan2008]. Face à ces propriétés mécaniques trop faibles, cette même matrice a été ensuite renforcée en enroulant ce même tricot de soie hybride autour d'une tresse constituée de six brins de soie, pour former une matrice multi-structurée [Fan2009] (Illustration I 19.e). Cette nouvelle matrice a été évaluée à la fois *in vitro* et *in vivo* sur un modèle de porc, dans lequel des matricesensemencées ou non avec des cellules souches ont été implantées [Fan2009]. La matrice ainsi proposée a permis de maintenir une stabilité mécanique jusque 24 semaines après implantation, ce qui prouve que les efforts ont graduellement été transférés de la soie à la matrice extracellulaire [Fan2009]. Au bout de cette période, le néo-tissu était capable de supporter la moitié de la charge maximale admissible par le LCA porcin natif, ce qui peut permettre de résister aux sollicitations imposées de façon quotidienne [Fan2009]. Néanmoins, durant les études *in vivo* sur lapin et porc réalisées par cette équipe, il a été montré que les cellules extérieures ne diffusaient pas dans la matrice, et que la production de matrice extracellulaire observée était donc due aux cellulesensemencées à l'intérieur de la matrice avant implantation [Fan2008][Fan2009]. Ce manque de colonisation peut être expliqué par le manque d'accessibilité des pores de la périphérie au cœur de la matrice.

Une autre structure hybride a été proposée par une équipe chinoise et évaluée *in vivo* dans un modèle de lapin [Chen2008a]. La matrice proposée consiste en une association d'un tricot de fibres de soie avec une mousse de collagène, et montre des propriétés mécaniques bien en deçà du cahier des charges présenté précédemment. Une équipe japonaise a présenté un autre type de matrice hybride constitué d'une structure tressée de PLLA recouverte d'une membrane de collagène, et contenant un hydrogel de gélatine au niveau des insertions osseuses dans le but de délivrer localement un facteur de croissance spécifique [Kimura2008]. Cette matrice a été implantée dans un modèle de lapin, et a mené à des résultats concluants en termes de vascularisation et de colonisation cellulaire de la matrice, mais peu satisfaisants en revanche en termes de propriétés mécaniques

[Kimura2008]. Enfin, une matrice hybride composée d'un tricot de fibres de PLGA et de soie recouvert de microfibres de PLCL déposées par électrospinning a été proposé récemment [Vaquette2010]. Le caractère bidimensionnel de cette structure constitue sa limite principale, car il a été souligné dans le cahier des charges énoncé précédemment qu'une matrice tridimensionnelle était requise pour permettre la régénération d'un tissu tridimensionnel. De plus, l'utilisation de fibres déposées par électrospinning ne permet pas d'obtenir des pores suffisamment gros pour assurer la migration cellulaire et des transports de masse suffisants au sein de la matrice.

9. Conclusion

Le LCA est un tissu à la structure complexe essentiel pour la stabilité du genou. Sa rupture est fréquente, et sa réparation -bien que désormais routinière- implique une réhabilitation conséquente, et se pose donc comme un problème socio-économique et médical de première importance. La réussite des reconstructions actuelles du LCA dépend de la définition qu'en donnent le clinicien et le patient. Si l'on considère que l'intervention est réussie lorsque la stabilité du genou est améliorée entre les stades pré- et postopératoire, les méthodes actuelles sont satisfaisantes ; en revanche, si le but de l'intervention est de recouvrer une fonctionnalité de l'articulation identique à celle avant rupture sans complication à court et long termes, les méthodes actuelles peuvent être encore améliorées [Frank1997]. Nous noterons que parmi ces améliorations, la reconstruction anatomique double faisceau apparaît comme une avancée très prometteuse. De surcroît, la chirurgie assistée par ordinateur risque de voir son utilisation émerger dans la reconstruction du LCA ces prochaines années en ce qui concerne notamment la position des tunnels osseux [Unwin2010]. Malgré ces améliorations attendues, les limites liées à l'utilisation d'une autogreffe (en ce qui concerne les éventuelles complications au niveau du site donneur notamment) restent problématiques.

Nous avons vu ensuite que l'application du concept d'ingénierie tissulaire à la réparation du LCA pouvait constituer une alternative prometteuse à ces méthodes chirurgicales. Or, les biosubstituts issus de la démarche d'ingénierie tissulaire présentent à ce jour des difficultés à atteindre une application clinique, en particulier en raison de la complexité de définir les propriétés que doit montrer la matrice de support pour permettre à la fois de recouvrer une fonction physiologique « normale » et d'encourager la formation d'un néo-tissu. Par conséquent, nous avons dressé une liste des critères qui ont été jugés prioritaires, puis nous avons tenté de comparer les solutions apportées dans la littérature à ce cahier des charges. Il en a notamment été conclu qu'aucune solution réellement convaincante n'existe à ce jour, et qu'il était difficile de formuler un compromis entre les contraintes morphologiques et biomécaniques qui doivent être satisfaites.

Par conséquent, l'une des ambitions principales de la présente étude est de proposer une

nouvelle matrice de support afin de proposer à terme un biosubstitut cliniquement pertinent, en nous appuyant sur la littérature abondante dans les différents domaines impliqués. Dans le prochain chapitre, nous allons présenter la matrice de support qui a été imaginée ainsi que les dispositifs qui ont été mis en place afin de la fabriquer à l'échelle de notre équipe de recherche.

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

Chapitre II

| | |
|--|----|
| II. Proposition et fabrication d'une matrice de support..... | 77 |
| 1. Introduction..... | 78 |
| 2. Proposition d'une matrice de support..... | 79 |
| 2.1. Architecture..... | 79 |
| 2.2. Matériau constitutif..... | 80 |
| 3. Fabrication de la matrice proposée..... | 80 |
| 3.1. Extrusion du polymère brut..... | 80 |
| 3.1.1 Présentation de l'extrudeuse..... | 81 |
| 3.1.2 Diamètre des fibres..... | 83 |
| 3.1.3 Dégradation des fibres après extrusion..... | 84 |
| 3.2. Choix de la composition du polymère..... | 85 |
| 3.3. Tressage des fibres de polymère..... | 87 |
| 4. Résultats et conclusion..... | 90 |

1. Introduction

Comme annoncé dans le chapitre précédent, l'une des ambitions de cette étude est de proposer une matrice de support permettant de satisfaire les critères qui ont été jugés nécessaires à la reconstruction du LCA par la méthode de l'ingénierie tissulaire. Ces critères ont été rappelés dans le tableau ci-dessous (Tableau II 1) : ils comprennent notamment les propriétés de biocompatibilité et de biodégradation liés au matériau constitutif de la matrice, des propriétés morphologiques liées à son architecture, et des propriétés mécaniques qui dépendent à la fois du matériau et de l'architecture de cette matrice. De plus, il est intéressant de souligner que l'ajustabilité de la matrice de support proposée, que nous définirons comme sa capacité à présenter des propriétés différentes en fonction d'une série de paramètres, constitue un avantage certain d'une telle matrice. En effet, cette caractéristique permet d'optimiser les propriétés de la matrice de manière à satisfaire au mieux le cahier des charges considéré, et/ou de l'adapter en fonction des futures observations biologiques *in vitro* ou *in vivo* qui seront effectuées. À partir de ces considérations, nous allons donc dans un premier temps présenter l'architecture ainsi que le matériau constitutif de la matrice de support qui a été imaginée. Dans un second temps, les outils qui ont été mis en place afin de fabriquer cette matrice à l'échelle de notre équipe seront détaillés ; enfin, nous présenterons les matrices qui résultent de ce procédé de fabrication ainsi que les différents paramètres qui y sont liés et qui permettent l'ajustabilité de la matrice proposée.

| | |
|---------------------|--|
| Biologie, biochimie | Biodégradabilité (>1 an), biocompatibilité |
| Biomécanique | Déformation d'entrée en plasticité >4% Rigidité 120-250 N/mm Caractère convexe de la réponse en traction |
| Morphologie | Taille de pores >200-250 μm Gradient des tailles des pores |
| Clinique | Adaptée au protocole opératoire habituel Fabrication et stockage Dimensions, ancrage |

Tableau II 1: Synthèse des principaux critères retenus pour la proposition d'une matrice adaptée à l'ingénierie tissulaire du LCA.

2. Proposition d'une matrice de support

2.1. Architecture

D'après la revue partielle de littérature exposée dans le chapitre précédent, nous avons vu que les architectures fibreuses semblaient particulièrement adaptées à l'élaboration de matrices de support pour la reconstruction de tissus anisotropes sollicités en traction et devant subir des sollicitations importantes. En particulier, les structures issues du tressage 3D semblent pouvoir offrir, en plus de ces propriétés mécaniques, un réseau de pores adapté au cahier des charges que nous nous sommes fixés.

Une structure basée sur du tressage circulaire multicouche, que l'on retrouve dans quelques applications industrielles (Illustration II 1), a été imaginée pour une application à l'ingénierie tissulaire du LCA pour les raisons suivantes :

- elle est particulièrement anisotrope et rigide dans sa direction longitudinale ;
- l'alignement progressif des fibres avec la direction d'application de l'effort peut offrir une courbe de réponse non-linéaire de la même façon que dans un LCA natif ;
- elle présente un réseau de pores entre les couches et entre les fibres d'une même couche, variable suivant la disposition des différentes fibres et des différentes couches ;
- suivant les caractéristiques de chaque couche et en raison de sa structure concentrique, elle peut présenter des gradients morphologiques du centre à sa périphérie ;
- elle peut être fabriquée sans nécessiter de matériel important en imposant simplement une cinématique particulière aux différentes fibres.

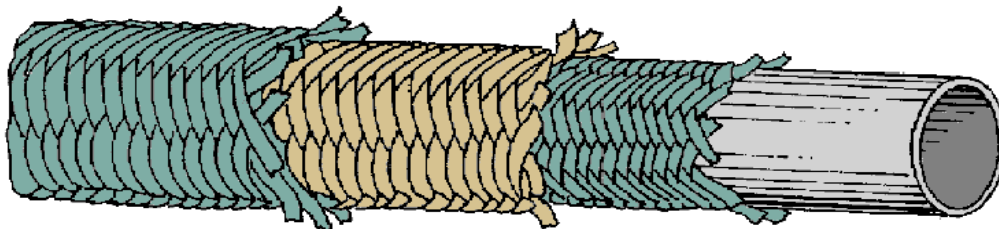


Illustration II 1: Schéma illustratif d'une structure tressée circulaire multicouche, adaptée d'un brevet de 1975 [Richardson1975]. Ici, cette structure est utilisée pour augmenter les pressions admissibles par des tubes perméables utilisés pour la filtration des fluides.

Ces différentes motivations, intuitives dans un premier temps, auront l'occasion d'être vérifiées dans la suite de ce mémoire.

2.2. Matériau constitutif

En ce qui concerne le matériau constitutif des fibres qui vont constituer la structure tressée multicouche, la revue partielle de littérature ci-dessus a permis de retenir le PLCL pour les raisons suivantes :

- ses différentes caractéristiques peuvent être ajustées en fonction du ratio entre les composants qui le constituent ;
- il est biocompatible et biodégradable avec des vitesses de dégradation particulièrement lentes (suivant sa composition) ;
- il est déformable et compatible avec des chargements cycliques, et peut offrir une résistance mécanique satisfaisante (suivant sa composition) ;
- il peut être facilement mis en forme afin d'obtenir des fibres d'un diamètre contrôlé, contrairement à des fibres naturelles.

Là encore, ces différentes caractéristiques ont été directement déduites de la littérature ; cependant, elles seront pour la plupart vérifiées dans la suite de cette étude.

Pour le travail qui va être présenté, le PLCL provient dans un premier temps du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM) de Nancy, où il a été synthétisé par polymérisation par ouverture de cycle catalysée par de l'octoate d'étain à partir de produits fournis par Sigma-Aldrich (France). Dans un second temps, nous verrons qu'un PLCL commercial sera utilisé.

3. Fabrication de la matrice proposée

3.1. Extrusion du polymère brut

La première étape permettant de fabriquer la matrice présentée ci-dessus consiste en la transformation du matériau brut sous forme de fibres. En effet, le PLCL issu des laboratoires de chimie est généralement disponible sous forme de poudre ou de granulés. A l'échelle de la recherche où nous nous plaçons, ces matériaux ne sont pas disponibles en grande quantité ; nous précisons cependant que pour une éventuelle application clinique, ces matériaux sont disponibles auprès de quelques entreprises de chimie. Les procédés industriels permettant de mettre en forme ces fibres en

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

grande série s'avèrent peu adaptés à notre cas, ce d'autant plus si l'on considère les précautions qui doivent être prises pour ne pas dégrader le matériau ni le couvrir de substances qui pourraient nuire à sa biocompatibilité. Ainsi, une extrudeuse a été développée au sein de notre équipe de manière à pouvoir mettre en forme le polymère brut à partir de petites quantités de matière première et pour une application biomédicale.

3.1.1 Présentation de l'extrudeuse

L'extrusion (ou plus exactement en l'occurrence le tréfilage) est, par définition, une méthode de mise en forme par déformation plastique. Cette méthode consiste à pousser un matériau ductile (éventuellement rendu ductile par chauffage) à travers un trou, nommé « filière ». Elle permet d'obtenir des produits de type poutres, barres, fibres ou divers profilés, suivant la forme de la filière. Le principe le plus classique de l'extrusion a été schématisé ci-dessous (Illustration II 2). Dans ce cas, la vitesse du piston et la vitesse d'enroulement conditionnent (avec le diamètre de la filière) les caractéristiques géométriques de la fibre obtenue, qui va être plus ou moins étirée en sortie de filière. Pour notre application, le dispositif d'extrusion doit permettre de fabriquer des fibres homogènes à partir d'une petite quantité de matière première (de l'ordre de quelques grammes), contrairement aux installations industrielles. Le dispositif doit, bien entendu, permettre d'amener le PLCL au-dessus de sa température de fusion, puis doit permettre de former des fibres

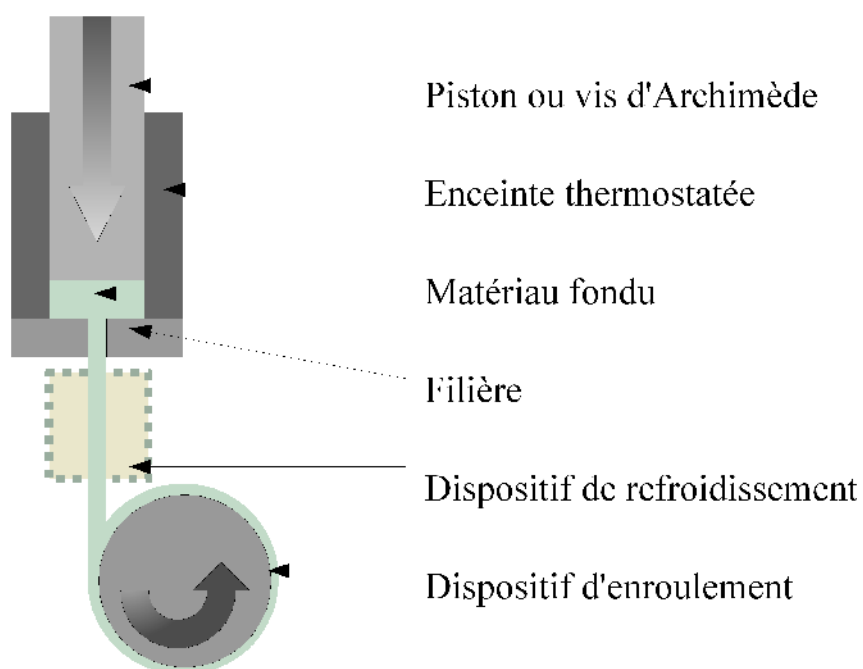


Illustration II 2: Schéma de fonctionnement d'une extrudeuse classique.

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

de diamètres variables (de l'ordre de la centaine de micromètres).

La fibre doit être refroidie en sortie de filière de manière à empêcher qu'elle colle lors de l'enroulement. Le refroidissement doit se faire sans dégrader le matériau (sans contact avec l'eau). Aucune substance potentiellement toxique (lubrifiants ou graisse notamment) ne doit rentrer en contact avec le polymère. La distance entre la sortie de filière et le dispositif d'enroulement doit être réduite au minimum pour éviter la perte de matériau en début d'extrusion. Enfin, bien évidemment, la solution la plus simple mobilisant un minimum de moyens doit être privilégiée.

Le concept de l'extrudeuse qui a été développée pour satisfaire ce cahier des charges exploite le mouvement de translation d'une machine de traction classique (disponible au laboratoire) pour assurer la commande en vitesse du piston. Cela permet en outre d'avoir une mesure de l'effort appliqué lors de l'extrusion, information qui peut s'avérer précieuse pour ajuster les paramètres de température (les efforts nécessaires à l'extrusion du matériau diminuent quand la température augmente) ainsi que pour assurer la sécurité du procédé. Le schéma de principe de cette extrudeuse est donnée ci-dessous (Illustration II 3) : Le polymère brut est placé dans une chambre (solidaire du mors bas de la machine de traction) entourée par une résistance à thermocouple intégré (BMS France) commandé par un régulateur PID (BMS France). Le piston (solidaire du mors haut de la machine de traction) pousse le matériau fondu à travers une filière conique située à l'extrémité de la

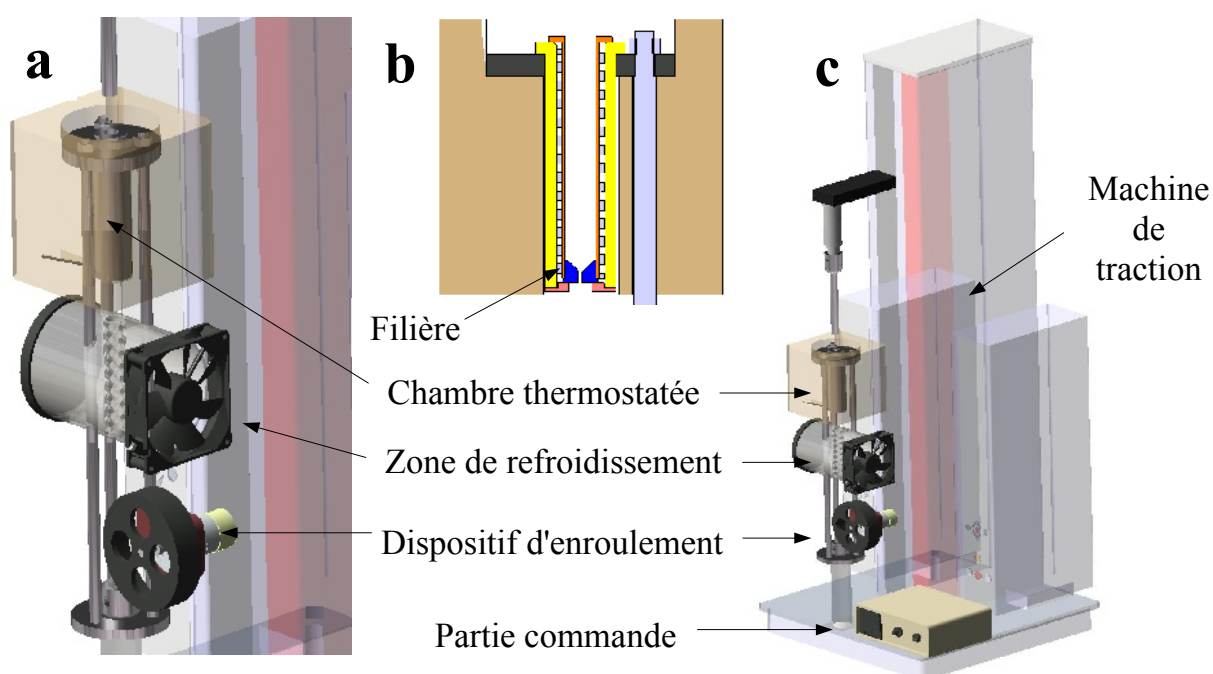


Illustration II 3: Extrudeuse développée au laboratoire. (a) Vue d'ensemble sur la chambre et les dispositifs de refroidissement et d'enroulement. (b) Vue en coupe de la chambre thermostatée (c) Vue d'ensemble de l'extrudeuse montée sur la machine de traction.

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

chambre thermostatée. L'enroulement s'effectue par l'intermédiaire d'un motoréducteur piloté en vitesse. Pour assurer la sécurité de l'opérateur et l'efficacité du chauffage, l'ensemble est disposé dans un bloc de fibre de roche. Enfin, le refroidissement de la fibre extrudée est assuré par un passage dans une chambre ventilée. Le dispositif final est représenté par l'illustration II 4.

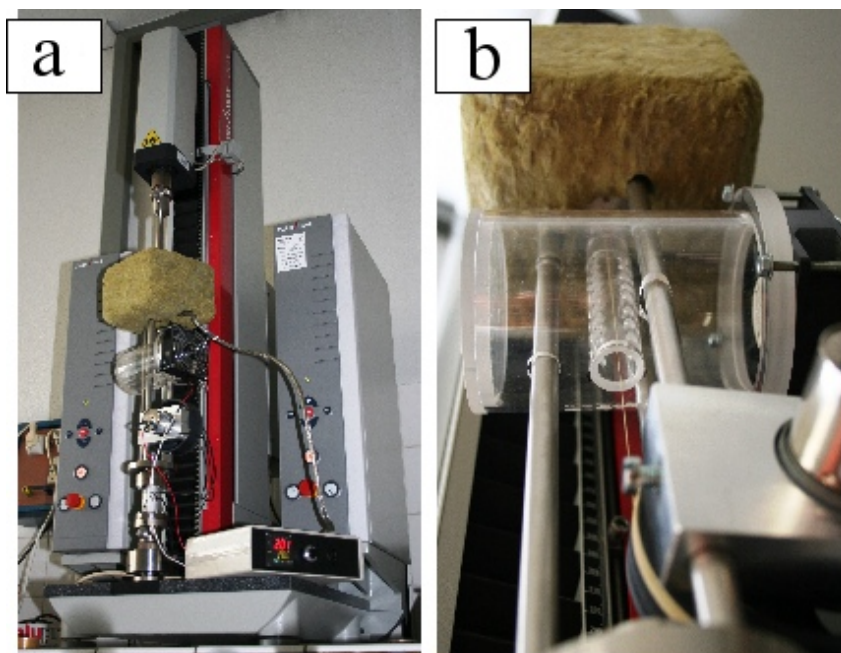


Illustration II 4: (a) Vue d'ensemble de l'extrudeuse et de la partie commande montées sur la machine de traction (b) Extrusion d'une fibre de polymère.

Cette mini-extrudeuse permet de mettre en forme des polymères à partir de 1.5g et jusqu'à 9g de matière brute. Les fibres obtenues sont homogènes, reproductibles et peuvent avoir différents diamètres.

3.1.2 Diamètre des fibres

En faisant l'hypothèse de conservation du volume durant le procédé, nous pouvons facilement estimer un diamètre de la fibre obtenue en fonction des vitesses d'extrusion. En notant \varnothing_c et \varnothing_f les diamètres intérieurs de la chambre et de la filière, V_p la vitesse du piston, Ω et R la vitesse de rotation et le rayon du cylindre enrouleur, nous arrivons rapidement à l'expression :

$$\begin{aligned} d_{\text{fibre}} &= \varnothing_c \sqrt{\frac{V_p}{R\Omega}} & \text{si } R\Omega \geq V_p \\ d_{\text{fibre}} &= \varnothing_f & \text{si } R\Omega < V_p \end{aligned} \quad (2)$$

Pour vérifier la validité de cette approximation, le diamètre extérieur de fibres extrudées a été

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

mesuré pour différents couples (V_p, Ω) à l'aide d'un micromètre et comparé à la valeur théorique issue de la relation ci-dessus (Illustration V 8). Suivant le matériau utilisé, et avec une filière de diamètre 1 mm, le procédé mis en place permet d'extruder des fibres d'un diamètre de moins de 100 μm à 900 μm , suivant les vitesses du piston et du cylindre enrouleur. Ce modèle de conservation de volume permet d'approcher le diamètre mesuré des fibres extrudées ($R^2=0,986$), bien que le diamètre mesuré soit globalement inférieur au diamètre théorique. L'erreur maximale est de 12% avec une moyenne de 7%. Ces erreurs peuvent être dues d'une part à l'hypothèse de conservation de volume, qui ne tient donc pas en compte des effets de dilatation du matériau lors des changements de température ; d'autre part, les erreurs provenant de la mesure du diamètre (écrasement de la fibre due au micromètre) et de la commande de la vitesse d'enroulement sont également à prendre en compte. Cependant, il a été considéré pour la suite que cette approximation nous permettait de prédire le diamètre de la fibre obtenue avec une précision suffisante.

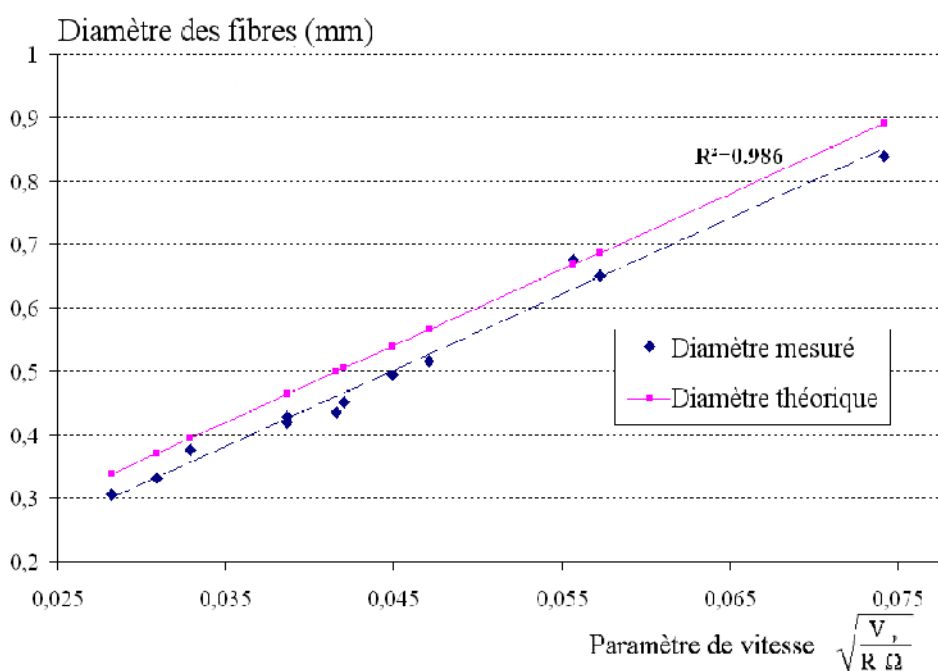


Illustration II 5: Comparaison entre les diamètres mesuré et théorique, ce dernier étant issu de l'hypothèse de conservation du volume pendant la mise en forme.

3.1.3 Dégradation des fibres après extrusion

La dégradation du polymère causée par le procédé d'extrusion a été évaluée en comparant la masse moléculaire d'un P(LL70/CL30) avant et après extrusion, par chromatographie d'exclusion stérique (SEC). Ces chromatographies ont été réalisées à température ambiante avec une pompe Merck HPLC (L-6200A) équipée d'un dégazeur et trois colonnes PLgel 5 μm , le THF étant utilisé

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

comme diluant avec une dilution de 0,7 ml/min. Deux principes de détection ont été utilisés : la diffusion de la lumière et la réfractométrie différentielle. Un incrément d'index réfractif (dn/dc) de 0,051 a été utilisé.

Le matériau brut présente une masse moléculaire moyenne de $9,65 \cdot 10^4$ g/mol avec un indice de polymolécularité (I) de 1,04, tandis que pour le même matériau après extrusion ses valeurs ont été estimées à $9,58 \cdot 10^4$ g/mol et 1.05 respectivement. Aucune différence significative n'a été relevée entre les masses molaires du P(LL70/CL30) avant et après extrusion, et il en a donc été conclu que le procédé n'avait pas d'effet significatif sur la dégradation du matériau. Nous remarquerons au passage que la masse moléculaire mesurée du P(LL70/CL30) synthétisé varie d'un facteur deux avec les valeurs rapportées dans de précédentes études [Kwon2005], ce qui montre que des matériaux avec un même ratio PLA/PCL peuvent néanmoins présenter des propriétés très différentes.

3.2. Choix de la composition du polymère

Trois copolymères, nommément les P(LL97/CL3), P(LL/85/CL15) et P(LL70/CL30) ont été synthétisés : des copolymères avec une proportion élevée de PLLA (cristallin) ont en effet été privilégiés en raison de leur résistance mécanique plus élevée en comparaison au PCL (amorphe). Les valeurs des proportions entre composants ont été choisies en fonction de leur disponibilité commerciale : en effet, le matériau qui sera sélectionné devra ensuite être acheté auprès d'un fournisseur de produits chimiques, car la quantité de matériau synthétisable à l'échelle du LCPM n'est pas compatible avec les expériences répétées qui seront nécessaires pour caractériser la matrice proposée. La composition désirée a été obtenue en ajustant la proportion de monomère au début de la phase de copolymérisation. Ces trois matériaux ont ensuite été extrudés en utilisant le dispositif présenté ci-dessus, et différents échantillons de fibres ($n=12$, diamètre $221 \pm 12 \mu\text{m}$) ont été testés à rupture en traction uniaxiale *via* une machine de traction Zwick Roell 2.5 (Zwick, Allemagne). Ces tests ont été effectués à température ambiante et dans un environnement sec, en considérant qu'une exposition courte à un environnement aqueux n'avait pas d'influence sur les propriétés du matériau en raison de sa vitesse de dégradation lente.

Les résultats disponibles dans la littérature concernant le comportement de fibres de PLCL sont rares ; par conséquent, afin d'alimenter cette base de données, des résultats concernant différents aspects de cette caractérisation du matériau sont donnés en Annexe 1. Nous nous contenterons ici de résumer les observations principales qui résultent de ces essais de traction.

La longueur initiale entre mors de chaque échantillon a été fixée à 30mm, et des essais à plusieurs vitesses de déplacement ont été effectués de manière à évaluer les effets viscoélastiques

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

du matériau. Les fibres ont été maintenues par l'intermédiaire de mors auto-serrants, et une précharge de 0,05 N a été appliquée de manière à tendre les fibres avant chaque essai. Les réponses typiques des trois polymères pour un essai à une vitesse de 1 mm/s sont représentées ci-dessous (Illustration II 6) sur une échelle semi-logarithmique. Les déformations à rupture des P(LL97/3), P(LL85/15) et P(LL70/30) ont été évaluées respectivement à $1,44\% \pm 0,63\%$, $431\% \pm 44\%$ et $610\% \pm 98\%$: les fibres de P(LL97/3) sont donc fragiles en comparaison aux deux autres types de fibres. Comme nous l'avons vu plus haut, des déformations de plus de 4% sont fréquentes au niveau du LCA lors de mouvements physiologiques : même si cette déformation globale inclut l'effet de structure, il semble que les fibres de P(LL97/3) ne conviennent pas pour l'application envisagée ici.

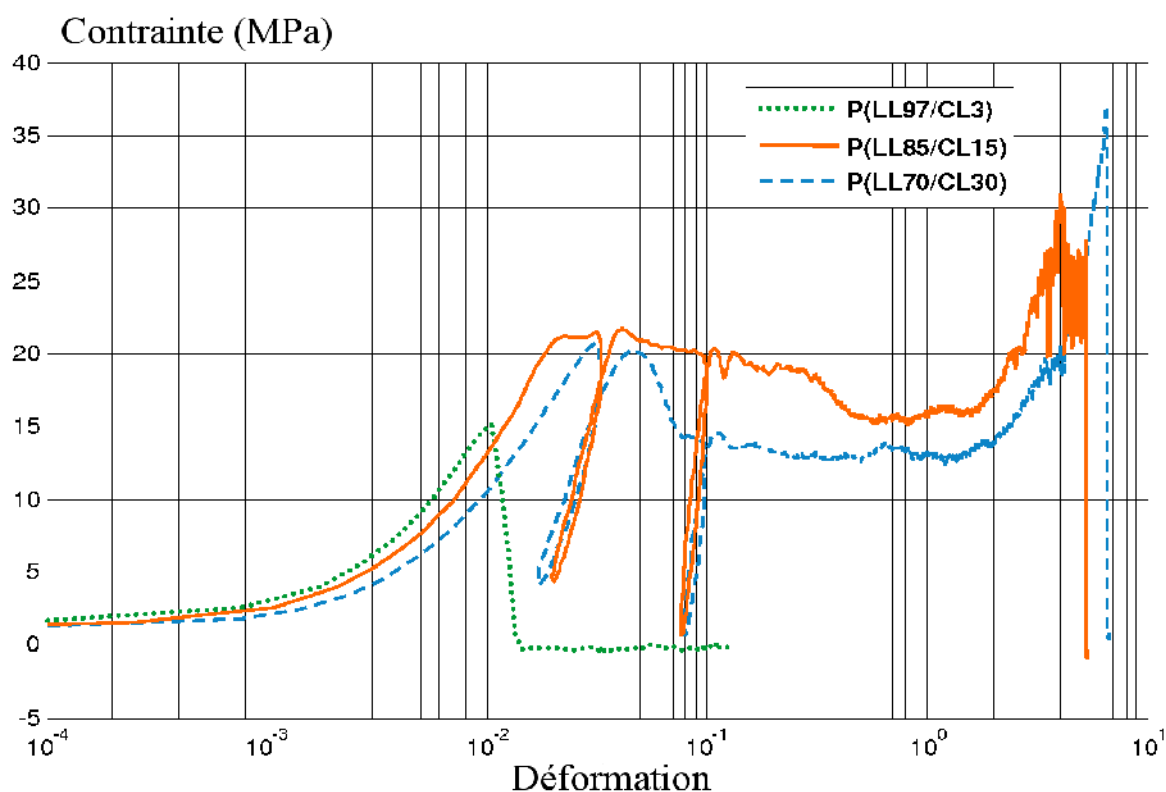


Illustration II 6: Réponses typiques en traction des fibres de P(LL97/CL3), P(LL85/CL15) et P(LL70/CL30) (échelle semi-logarithmiques)

Les modules d'élasticité de ces matériaux ont été mesurés au niveau de la partie linéaire des courbes de réponse : les modules d'élasticité des fibres de P(LL97/3), de P(LL85/15) et de P(LL70/30) valent respectivement $1091 \pm 143\text{MPa}$, $985 \pm 27\text{MPa}$ et $394 \pm 5\text{MPa}$. Ainsi, nous constatons que cette valeur décroît (de façon non-linéaire) avec la proportion de PLLA dans le copolymère : pour notre application, le P(LL85/CL15) sera donc préféré au P(LL70/30). Il a été

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

également observé que les effets viscoélastiques étaient d'autant plus prononcé que la proportion de PCL était élevée : son influence est considérable dans le cas du P(LL70/CL30), pour lequel aucune réponse n'a pu être mesurée pour de faibles vitesses de déplacement en raison de son comportement caoutchoutique. Dans le cas du P(LL85/CL15), l'utilisation d'une très faible vitesse d'allongement (0,01 mm/s) se traduit par une diminution de près de 75% du module d'élasticité mesuré. Le P(LL97/CL3) voit sa déformation à rupture chuter rapidement lorsque la vitesse d'allongement augmente. Enfin, l'effet de post-cristallisation rapporté dans la littérature [Hiljanen-Vainio1995] a été largement observé dans notre cas : les modules d'élasticité des trois polymères testés ont en effet tendance à augmenter avec le temps passé à température ambiante après extrusion au détriment de leur déformation à rupture. Ce phénomène est d'autant plus accentué que le matériau est amorphe et que la proportion de PCL est élevée. Il a été vérifié que cet effet était inhibé par une conservation au congélateur à -18°C (Annexe 1). En conclusion, ces quelques expériences préliminaires ont permis de sélectionner le P(LL85/CL15) pour la fabrication de matrices pour l'ingénierie tissulaire du LCA, car il se présente comme un compromis entre le comportement fragile du P(LL97/CL3) et caoutchoutique du P(LL70/CL30). Nous noterons cependant que les propriétés biochimiques (en termes de temps de dégradation notamment) n'ont pas été prises en compte dans la sélection de ce matériau. Il a été considéré en effet que les propriétés de dégradation des trois matériaux testés étaient compatibles avec notre cahier des charges. La caractérisation de la dégradation de matériaux présentant de faibles vitesses de dégradation est en effet difficilement compatible avec la durée du travail qui fait l'objet de ce mémoire.

Pour la suite de ce travail, le matériau utilisé sera un P(LL85/CL15) fourni par Purac Biomaterials (Pays-Bas), donc les propriétés mécaniques seront évaluées dans une prochaine section (III.3.1.). Nous nous restreindrons à considérer que toutes les fibres d'une même matrice seront composées du même matériau ; cependant, l'alternance de plusieurs matériaux présentant des propriétés mécaniques et biochimiques différentes au sein de la même matrice pourra être envisagée dans des travaux ultérieurs.

3.3. Tressage des fibres de polymère

Le tressage peut être défini comme un entrelacement de deux groupes égaux de faisceaux de fibres ou de fibres individuelles, l'un des groupes tournant dans le sens horaire et l'autre dans le sens anti-horaire. Ainsi, le rôle d'une tresseuse est de faire tourner la moitié des fibres dans le sens horaire et l'autre dans le sens antihoraire, tout en assurant un entrecroisement de ces deux groupes [Potluri2003][Omeroglu2006]. L'entrecroisement peut être de différents types, comme pour les structures tissées [Omeroglu2006][Ayranci2008]. Une structure tressée multicouche consiste

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

simplement en une succession de tresses concentriques, chacune des couches étant tressée autour de la précédente [Richardson1975]. Au fur et à mesure que les fibres effectuent leur trajectoire, un système doit bobiner la tresse ainsi effectuée proportionnellement à la vitesse de rotation des fils, et une tension constante dans chaque fil doit être assurée. Un schéma de fonctionnement d'une tresseuse généralement appelée *Maypole* a été représenté (Illustration II 7).

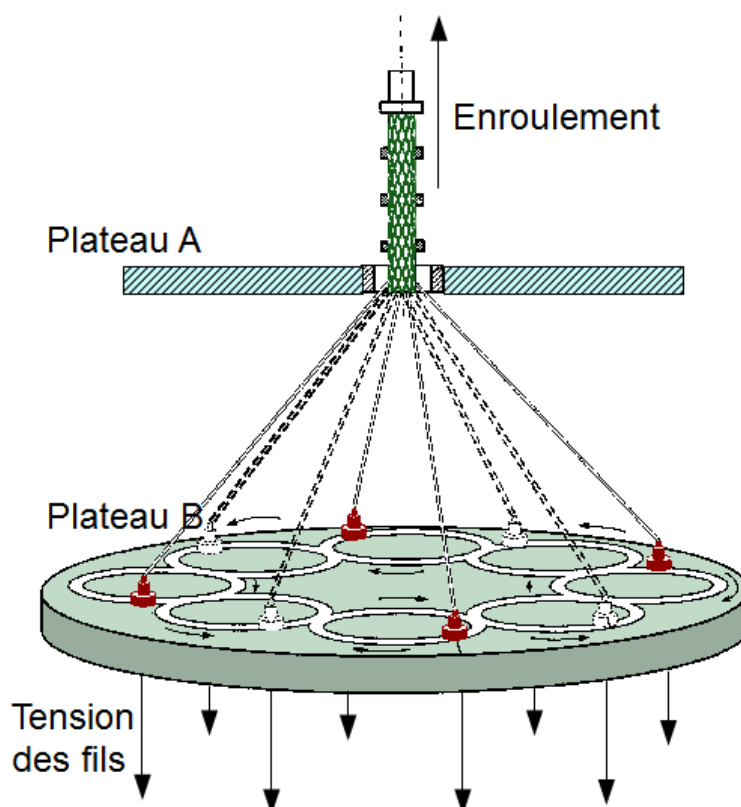


Illustration II 7: Schéma de principe du tressage circulaire, ici pour deux groupes de quatre fibres. Adapté de [Rapaport2006].

De nombreux types de tresseuses industrielles existent. Elles permettent d'effectuer à des vitesses très élevées de grandes longueurs de tresses. Ce type de tresseuses nécessite, pour être alimentées, de grandes longueurs de fibres, et sont donc peu adaptées à l'échelle de la recherche à laquelle nous nous plaçons. En revanche, son principe général permet d'imaginer un guide visant à imposer la trajectoire voulue à différents groupes de fibres, trajectoires qui ont d'ailleurs été décrites en détail dans la littérature [Zhang1999][Zhang1999a].

Par conséquent, une adaptation de ce procédé de tressage à une fabrication à plus petite échelle a été mise au point. Le montage proposé consiste en un guide qui permet d'imposer manuellement les trajectoires aux fibres de manière régulière. La tresse obtenue est bobinée par un dispositif

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

d'enroulement manuel. La « densité » du tressage de chaque couche peut être modifiée en ajustant la distance h qui sépare un premier plateau où l'on impose les trajectoires aux fibres (Plateau B, Illustration II 7) et un deuxième plateau où le dispositif d'enroulement est placé (Plateau A, Illustration II 7). Ce paramètre h est corrélé au pas de tressage P de chaque couche, défini comme la distance nécessaire à une fibre pour effectuer un tour complet de la tresse (Illustration II 8.a) : nous verrons plus loin comment ce pas de tressage a été estimé en fonction des différents paramètres du procédé.

La tension des fibres est imposée tout au long du procédé en attachant des masses identiques à leurs extrémités. La fabrication de tresses multicouche s'effectue simplement en répétant le procédé autour d'une structure déjà tressée. A ce stade, il n'a pas été jugé nécessaire de concevoir

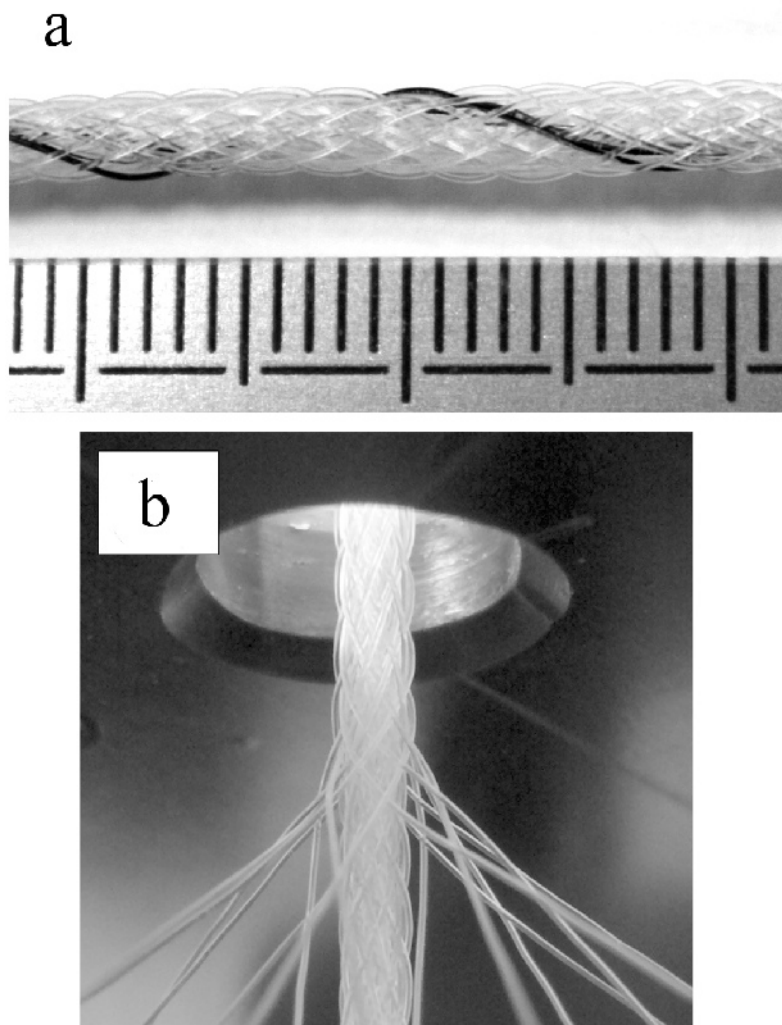


Illustration II 8: (a) Exemple de matrice de support tressée multicouche en PLCL. L'une des fibres de la couche extérieure de la matrice a été colorée en noir, de manière à visualiser sa trajectoire au sein de la structure (b) Matrice en cours de tressage.

une tresseuse automatisée, compte tenu du faible nombre de matrices à fabriquer (quelques dizaines). En revanche, le travail mis au point dans cette étude est largement transposable à la fabrication en série à partir d'une tresseuse industrielle et de plus grandes quantités de matière première. Dans cette perspective, nous avons fixé à 16 le nombre de fibres par couche, étant donné qu'une tresseuse de type industrielle permettant de tresser 16 fibres (ou faisceaux de fibres) est disponible au sein du Laboratoire de Physique et Mécanique Textiles (LPMT, Mulhouse) et pourrait être utilisée dans le cas d'une fabrication de la matrice à plus grande échelle.

4. Résultats et conclusion

Les dispositifs présentés ci-dessus permettent de fabriquer un nouveau type de matrice de support dédiée à l'ingénierie tissulaire du ligament, à l'échelle de notre équipe de recherche et à partir de faibles quantités de matière première. Nous soulignerons en particulier que la mini-extrudeuse qui a été développée constitue un outil original qui permet de fabriquer à moindre coût des fibres de polymères à partir d'une machine de traction habituelle, qui équipe de nombreux laboratoires de recherche. Un exemple de cette matrice a été représenté après et pendant la phase de tressage Illustration II 8. Nous soulignerons que ces outils n'ont pas pour vocation de permettre une fabrication de matrices de support à grande échelle. Néanmoins, l'achat de dispositifs industriels permettant de se substituer à ces outils de laboratoire pourrait être envisagé s'il s'avérait que la matrice de support proposée permette de se diriger vers un biosubstitut cliniquement pertinent.

Une série de paramètres du procédé de fabrication permet de modifier les propriétés de cette matrice. Nous allons ci-après énumérer les paramètres qui ont été fixés dans la présente étude mais pourront constituer par la suite des possibilités d'ajustabilité supplémentaires, ainsi que les paramètres qui seront maintenus variables dans la suite de ce mémoire :

Paramètres fixés

- Le ratio PLLA/PCL des fibres constitutives de la matrice a été fixé en fonction de critères mécaniques. Cela dit, cette composition pourra être amenée à évoluer par la suite, notamment pour satisfaire des cahiers des charges différents en termes de module d'élasticité ou de temps de dégradation en particulier ;
- La composition de toutes les fibres de la matrice est la même ;
- Le diamètre de toutes les fibres de la matrice est le même ;
- Le nombre de fibres par couche est fixé à 16, qui est une valeur courante pour les tresseuses industrielles ;

II. Proposition et fabrication d'une matrice de support

- Entre chaque couche de la même matrice, la distance h séparant les deux plateaux du dispositif de tressage est maintenue constante ;
- La tension appliquée lors du tressage est fixée.

Paramètres variables

- Diamètre des fibres de la matrice ($100 \mu\text{m} < d_{\text{fibre}} < 900 \mu\text{m}$) ;
- Nombre de couches de la matrice (non limité) ;
- Distance h ($100 \text{ mm} < h < 200 \text{ mm}$) ;

La matrice ainsi proposée semble être susceptible de satisfaire différents cahiers des charges, en fonction des valeurs affectées à ces différents paramètres. Or, une étude expérimentale visant à évaluer l'influence de ces différents paramètres sur les propriétés de la matrice semble laborieuse et peu compatible avec les moyens de fabrication unitaire qui ont été développés. Ainsi, dans le prochain chapitre, nous allons nous intéresser à la possibilité de quantifier numériquement l'effet de ces différents paramètres, et ainsi de proposer une configuration de matrice adaptée au cahier des charges, sans nécessiter l'acquisition de données expérimentales coûteuses en temps et en matière première.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

Chapitre 3

| | |
|--|-----|
| III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support..... | 93 |
| 1. Introduction : ingénierie tissulaire assistée par ordinateur (ITAO)..... | 94 |
| 2. Morphologie de la matrice de support..... | 95 |
| 2.1. Modélisation géométrique de la matrice de support..... | 95 |
| 2.2. Pertinence de la modélisation géométrique..... | 99 |
| 2.2.1 Diamètre extérieur..... | 99 |
| 2.2.2 Répartition des fibres dans la section..... | 100 |
| 2.2.3 Densité de fibres dans la section..... | 103 |
| 2.3. Caractérisation morphologique de la matrice de support..... | 103 |
| 2.4. Distribution des pores: évaluation du modèle..... | 105 |
| 3. Comportement mécanique de la matrice de support..... | 107 |
| 3.1. Caractérisation mécanique du matériau..... | 108 |
| 3.2. Description du code de calcul..... | 111 |
| 3.2.1 Transformation géométrique..... | 111 |
| 3.2.2 Modélisation du contact entre fibres..... | 113 |
| 3.3. Application à la géométrie de la matrice de support..... | 115 |
| 3.3.1 Configuration de référence..... | 116 |
| 3.3.2 Pilotage des conditions aux limites..... | 117 |
| 3.3.3 Traitement des résultats..... | 121 |
| 3.4. Analyse et évaluation des résultats des simulations..... | 124 |
| 3.4.1 Pertinence de la configuration initiale calculée..... | 124 |
| 3.4.2 Protocole de traction uniaxiale des matrices de support..... | 127 |
| 3.4.3 Évaluation des résultats des simulations..... | 129 |
| 3.5. Application à une reconstruction double faisceau..... | 131 |
| 4. Sélection d'un jeu de paramètres pour la matrice de support..... | 135 |
| 4.1. Effet des paramètres du procédé sur la morphologie..... | 135 |
| 4.2. Effet des paramètres du procédé sur la réponse en traction uniaxiale..... | 137 |
| 4.3. Sélection d'une matrice adaptée au cahier des charges..... | 138 |
| 4.3.1 Choix des paramètres géométriques..... | 138 |
| 4.3.2 Propriétés de la matrice sélectionnée..... | 139 |
| 5. Discussion et conclusion..... | 142 |

1. Introduction : ingénierie tissulaire assistée par ordinateur (ITAO)

Dans les chapitres précédents, les différents critères qui nécessitent d'être pris en compte lors de la conception d'une matrice de support pour l'ingénierie tissulaire du LCA ont été répertoriés et examinés. Une matrice de support possédant plusieurs paramètres ajustables a été proposée afin de répondre au cahier des charges. Pour définir la combinaison de paramètres qui permette de satisfaire au mieux les différents critères énoncés, l'approche la plus évidente consisterait à réaliser une série d'expériences visant à quantifier par tâtonnements l'influence des paramètres de la matrice sur ses différentes propriétés. Plusieurs limites sont néanmoins associées à ce type d'approche :

- les procédés de fabrication de la matrice qui ont été présentés dans le chapitre précédent sont peu adaptés à la fabrication d'un grand nombre d'échantillons permettant de constituer un modèle prédictif qui permettrait de déterminer les propriétés de la matrice correspondant à un jeu de paramètres donné ;
- les matières premières nécessaires à la fabrication d'une telle quantité de matrices sont coûteuses ;
- les mesures qui seraient alors effectuées se limiteraient à des propriétés d'usage de la matrice (porosité globale, réponse à différents type de sollicitations, perméabilité ...) mais ne permettraient pas d'accéder aux informations locales qui jouent un rôle important sur la formation de tissu (distribution des pores, champs mécaniques locaux, transports de masse locaux, ...).

Une alternative à cette démarche expérimentale et d'adopter une approche dite d'*Ingénierie Tissulaire Assistée par Ordinateur* (ITAO). Le concept d'ITAO a été proposé dans les années 1990 et a été largement développé durant cette dernière décennie. Il consiste à utiliser toute la variété des outils numériques accessibles à l'ingénieur, (1) pour comprendre les mécanismes biologiques qui gouvernent la réponse cellulaire à un environnement donné et/ou (2) pour optimiser la conception et la mise en culture de matrices de support. Ces outils numériques permettent notamment d'établir des connexions entre l'échelle microscopique de la cellule et l'échelle macroscopique du tissu, relations qui s'avèrent difficilement accessibles à l'expérience.

L'utilisation de ces outils requiert au préalable une description « numérique » de la géométrie de la matrice de support, définie par un maillage. Des moyens d'imagerie (comme la microtomographie, μCT en anglais pour *micro Computed Tomography*) ont été souvent utilisés pour obtenir la géométrie extérieure [Hollister2005][Jaecques2004][Sun2005][Chen2006] de la matrice et/ou sa micro-structure afin de simuler son comportement mécanique [Lacroix2006][Sandino2008]

[Milan2009][Milan2010][Baas2010][Stops2010][Stops2010a][Sandino2011] ou les transports de masse à l'intérieur de ses pores [Porter2005][Maes2009][Milan2009][Milan2010][Sandino2011][Melchels2011]. Ces démarches ont permis d'établir, pour une matrice donnée, des relations entre l'environnement externe de la matrice et les stimuli mécaniques à l'échelle cellulaire. Néanmoins, elles exigent la fabrication préalable de la matrice, ce qui les rend inadaptées à l'optimisation de ses propriétés effectives. Un second moyen d'obtention de la géométrie nécessaire à une démarche d'ITAO consiste à utiliser une approche de *Conception Assistée par Ordinateur* (CAO), qui est d'ailleurs largement utilisée dans le cas d'une fabrication de matrices par prototypage rapide [Moroni2005][Lee2008][Eshraghi2010]. Cette définition de la géométrie peut alors dépendre de différents paramètres, ce qui rend possible une optimisation des propriétés de la matrice sans avoir recours à la fabrication d'échantillons réels [Saito2010].

Dans notre cas, la matrice tressée multicouche présentée précédemment présente la particularité de posséder une géométrie prédictible et compatible avec la démarche d'ITAO. Dans cette section, des outils numériques permettant de caractériser la morphologie de la matrice ainsi que sa réponse mécanique vont être présentés. Ces outils seront utilisés afin de déterminer un jeu de paramètres qui permette à la matrice de satisfaire le cahier des charges présenté précédemment.

2. Morphologie de la matrice de support

2.1. Modélisation géométrique de la matrice de support

Des architectures tridimensionnelles tressées carrées (en opposition à l'architecture tressée circulaire que nous proposons ici) ont été étudiées par différents auteurs [Wang1995][Sun2004]. Ces travaux proposent de déterminer les trajectoires tridimensionnelles de chaque fibre (ou faisceau de fibres) à partir de leur position dans le plan normal à la direction de la tresse tout au long du procédé de tressage (Illustration III 1). Ainsi, la géométrie finale de la structure peut être approchée par de pures considérations géométriques. Le même principe a été appliqué, dans le cadre du présent travail, à la modélisation géométrique de tresses circulaires multicouches. La trajectoire des fibres dans le plan normal à la direction de la tresse, noté (x, y) , a été représentée ci-dessous. À chaque étape de tressage, chaque fibre alterne entre un diamètre nominal (D), extérieur (D_{ext}) et intérieur (D_{int}) et tourne d'un angle de $\theta = \pm \pi/8$ pour une tresse à 16 fibres, deux groupes de fibres tournant en sens inverse (Illustration III 2).

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

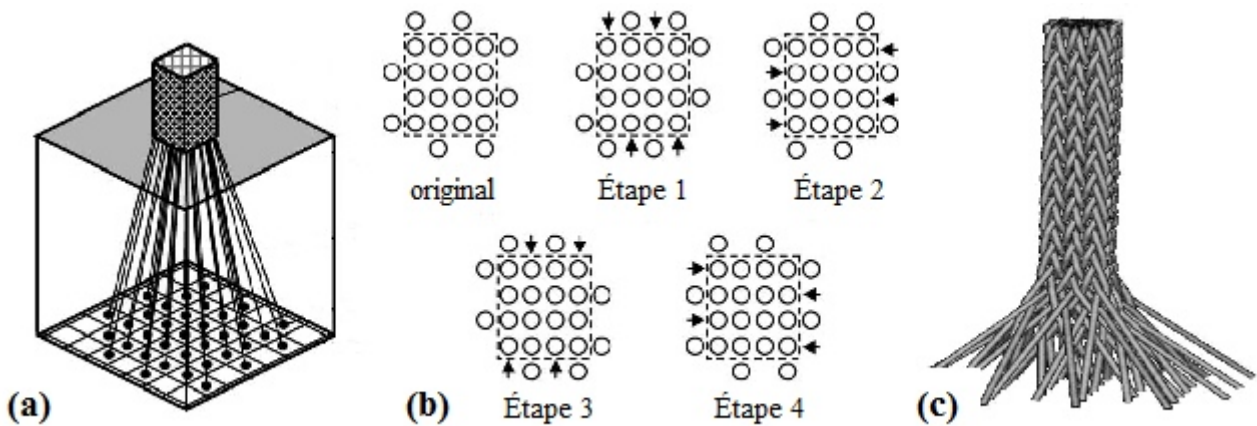


Illustration III 1: Détermination de la géométrie de tresses carrées à partir de l'analyse du procédé de tressage. Adapté de [Sun2004].

À chaque nouvelle étape, le plan (x,y) doit être translaté d'une valeur correspondant à $1/16^{\text{ème}}$ du pas de tressage. Le pas de tressage de chaque couche dépend en réalité de l'angle de tressage des fibres à l'intérieur de la matrice. Cet angle est relié, dans notre cas, à la hauteur h séparant les deux plateaux du dispositif de tressage, ainsi qu'au diamètre des fibres. Le pas de tressage n'est pas le

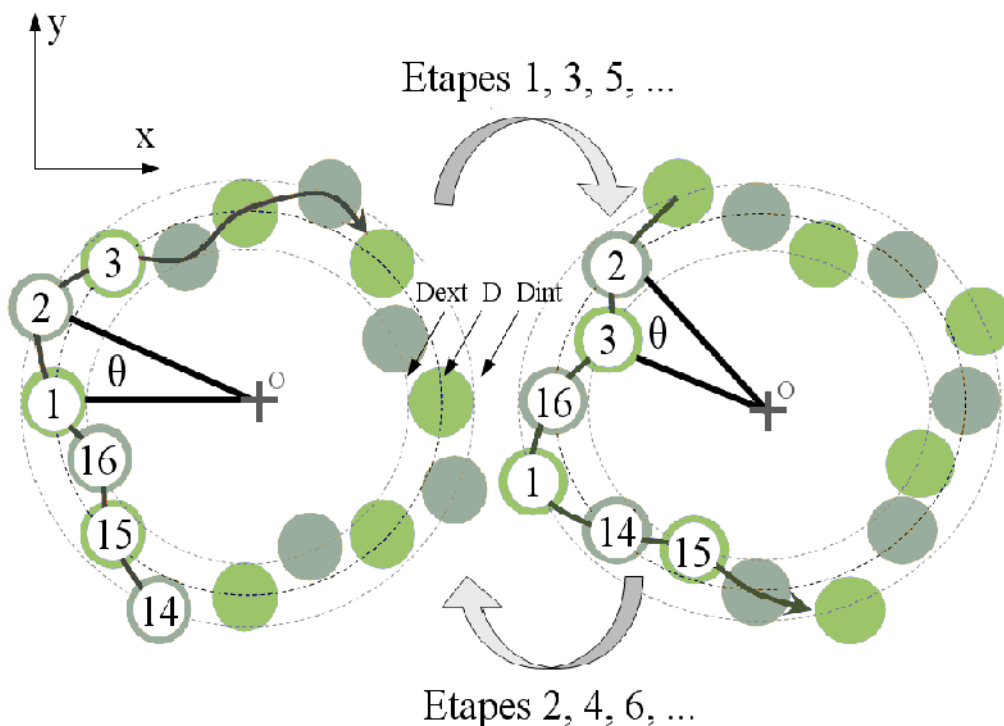


Illustration III 2: Cinématique du procédé de tressage. Entre chaque étape successive, chaque groupe de fibres (dont certaines ici sont numérotées) alterne entre les diamètres D_{int} , D et D_{ext} , et tourne d'un angle $\pm\theta$.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

même pour les différentes couches d'une matrice donnée, les fibres devant s'enrouler avec un même angle initial autour d'une matrice de différents diamètres. Or, la relation qui permet de prédire le pas de tressage en fonction de la couche, du diamètre des fibres et de la hauteur h est loin d'être triviale, et une loi empirique a donc été formulée pour prédire ce pas de tressage. Une suggestion d'une telle loi est donnée en annexe (Annexe 2 : Détermination empirique du pas de tressage) ; elle sera utilisée dans toute la suite de ce travail, mais il est important de souligner qu'elle pourrait être sujette à améliorations. Le paramètre h sera donc utilisé dans toute la suite de ce mémoire pour décrire la façon dont le tressage est « serré ».

Ces considérations géométriques permettent ainsi, *via* une interpolation de type *spline*, de créer les trajectoires représentées ci-dessous (Illustration III 3.a). À partir de ces trajectoires, il est alors aisé de créer la géométrie des tubes en générant des cercles normaux à la trajectoire de chaque fibre, dont le diamètre correspond au diamètre des fibres (Illustration III 3.b). L'hypothèse de circularité des sections des fibres dans la tresse est alors implicitement effectuée. Le nombre de points qui définissent ces cercles ainsi que la distance qui les sépare régissent la finesse du maillage de la matrice virtuelle. Le résultat obtenu est représenté Illustration III 3.c pour une tresse monocouche. Le diamètre nominal D de la première couche a été déterminé de manière à ce que le diamètre extérieur obtenu soit en accord avec des mesures du diamètre extérieur effectuées sur différentes configurations de tresses monocouche.

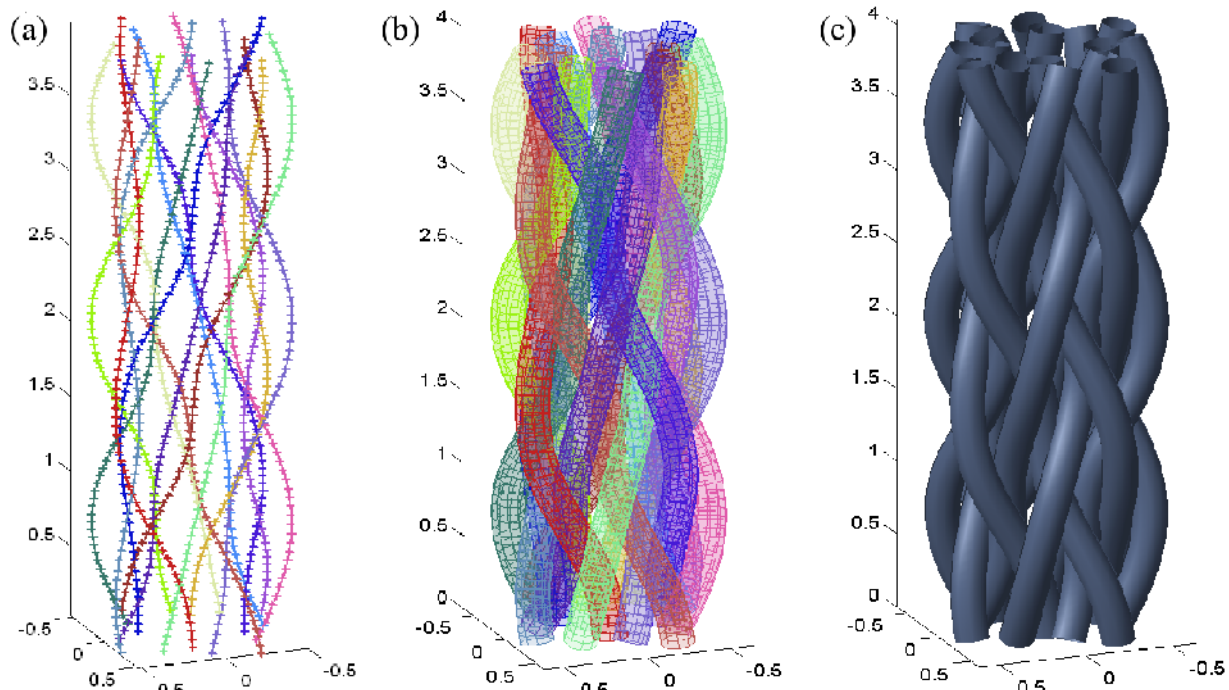


Illustration III 3: (a) Détermination des trajectoires à partir de la cinématique des fibres durant le tressage. (b) Création de tubes sous l'hypothèse de rayon constant. (c) Géométrie finale.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

Pour la création de la matrice multicouche, la difficulté réside dans la définition du diamètre nominal de la couche $i > 1$, noté D_i . En effet, la disposition des couches entre elles (en rotation et en translation suivant l'axe de la tresse) sont définis de manière aléatoire, et il n'est donc pas possible de prédire à l'avance les diamètres D_i de chaque couche qui permettent de s'assurer que les couches $i-1$ et i sont en contact. Par conséquent, un diamètre nominal de référence de la couche i est tout d'abord calculé à partir du diamètre maximal de la couche $i-1$. Ensuite, la distance point-à-point minimale entre la couche $i-1$ et i est calculée, et les coordonnées des nœuds de la géométrie dans le plan transverse sont ensuite itérativement diminués jusqu'à ce que la distance minimale qui sépare les deux couches $i-1$ et i devienne inférieure à un seuil donné, correspondant à la condition de contact. L'algorithme utilisé pour créer la géométrie de la tresse multicouche est schématisé ci-dessous (Illustration III 4).

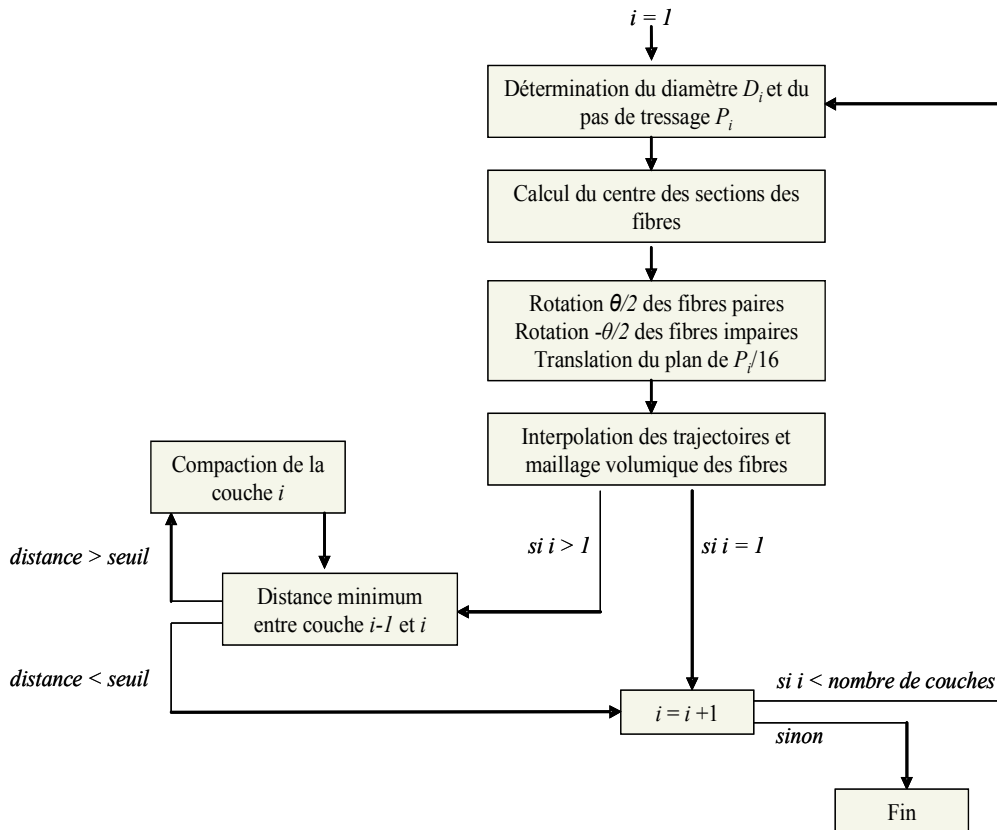


Illustration III 4: Algorithme de construction de la géométrie tressée multicouche.

Un exemple d'architecture issue de ce processus est représenté Illustration III 5.

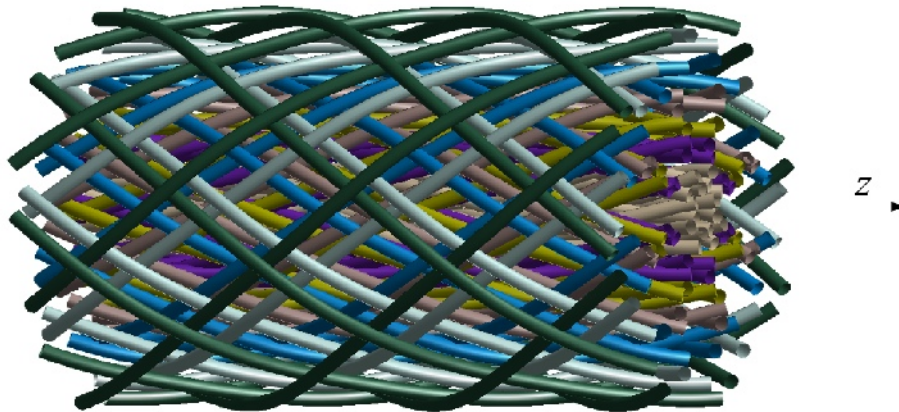


Illustration III 5: Exemple d'architecture tressée multicouche obtenue à l'issue de l'algorithme de modélisation géométrique.

En conclusion, une analyse géométrique simple permet d'obtenir une géométrie approchée de la matrice multicouche en fonction des paramètres de procédé, notamment le nombre de couches, le diamètre des fibres, et la distance h séparant les deux plateaux du dispositif de tressage. La densité du maillage et le seuil de détection du contact sont également des paramètres d'entrées essentiels de l'algorithme mis en place. La section suivante va permettre de vérifier que la géométrie ainsi constituée est bien représentative de la géométrie réelle des matrices fabriquées au laboratoire.

2.2. Pertinence de la modélisation géométrique

Dans cette section, nous allons présenter les différents moyens qui ont été développés afin de vérifier que la modélisation géométrique décrite ci-dessus est en accord avec la géométrie de la véritable matrice. Le diamètre extérieur des matrices réelles et virtuelles ainsi que la répartition et la densité des fibres à l'intérieur des sections de ces matrices vont donc être comparés. Nous précisons que les pas de tressage des matrices réelles et virtuelles ne seront pas comparés, puisque la définition du pas est issue de données expérimentales.

2.2.1 Diamètre extérieur

Dans un premier temps, les diamètres extérieurs de structures réelles et virtuelles comprenant de 1 à 9 couches ont été comparés. Le diamètre des matrices réelles a été mesuré (pied à coulisse, précision $\pm 0,02$ mm) à quatre reprises pour deux échantillons après la formation de chaque nouvelle couche. Le diamètre de la matrice virtuelle a été calculé à partir de 32 reconstructions. En effet, comme la reconstruction de la géométrie de la matrice est basée sur plusieurs paramètres aléatoires, deux matrices virtuelles issues des mêmes paramètres d'entrée peuvent être différentes. Les résultats

ont été présentés sur l'illustration III 6.

Aucune différence significative n'a été trouvée entre les diamètres des matrices virtuelles et réelles (ANOVA, $p < 0,05$). Cependant, le processus de reconstruction de la matrice virtuelle a tendance à surévaluer son diamètre extérieur. Ceci peut être probablement expliqué par la nature purement géométrique de cette reconstruction, qui ne tient pas compte de la déformation de la couche précédente lors du tressage d'une nouvelle couche.

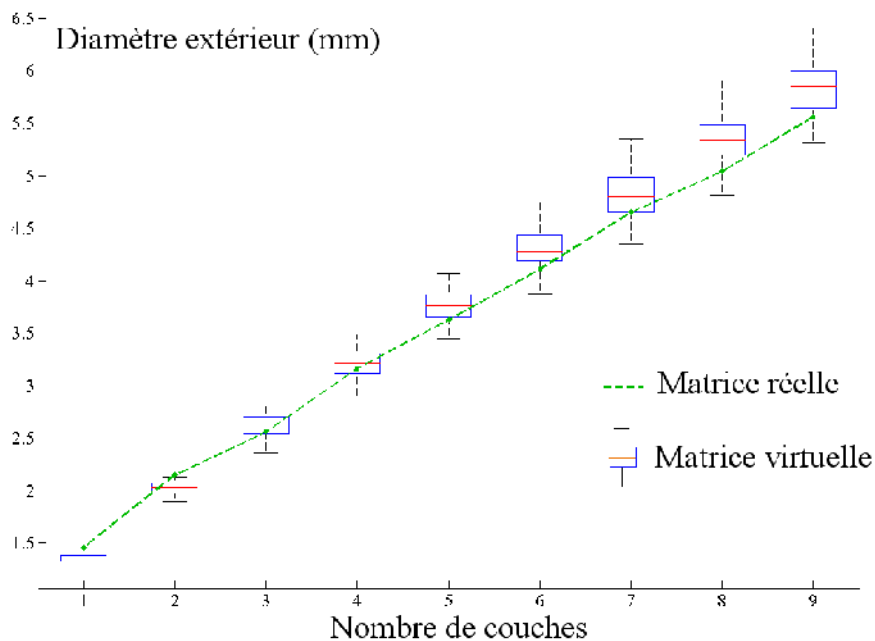


Illustration III 6: Comparaison des diamètres extérieurs des matrices réelles et virtuelles. Matrice de 9 couches, $d_{\text{fibre}} = 200 \mu\text{m}$, $h = 100 \text{ mm}$.

2.2.2 Répartition des fibres dans la section

Dans un second temps, les sections des géométries virtuelles et réelles ont été comparées. Les sections des matrices réelles ont été obtenues en immergeant deux matrices dans une résine d'*Araldite*®. Au total, huit sections ont été obtenues à partir de coupes au microtome, et les sections ont ensuite été photographiées (Illustration III 7). Un algorithme de traitement d'image (réalisé sous *Image J*) visant à détecter les objets circulaires dans cette section a permis d'obtenir l'allure de la section des différentes matrices réelles. Les sections de la matrice virtuelle ont été obtenues en calculant l'intersection de la matrice virtuelle avec des plans normaux à l'axe de la structure. Les huit coupes obtenues pour la matrice réelle ont été comparées à 32 coupes de la matrice virtuelle. Comme ces coupes (réelles et virtuelles) ont été effectuées à des endroits aléatoires dans des matrices particulières, il est évident qu'elles ne peuvent pas se superposer exactement. En revanche,

les répartitions moyennes des fibres dans les sections peuvent être comparées.

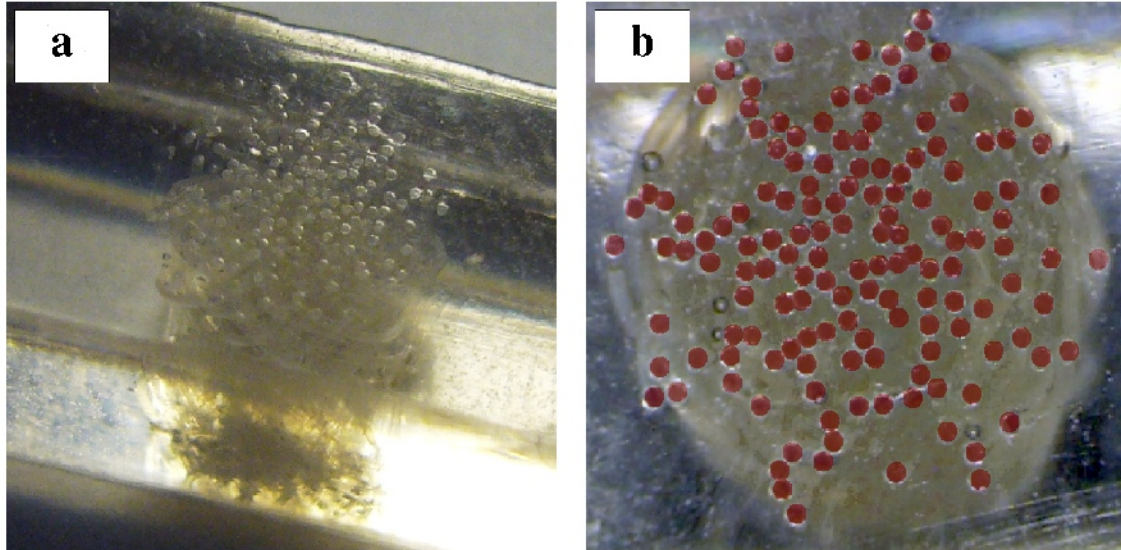


Illustration III 7: (a) Imprégnation des matrices dans une résine d'Araldite® suivies de coupes au microtome permettant d'obtenir des sections de la matrice réelle (b) Détection des fibres dans les sections obtenues.

Les images ont dans un premier temps été binarisées, puis le centre de gravité de l'image (correspondant au centre de la tresse) a été calculé. L'intensité des niveaux de gris selon 359 segments passant par ce centre a été calculé, chaque segment faisant un angle d'un degré avec le suivant. Les intensités moyennes des niveaux de gris en fonction de l'angle et en fonction du rayon ont été ensuite comparées (Illustration III 8), en moyennant les profils de niveaux de gris sur le rayon et l'angle respectivement.

La comparaison des résultats obtenus pour les huit coupes réelles et 32 coupes virtuelles est illustrée ci-dessous (Illustration III 9), pour une matrice tressée de huit couches et des fibres de 200 μm . Les résultats concernant la variation des niveaux de gris en fonction de l'angle ont été représentés sous la forme d'un diagramme de Fourier, de manière à souligner les périodicités angulaires de la structure. Ces résultats montrent que la répartition des fibres au sein des sections des géométries réelle et virtuelle est qualitativement similaire. Le coefficient de corrélation entre les moyennes des profils de niveaux de gris dans la direction radiale pour les sections réelles et virtuelles est de 0,89. Nous pouvons observer que dans le cas des sections virtuelles, la première couche est disposée sur un même rayon pour toutes les sections, ce qui se traduit par un pic prononcé qui n'est pas présent dans les sections réelles. En effet, dans le cas des sections réelles, les fibres sont plus libres de se réarranger à l'intérieur de la tresse et notamment au centre de celle-ci.

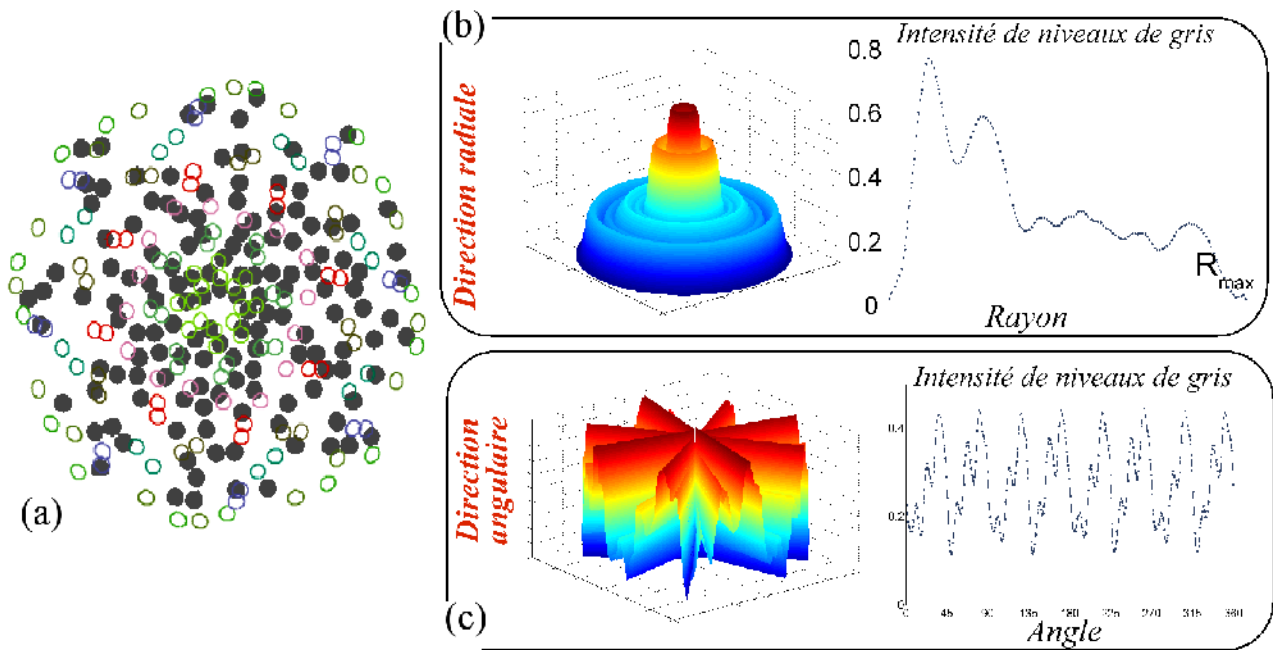


Illustration III 8: (a) Superposition de deux coupes réelles et virtuelles (b et c) Répartition moyenne de l'intensité des niveaux de gris de l'image en fonction du rayon (b) et de l'angle (c) pour l'ensemble des matrices virtuelle. Représentation tridimensionnelle à gauche et bidimensionnelle à droite.

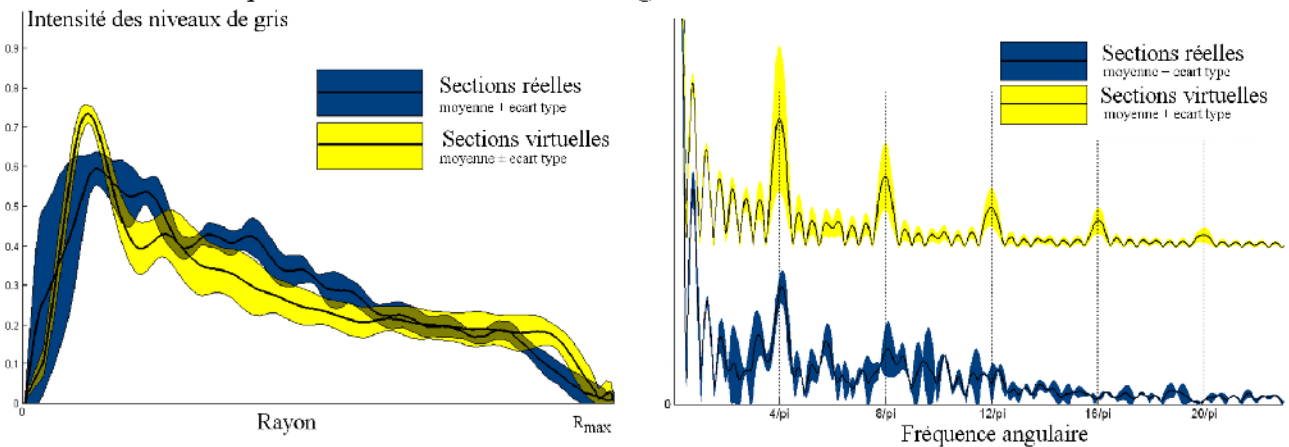


Illustration III 9: Intensité des niveaux de gris moyenne en fonction du rayon (à gauche) et en fonction du rayon sous forme d'un diagramme de Fourier (à droite) pour les sections des matrices réelles et virtuelles.

La représentation dans le diagramme de Fourier met en évidence la périodicité angulaire des sections théoriques, avec des périodes de $\pi/4$, $\pi/8$, $\pi/12$ et $\pi/16$ clairement marquées. Cela résulte directement de la description purement géométrique des trajectoires des fibres, qui sont par nature parfaitement périodiques. Cette périodicité est évidemment moins marquée pour les sections réelles, également à cause du réarrangement des fibres à l'intérieur de la structure. Cependant, les

périodicités à $\pi/4$ et $\pi/8$ restent nettement visibles.

2.2.3 Densité de fibres dans la section

Enfin, les densités de fibres dans les sections des géométries réelle et virtuelle ont été comparées. Pour cela, le rapport entre les pixels nuls (fibres) et non nuls (vide) a été calculé à l'intérieur du disque défini par le centre de la tresse (centre de gravité de l'image) et le rayon maxi (distance maximale entre un pixel non nul et le centre de gravité de l'image). Aucune différence significative (ANOVA, $p < 0,05$) n'a été observée entre les densités estimées pour les sections réelles et théoriques (respectivement $0,228 \pm 0,021$ et $0,228 \pm 0,014$). Compte tenu du fait que la géométrie virtuelle a tendance à surévaluer légèrement le diamètre extérieur de la tresse et que le nombre de fibres et leur diamètre est le même pour les géométries virtuelles et théoriques, il était possible de s'attendre à trouver une densité plus grande dans le cas des sections réelles. Cependant, la procédure de traitement d'images visant à analyser les sections réelles a consisté à rechercher des objets circulaires dans la section, alors que la section des fibres est évidemment elliptique [Lyons2004]. Ainsi, la sous-estimation de la section des fibres dans le cas des sections réelles compense la surestimation du diamètre extérieur dans la géométrie virtuelle, ce qui explique qu'aucune différence significative n'est mesurée entre les densités de fibres des deux types de section.

2.3. Caractérisation morphologique de la matrice de support

Nous pouvons considérer à partir des résultats précédents que, malgré quelques différences dues à la nature purement géométrique de la matrice virtuelle, celle-ci est conforme à la véritable matrice. À partir d'une telle description numérique de la géométrie de la matrice, plusieurs études ont montré qu'il était possible à partir de méthodes de traitement d'images de caractériser la morphologie de l'objet en y détectant des domaines interstitiels connexes que l'on désignera par le terme « pore » [Jones2009][Melchels2010]. Cette caractérisation peut être plus ou moins complète et concerner de nombreuses caractéristiques morphologiques ; dans notre cas, nous nous limiterons à la distribution des tailles de pores, à leur interconnectivité et à leur distribution spatiale, caractéristiques qui ont été présentées comme prioritaires lors de la définition du cahier des charges pour la conception de la matrice. Les pores à l'intérieur de la matrice virtuelle ont été définies comme les plus grosses sphères incluses dans les parties libres de la géométrie [Jones2009]. Dans ce but, l'algorithme qui a été développé procède suivant le schéma suivant : un nuage de points régulier est généré à l'intérieur d'un domaine incluant la géométrie de la matrice, la distance entre deux points étant défini comme une fraction du diamètre des fibres qui la composent. Les points situés à l'intérieur des fibres de la matrice, détectés à partir d'un critère de distance par rapport aux

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

lignes moyennes des fibres, sont ensuite supprimés du nuage de points. La distance d_i entre chaque point P_i situé dans la partie libre de la matrice et le nœud N_j le plus proche de P_i est ensuite calculée, et associée à P_i . De cette façon, une carte des distances discrète est dressée. Les maxima locaux des d_i dans le nuage de points correspondent aux centres de pores centrés en P_i et de diamètre d_i .

À partir de ce réseau, il est alors possible de quantifier la distribution des tailles de pores dans la géométrie virtuelle, ainsi que leur distribution spatiale (Illustration III 10). Le réseau de pores obtenu de la sorte a également été utilisé pour caractériser l'interconnectivité des pores. Les sphères centrées en P_{i1} et P_{i2} ont été considérées connectées lorsque le segment $[P_{i1} P_{i2}]$ n'avait pas d'intersection avec la géométrie virtuelle, ou lorsque la norme du segment était inférieure à la demi-somme des diamètres des sphères centrées en P_{i1} et P_{i2} (ce qui correspond à des sphères interpénétrées). Un nettoyage de ces connections a été ensuite effectué : si plusieurs chemins permettaient de lier les sphères P_{i1} et P_{i2} , seul le chemin qui utilise les liens les plus courts a été conservé. Cette méthode a permis de montrer qu'il était toujours possible d'atteindre toutes les sphères de la matrice à partir de n'importe quelle autre sphère ; en d'autres termes, le réseau de pores est entièrement interconnecté.

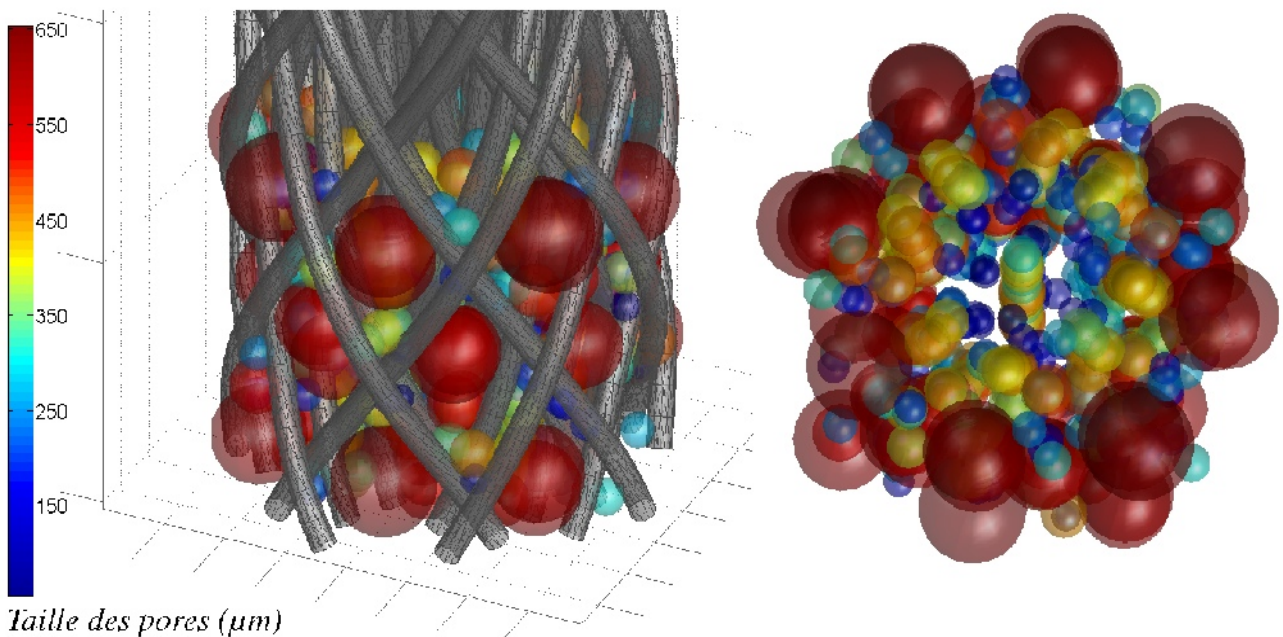


Illustration III 10: Réseau de pores obtenu par le calcul avec dans une matrice de 8 couches. La couleur de chaque pore est associée à son diamètre.

Nous pouvons voir sur la figure ci-dessus (Illustration III 10) que la matrice proposée offre un gradient de taille de pores, positif en allant du centre vers l'extérieur de la structure. Comme nous l'avons précisé précédemment, un tel gradient de taille de pores du centre de la matrice à sa

périphérie peut être mis à profit pour les transports de masse à l'intérieur de la matrice, à la fois pour l'apport de nutriments jusqu'à cœur et pour l'évacuation des déchets de biodégradation. En effet, on peut penser que les risques d'obstruction des pores extérieurs de la structure (due à une prolifération cellulaire plus importante au contact du milieu de culture) s'en trouvent réduits, voire annihilés.

2.4. Distribution des pores: évaluation du modèle

Les résultats obtenus à partir de l'algorithme précédent ont été confrontés à des données expérimentales issues de la méthode de porosimétrie au mercure. Brièvement, le principe de cette technique consiste à soumettre un échantillon à une pression croissante de mercure. Chaque nouveau pas de pression permet à un volume de mercure supplémentaire de pénétrer à l'intérieur de pores, de plus en plus petits. À partir de la mesure du volume introduit à chaque pas de pression, une allure de la distribution des tailles de pores peut donc être déduite [Leon1999]. Les essais de porosimétrie au mercure ont été réalisés à l'aide d'un dispositif (Micromeritics Autopore III) disponible au LAEGO (Nancy). Trois échantillons composés de huit couches de fibres de 200 μm de diamètre ont été soumis à une pression variant de 0,034 à 0,62 bar.

Dans un second temps, la distribution de tailles des pores à l'intérieur des matrices réelles a été évaluée à partir des huit coupes au microtome obtenues précédemment. Un algorithme de traitement d'images, qui est l'équivalent en deux dimensions de l'algorithme utilisé pour caractériser la morphologie des matrices virtuelles, a été utilisé : pour chaque pixel nul de l'image, la distance minimale à un pixel non nul (appartenant à une fibre) a été calculée. Les maxima locaux de ces distances ont ensuite permis de situer le centre de cercles inclus dans les parties libres de la section, dont les diamètres sont représentatifs des diamètres des sphères incluses dans la matrice.

La comparaison des distributions des tailles de pores obtenues par les différentes méthodes présentées a été représentée Illustration III 11. Les tailles de pores calculées dans la matrice virtuelle sont comprises entre 137 et 966 μm , avec un mode principal à $241 \pm 18 \mu\text{m}$. La porosimétrie au mercure donne des pores compris entre 24 et 396 μm avec un mode principal à $229 \pm 30 \mu\text{m}$. Enfin, la méthode d'analyse des sections de la matrice réelle permet de trouver des pores entre 108 et 943 μm avec un mode principal à $198 \pm 38 \mu\text{m}$. Bien que la taille principale des pores semble comparable, des différences sont tout de même observables, et en partie explicable en raison des méthodes de mesures utilisées. En effet, la porosimétrie n'est pas adaptée *a priori* à la mesure de pores de grandes dimensions. Ainsi, il n'a pas été possible ici d'imposer des pressions inférieures à 0,034 bar, et donc d'obtenir la partie du graphe correspondant aux pores de taille supérieure à 400 μm . De plus, cette méthode montre des limites dans notre cas : la pression correspondant aux plus gros pores de la matrice situés *a priori* entre deux couches *i* et *j* (Illustration

III 10), est en fait considérée par le porosimètre comme la pression nécessaire pour traverser la plus « extérieure » des couches i et j . Ainsi, un décalage entre la distribution des tailles de pores obtenue par porosimétrie à mercure et les deux autres courbes peut donc être attendu en raison de ces limites inhérentes à la porosimétrie mercure [Diamond2000].

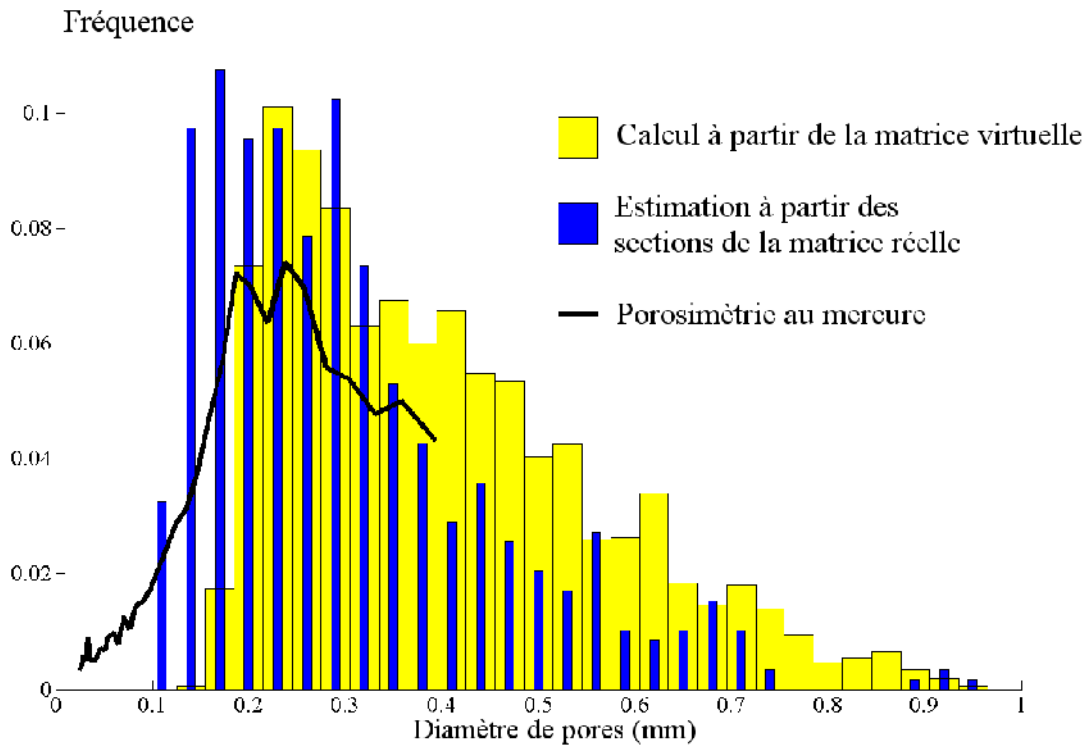


Illustration III 11: Comparaison entre la distribution de tailles de pores obtenues par calcul dans la matrice virtuelle, par calcul dans les sections de la matrice réelle, et par porosimétrie mercure.

La distribution de taille de pores obtenue par analyse des sections de la matrice réelle confirme la présence de pores de plus de 400 μm et jusqu'à 900 μm dans la matrice utilisée. Cependant, en comparaison avec la distribution calculée dans la matrice virtuelle, une plus grande quantité de pores est décelée dans la plage des 100-200 μm et une quantité inférieure de pores supérieurs à 400 μm est mesurée. Cela peut être dû à plusieurs points : d'une part, tout d'abord, le diamètre d'une section de sphère est statistiquement toujours inférieur ou égal à celui de la sphère. De plus, nous avons vu précédemment que la géométrie virtuelle a tendance à surévaluer légèrement le diamètre extérieur de la matrice. La matrice virtuelle est donc moins « dense » que la matrice réelle, et il est donc compréhensible que les pores qui y sont détectés soient légèrement plus gros que les pores mesurés dans la matrice réelle. Néanmoins, nous soulignerons que la méthode mise au point permet de prédire de manière satisfaisante la distribution des tailles de pores dans la matrice de support.

3. Comportement mécanique de la matrice de support

Comme nous l'avons vu dans le premier chapitre de ce mémoire, le rôle d'une matrice adaptée à l'ingénierie tissulaire du LCA est double : elle doit d'une part présenter une réponse mécanique (macroscopique) qui lui permette de remplir la fonction du tissu originel durant la période de réhabilitation, et de l'autre elle conditionne le lien entre les sollicitations mécaniques macroscopiques qui lui seront imposées et les champs mécaniques locaux qui vont agir sur le comportement de la cellule. Ainsi, il est intéressant de posséder un outil capable (1) de prédire la réponse mécanique globale de la matrice sous divers types de sollicitations et (2) de déterminer les champs mécaniques locaux à l'échelle de la fibre.

Pour ce premier point, la méthode la plus naturelle consiste à effectuer des essais mécaniques sur différentes matrices pour plusieurs jeux de paramètres, et à établir des lois empiriques visant à prédire sa réponse sous sollicitation connue. Cela revient à considérer la matrice comme un milieu continu, dont la loi de comportement dépend de différents paramètres. Cependant, cette méthode empirique peut s'avérer gourmande en matière première compte tenu du nombre de paramètres devant être considérés, et d'autre part elle ne pourrait fournir aucune information relative aux stimuli locaux à l'échelle de la fibre. En effet, il est difficile d'un point de vue expérimental de quantifier ces stimuli étant donnée la complexité de la structure de la matrice. Des méthodes d'homogénéisation périodique ont été utilisées en ingénierie tissulaire afin d'établir des liens entre ces différentes échelles. Elles nécessitent cependant de pouvoir déterminer un volume élémentaire représentatif (VER), qui correspond à une cellule unitaire dont la répétition périodique permet de reconstituer la structure, ce qui est difficilement compatible avec l'architecture de notre matrice qui n'est précisément pas périodique. De plus, les méthodes d'homogénéisation prédisent le comportement d'une structure à partir des propriétés mécaniques de ses constituants. Or, dans le cas de notre matrice, le comportement mécanique de la structure est également déterminé par les interactions complexes entre ces différents constituants, qu'il est difficile de prendre en compte dans ces méthodes d'homogénéisation.

La méthode des Éléments Finis (EF) permet de décrire de telles relations multi-échelles, et elle est devenue durant ces deux dernières décennies un des acteurs essentiels de la boîte à outil d'un chercheur en biomécanique. Cependant, les codes EF utilisés classiquement permettent difficilement de modéliser à l'échelle de la fibre le comportement de structures aussi complexes que celle à laquelle nous nous intéressons, en particulier en raison du nombre d'interactions qui existent entre les différentes fibres de la structure, de l'évolution de ces interactions lorsque la structure est sollicitée, et du cadre des grandes transformations dans lequel le problème doit être défini. Ainsi, plusieurs auteurs ont tenté ces dernières années de développer des méthodes spécifiques permettant

de modéliser les interactions entre les différentes fibres de structures textiles [Wang2001] [Lomov2007][Miao2008]. En particulier, une méthode EF basée sur une description des fibres par des poutres à cinématique enrichie a été proposée [Durville2005][Durville2009a][Durville2012] et possède les avantages suivants : (1) elle permet de calculer la configuration initiale *a priori* inconnue à partir d'une configuration arbitraire de référence (2) elle permet de considérer les déformations transverses des fibres, et des lois de comportement tridimensionnelles peuvent être considérées (3) elle permet de détecter et de modéliser les interactions entre de nombreuses fibres, le tout dans un cadre de grandes déformations. Par conséquent, le travail qui sera présenté ici résulte d'une collaboration visant à appliquer cette méthode dans le cas de la matrice tressée multicouche.

Dans cette section, nous allons dans un premier temps décrire la loi qui sera utilisée pour modéliser le comportement mécanique du PLCL et déterminer les paramètres de cette loi, puis nous décrirons brièvement les spécificités du code de calcul qui sera mis en oeuvre. Ce code sera appliqué à la structure tressée multicouche de la matrice, et les résultats des simulations seront évalués en les comparant à des données expérimentales. Enfin, nous verrons comment cette méthode peut également s'appliquer au cas d'une reconstruction anatomique à double faisceau du LCA.

3.1. Caractérisation mécanique du matériau

Dans le chapitre précédent (section II.3.2.), nous avons décrit les principales motivations qui nous ont conduit à sélectionner le P(LL85/CL15) comme matériau constitutif de la matrice. Dans le code EF qui va être utilisé, il est nécessaire de lier les contraintes et les déformations du matériau à travers une loi de comportement compatible avec le cadre des grandes déformations dans lequel le problème va être posé.

La loi de comportement utilisée pour caractériser les fibres de P(LL85/CL15) vise à relier le second tenseur de Piola-Kirchhoff, noté \mathbf{S} , au tenseur de déformation de Green-Lagrange, noté \mathbf{E} . Ces deux variables sont thermodynamiquement conjuguées [Korobeinikov2000] et se prêtent au cadre de grandes transformations dans lequel nous travaillons. La déformation \mathbf{E} s'exprime en fonction du gradient lagrangien du champ de déplacement $\nabla \mathbf{u}$:

$$\mathbf{E} = 1/2(\nabla \mathbf{u} + {}^t \nabla \mathbf{u} + {}^t \nabla \mathbf{u} \nabla \mathbf{u}) \quad (3)$$

En notant ε la déformation conventionnelle en traction selon l'axe z , E_{zz} s'exprime alors :

$$E_{zz} = \varepsilon + \frac{\varepsilon^2}{2} \quad (4)$$

On rappelle que l'allongement λ s'exprime simplement à partir de la déformation

conventionnelle pour un essai de traction uniaxiale :

$$\lambda = 1 + \varepsilon = 1 + \frac{(L - L_0)}{L} \quad (5)$$

où L et L_0 désignent les longueurs actuelles et initiales de l'échantillon selon l'axe z .

Lors d'une sollicitation uniaxiale selon l'axe z , on dispose de l'effort mesuré T et de l'aire de la section initiale A_0 . On peut alors exprimer la composante en z du premier tenseur de Piola-Kirchhoff noté \mathbf{P} :

$$P_{zz} = \frac{T}{A_0} \quad (6)$$

Le second tenseur de Piola-Kirchhoff \mathbf{S} s'exprime en fonction de \mathbf{P} à partir du gradient de la transformation \mathbf{F} :

$$\mathbf{S} = \mathbf{P} \cdot \mathbf{F}^{-1} \quad \text{avec} \quad \mathbf{F} = \mathbf{I} + \nabla \mathbf{u} \quad (7)$$

Dans le cas d'une traction uniaxiale selon l'axe z , la composante F_{zz} du gradient de la transformation \mathbf{F} correspond à λ , et on obtient donc finalement :

$$S_{zz} = \frac{T}{A_0} \frac{1}{\lambda} \quad (8)$$

Tant que la déformation longitudinale n'excède pas un seuil, noté ε_0 , le comportement est supposé de type élastique linéaire isotrope:

$$\mathbf{S} = \mathbf{C} : \mathbf{E} \quad (9)$$

où \mathbf{C} désigne le tenseur de rigidité. Dans le domaine plastique, on écrit la relation ci-dessous pour les tenseurs \mathbf{E} et \mathbf{S} :

$$\mathbf{S} = \mathbf{C} : \mathbf{E}_{el} + Y(E_{zz}) \mathbf{C} : (\mathbf{E} - \mathbf{E}_{el}) \quad (10)$$

où \mathbf{E}_{el} correspond à la partie élastique de la déformation atteinte lorsque $E_{zz} = \varepsilon_0$. La fonction scalaire Y correspond à l'érouissage du matériau régi uniquement par la déformation E_{zz} ; elle peut être formulée :

$$Y(E_{zz}) = a + b(1 - \exp(-c E_{zz})) \quad (11)$$

Cette formulation utilise trois paramètres (a , b , c) qui caractérisent l'érouissage. En considérant la continuité de S_{zz} et de $\partial S_{zz} / \partial E_{zz}$ en $E_{zz} = \varepsilon_0$, on peut formuler a et b de la manière suivante:

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

$$a = E \left(\varepsilon_0 \frac{1 - \exp(-c \varepsilon_0)}{c \exp(-c \varepsilon_0)} \right) \quad b = \frac{E}{c \exp(-c \varepsilon_0)} \quad (12)$$

avec E le module d'élasticité, ε_0 le seuil de déformation élastique et c un paramètre d'écrouissage. Les paramètres E , c et ε_0 ont été déterminés à partir des réponses en traction ($N=12$) des fibres de P(LL85/CL15) à une vitesse de 1 mm/s sous la forme $S_{zz}=f(E_{zz})$ en utilisant la méthode des moindres carrés. Ces trois paramètres ont été évalués à $E=2668$ MPa (± 133 MPa), $\varepsilon_0 = 1.59\%$ ($\pm 0,11\%$) et $c=141$ (± 21) et seront conservés par la suite. La réponse typique en traction d'une fibre de P(LL85/CL15) ainsi que le modèle utilisé ont été représentés Illustration III 12.

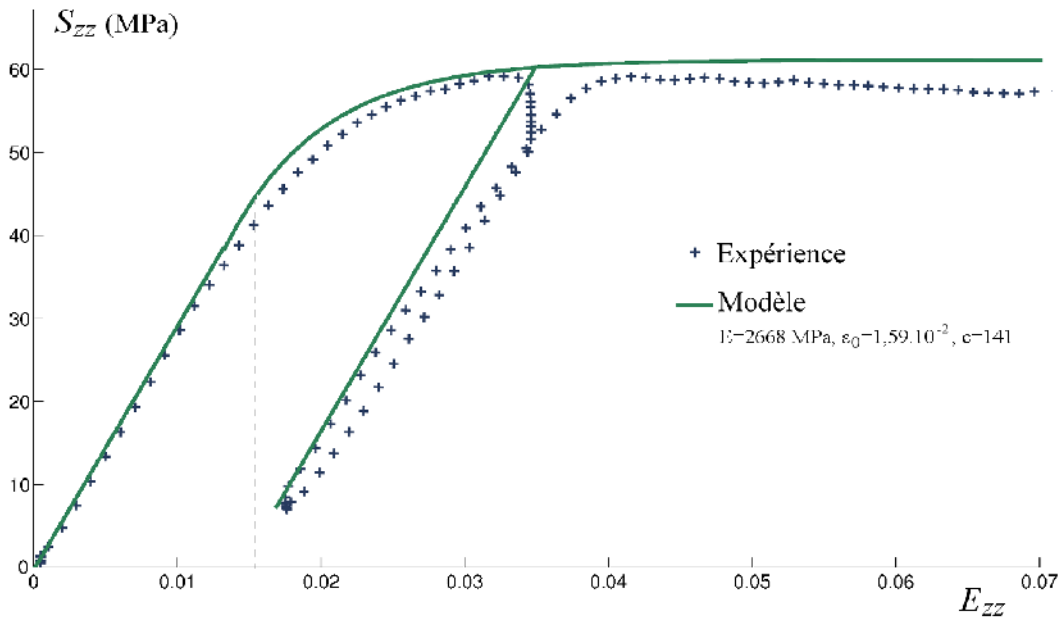


Illustration III 12: Réponse typique en traction d'une fibre de P(LL85/CL15) et modèle élastoplastique correspondant. L'axe des abscisses représente la déformation totale de la fibre.

Un point important doit être soulevé ici : dans la loi de comportement utilisée, aucune composante ne dépend du temps ou du taux de déformation. Aucune viscoélasticité n'est donc prise en compte dans cette loi, ce qui constituera une limite évidente des simulations qui seront présentées par la suite. En effet, les simulations seront effectuées en considérant que la structure atteint un état d'équilibre entre chaque étape de calcul, et des phénomènes tels que la relaxation ou le fluage de la structure ne pourront pas être décrits. Dans la suite de ce mémoire, les tests de traction seront effectués à une vitesse de 1 mm/s en considérant que la vitesse de déformation imposée à l'échelle de la structure est assez proche de la vitesse de déformation à l'échelle des fibres. Réciproquement, nous supposons que le comportement des fibres caractérisé expérimentalement à 1 mm/s est assez proche du comportement des fibres à l'intérieur de la matrice sollicitée à la même vitesse. De plus, cette loi de comportement a été définie à partir d'essais de

traction réalisés dans un environnement sec ; les paramètres de cette loi pourront donc être ajustés dans le futur pour prendre en compte un potentiel effet du milieu de culture sur leur comportement mécanique.

3.2. Description du code de calcul

Le code de calcul qui va être utilisé pour la modélisation de la réponse mécanique de la matrice tressée multicouche a été présenté en détail à plusieurs reprises [Durville2005][Durville2007][Durville2009][Durville2009a]. Nous allons donc nous limiter à en exposer les grandes lignes. Ce code est dédié à la simulation mécanique de milieux fibreux dans un cadre de grandes déformations, permettant de tenir compte d'interactions de contact-frottement pour un grand nombre de fibres.

3.2.1 Transformation géométrique

Chaque fibre est modélisée par une succession de poutres, représentées par des éléments quadratiques à trois nœuds dont la cinématique va être décrite ci-après. Dans une configuration de référence fictive, les sections sont définies par leur centre et par deux vecteurs directeurs \mathbf{D}_1 et \mathbf{D}_2 . Chaque point matériel ξ de l'élément poutre peut être ainsi localisé par ses coordonnées (ξ_1, ξ_2, s) avec ξ_1, ξ_2 ses coordonnées dans la section et s son abscisse curviligne. Ainsi, la position $\mathbf{X}(\xi, t)$ de ce point matériel à l'instant $t=0$ peut s'écrire comme suit :

$$\begin{aligned} \mathbf{X}(\xi, 0) &= \mathbf{X}_0(s, 0) + \xi_1 \mathbf{D}_1(s, 0) + \xi_2 \mathbf{D}_2(s, 0) \\ \xi &= (\xi_1, \xi_2, s) \end{aligned} \quad (13)$$

avec \mathbf{X}_0 le vecteur position du centre de la section. À l'instant t , nous adopterons pour la position de la même particule les notations :

$$\begin{aligned} \mathbf{x}(\xi, t) &= \mathbf{x}_0(s, t) + \xi_1 \mathbf{d}_1(s, t) + \xi_2 \mathbf{d}_2(s, t) \\ \xi &= (\xi_1, \xi_2, s) \end{aligned} \quad (14)$$

Une représentation de ces différents vecteurs pour les configurations de référence et actuelle est donnée ci dessous (Illustration III 13).

On peut donc également facilement décrire le déplacement de chaque point matériel à l'instant t à partir de la relation :

$$\begin{aligned} \mathbf{u}(\xi, t) &= \mathbf{x}(\xi, t) - \mathbf{X}(\xi, 0) = \mathbf{u}_0(s, t) + \xi_1 \mathbf{h}_1(s, t) + \xi_2 \mathbf{h}_2(s, t) \\ \xi &= (\xi_1, \xi_2, s) \end{aligned} \quad (15)$$

avec \mathbf{u}_0 le déplacement du centre de la section, et $(\mathbf{h}_1, \mathbf{h}_2)$ les variations des vecteurs directeurs $(\mathbf{d}_1,$

d_2) exprimés dans un repère cartésien.

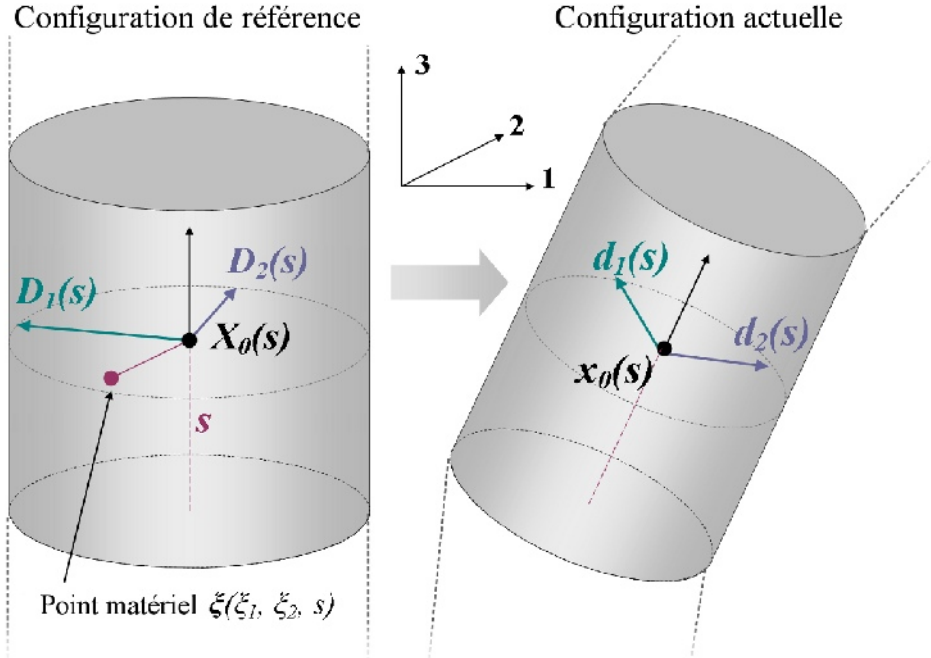


Illustration III 13: Vecteurs directeurs D_1 et D_2 dans une section quelconque d'abscisse curviligne s pour les configurations de référence et actuelle.

La méthode des éléments finis consiste à déterminer une quantité en tout point de l'élément fini par interpolation (ici quadratique) à partir des valeurs de cette quantité aux nœuds de l'élément. Ainsi, par exemple, les trois quantités x_0 , d_1 et d_2 au point d'abscisse curviligne s et à l'instant t peuvent être interpolés à partir de leur valeur aux trois nœuds N_1 , N_2 et N_3 de l'élément poutre selon l'expression :

$$\begin{aligned} x_0(s, t) &= \sum_{(i=1,2,3)} w_i(s) x_0(N_i, t) \\ d_1(s, t) &= \sum_{(i=1,2,3)} w_i(s) d_1(N_i, t) \\ d_2(s, t) &= \sum_{(i=1,2,3)} w_i(s) d_2(N_i, t) \end{aligned} \quad (16)$$

où $w_i(s)$ est la fonction de base associée au nœud N_i . La fonction de base w_i est égale à 1 au nœud N_i et nulle aux autres nœuds, ce qui donne dans notre cas :

$$\begin{aligned} w_1(s) &= 2(s-1)(s-0.5) \\ w_2(s) &= 4s(1-s) \\ w_3(s) &= 2s(s-0.5) \end{aligned} \quad (17)$$

Les variations des vecteurs directeurs d_1 et d_2 sont libres et n'obligent pas ces vecteurs à être orthogonaux ou égaux en norme. Ainsi, la modélisation des cisaillements et compressions

transverses est rendue possible, et une loi de comportement tridimensionnelle comme celle présentée précédemment peut donc être considérée.

La résolution générale du problème est réalisée ensuite à l'aide du principe des travaux virtuels, qui doit inclure dans notre cas les travaux virtuels des efforts internes de l'ensemble des fibres ainsi que les travaux virtuels issus des interactions de contact-frottement. Appelons \mathbf{u}_{ad}^J l'ensemble des champs de déplacements cinématiquement admissibles pour la fibre J et qui respectent les conditions aux limites définies au préalable à ses extrémités, le problème peut se poser ainsi :

$$\text{Trouver } (\mathbf{u}^1, \dots, \mathbf{u}^n) \in \mathbf{u}_{ad}^1 \times \dots \times \mathbf{u}_{ad}^n \text{ tels que, } \forall (\mathbf{v}^1, \dots, \mathbf{v}^n) \in \mathbf{u}_{ad}^1 \times \dots \times \mathbf{u}_{ad}^n, \text{ on a :} \quad (18)$$

$$\sum_{J=1}^n (Wint^J(\mathbf{u}^J, \mathbf{v}^J) + Wcf(\mathbf{u}^1, \dots, \mathbf{u}^n, \mathbf{v}^1, \dots, \mathbf{v}^n)) = 0$$

où \mathbf{u} correspond au champ de déplacements généralisé et \mathbf{v} au champ des déplacements virtuels, et n correspond au nombre de fibres qui composent la structure. $Wint$ et Wcf représentent respectivement le travail virtuel des efforts internes de la fibre J et le travail virtuel dû aux interactions de contact-frottement entre les fibres. $Wint^J$ s'écrit à partir du second tenseur de Piola-Kirchhoff \mathbf{S} et du tenseur de Green-Lagrange \mathbf{E} de la façon suivante:

$$Wint^J(\mathbf{u}^J, \mathbf{v}^J) = \int_{\Omega_0} Tr(\mathbf{S}(\mathbf{u}^J) \cdot \delta \mathbf{E}(\mathbf{u}^J)) d\omega \quad \text{avec} \quad \delta \mathbf{E}(\mathbf{u}^J) = \frac{d\mathbf{E}}{d\mathbf{u}}(\mathbf{u}^J) \cdot \mathbf{v}^J \quad (19)$$

où Ω_0 représente le domaine occupé par la fibre. Nous allons voir ci-dessous comment il est possible de formuler le travail virtuel dû aux interactions de contact-frottement Wcf .

3.2.2 Modélisation du contact entre fibres

Une attention particulière est portée à la détection des contacts entre les fibres, et à la modélisation des interactions. Des zones de proximité associant des paires de portions de fibres susceptibles d'entrer en contact sont d'abord sélectionnées à partir d'un critère de distance (Illustration III 14). Pour chaque zone de proximité, une géométrie intermédiaire est définie à partir de la moyenne des deux portions de fibres susceptibles d'entrer en contact. Cette géométrie intermédiaire est ensuite utilisée pour discrétiser la recherche de contact, et pour définir une direction de recherche de contact perpendiculaire à cette géométrie. La recherche de contact consiste alors à trouver pour un point précis de la géométrie intermédiaire quelle paire de points matériels appartenant aux surfaces des fibres sont susceptibles d'entrer en contact (Illustration III 14). Ainsi, cette définition des contacts traite de façon entièrement symétrique les deux fibres qui interagissent à partir d'une géométrie intermédiaire, contrairement aux méthodes classiques de type maître/esclave selon lesquelles le contact de deux entités est considéré à partir d'une entité de référence.

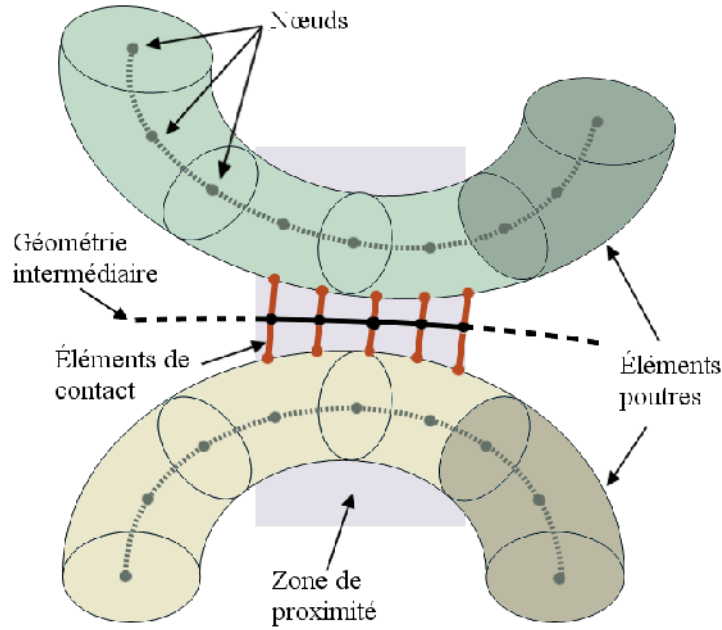


Illustration III 14 : Algorithme de recherche de contact entre deux fibres. Une géométrie intermédiaire est construite dans une zone de proximité, puis utilisée pour générer des éléments de contact constitués de paires de points matériels susceptibles d'entrer en contact.

Plaçons nous à un point noté k de la géométrie intermédiaire, défini par son abscisse curviligne ζ_k selon cette géométrie. Appelons $\xi_C^I(\zeta_k)$ et $\xi_C^J(\zeta_k)$ les deux points matériels appartenant aux surfaces des fibres I et J , et qui constituent l'élément de contact C_k généré en ce point d'abscisse curviligne ζ_k . Le contact entre les deux fibres nécessite tout d'abord la construction d'une direction normale de contact $N_C^{IJ}(\zeta_k)$ dans laquelle on peut mesurer la distance entre la paire de points matériels. Ensuite, une fonction *gap* qui mesure la distance entre les deux points $\xi_C^I(\zeta_k)$ et $\xi_C^J(\zeta_k)$ selon cette normale peut donc être construite :

$$gap(\zeta_k) = (\mathbf{x}(\xi_C^I(\zeta_k)) - \mathbf{x}(\xi_C^J(\zeta_k)), \mathbf{N}_C^{IJ}(\zeta_k)) \quad (20)$$

Pour formuler la condition de contact, nous pouvons contraindre cette fonction à rester positive quel que soit le point de la géométrie intermédiaire considéré.

L'interaction de contact-frottement $\mathbf{R}_{cf}^{IJ}(\zeta_k)$ entre les fibres I et J et au niveau de l'élément de contact situé en ζ_k est décomposée en une composante normale $\mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k)$ due au contact et une composante tangentielle $\mathbf{R}_T^{IJ}(\zeta_k)$ due au frottement entre les fibres. Le terme $\mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k)$ est formulé à partir d'une méthode des pénalités faisant intervenir un coefficient de pénalité k_c . Pour éviter les discontinuités de rigidités entre la condition de non-contact, où $\mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k)$ est nul, et la condition de contact, où $\mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k)$ est proportionnel à k_c , une évolution quadratique est tout d'abord considérée

pour des pénétrations inférieures à un seuil noté p . On peut donc exprimer $\mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k)$ de la façon suivante :

$$\begin{aligned} \mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k) &= \mathbf{0} & \text{si } gap(\zeta_k) > 0 \\ \mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k) &= \frac{k_c}{2p} gap^2 \mathbf{N}_C^{IJ}(\zeta_k) & \text{si } -p \leq gap(\zeta_k) \leq 0 \\ \mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k) &= -k_c (gap + p/2) \mathbf{N}_C^{IJ}(\zeta_k) & \text{si } gap < -p \end{aligned} \quad (21)$$

Le coefficient de pénalité k_c est localement ajusté de manière à ce que la pénétration dans chaque zone de proximité reste inférieure à un seuil donné.

En ce qui concerne la composante tangentielle $\mathbf{R}_T^{IJ}(\zeta_k)$, nous pouvons exprimer le déplacement relatif $\mathbf{u}_C(\zeta_k)$ entre les deux points matériels $\xi_C^I(\zeta_k)$ et $\xi_C^J(\zeta_k)$ dans la direction tangentielle de la façon suivante :

$$\mathbf{u}_T(\zeta_k) = (\mathbf{I} - \mathbf{N}_C^{IJ} \otimes \mathbf{N}_C^{IJ}) \cdot (\mathbf{u}^I(\xi_C^I(\zeta_k)) - \mathbf{u}^J(\xi_C^J(\zeta_k))) \quad (22)$$

La réaction tangentielle $\mathbf{R}_T^{IJ}(\zeta_k)$ entre les fibres I et J au niveau de l'élément de contact C_k est donnée par la relation ci-dessous :

$$\begin{aligned} \mathbf{R}_T^{IJ}(\zeta_k) &= \mu \|\mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k)\| \frac{\mathbf{u}_T(\zeta_k)}{u_{max}} & \text{si } \|\mathbf{u}_T(\zeta_k)\| \leq u_{max} \\ \mathbf{R}_T^{IJ}(\zeta_k) &= \mu \|\mathbf{R}_N^{IJ}(\zeta_k)\| \frac{\mathbf{u}_T(\zeta_k)}{\|\mathbf{u}_T(\zeta_k)\|} & \text{sinon.} \end{aligned} \quad (23)$$

La réaction tangentielle est donc d'abord proportionnelle au déplacement relatif entre les extrémités de l'élément de contact, puis constante pour cet élément de contact après dépassement d'un seuil de déplacement u_{max} .

De cette façon, nous pouvons définir le travail virtuel $w_{cf}(\zeta_k)$ des interactions de contact-frottement au niveau de l'élément de contact C_k de la façon suivante :

$$w_{cf}(\zeta_k) = (\mathbf{R}_{cf}^{IJ}(\zeta_k), \mathbf{v}^J(\xi_C^J(\zeta_k)) - \mathbf{v}^I(\xi_C^I(\zeta_k))) \quad (24)$$

Ainsi, si nous notons n_k le nombre de points de la géométrie intermédiaire entre les fibres I et J en lesquels des éléments de contacts sont générés, le travail virtuel des interactions de contact-frottement entre cette paire de fibres peut être formulée de la façon suivante :

$$W_{cf}^{IJ} = \sum_{k=1}^{n_k} w_{cf}(\zeta_k) \quad (25)$$

3.3. Application à la géométrie de la matrice de support

Le code partiellement détaillé précédemment a été appliqué à la simulation de matériaux

fibres aléatoires [Durville2005], pour des tissus [Durville2009a] et pour la simulation de nœuds [Durville2012]. Le cas de la tresse multicouche est différent de ces dernières applications en termes de pilotage des conditions aux limites et de détermination de la configuration initiale : ces deux points vont être détaillés ci-dessous. La simulation d'un essai de traction et/ou torsion et l'exploitation des résultats seront également présentés ci-après.

3.3.1 Configuration de référence

Comme évoqué précédemment, le code de calcul utilisé permet de calculer une configuration initiale à partir d'une configuration de référence où les fibres sont interpénétrées et qui doit rendre compte de la géométrie « grossière » de l'assemblage de fibres. Dans notre cas, les fibres ont été représentées par des hélices de rayon r , de pas P , de rayon d'enroulement R et de longueur L (Illustration III 15). Le pas de tressage utilisé est le même que dans la partie précédente, et il est donc issu d'une approche empirique donnée en annexe (Annexe 2 : Détermination empirique du pas de tressage). Le rayon d'enroulement R dépend naturellement de la couche dans laquelle se trouve la fibre, et les fibres d'une même couche sont donc totalement interpénétrées dans cette configuration. Afin de supprimer cette interpénétration, il est nécessaire de définir le schéma de tressage qui contrôle l'arrangement des fibres à chaque croisement.

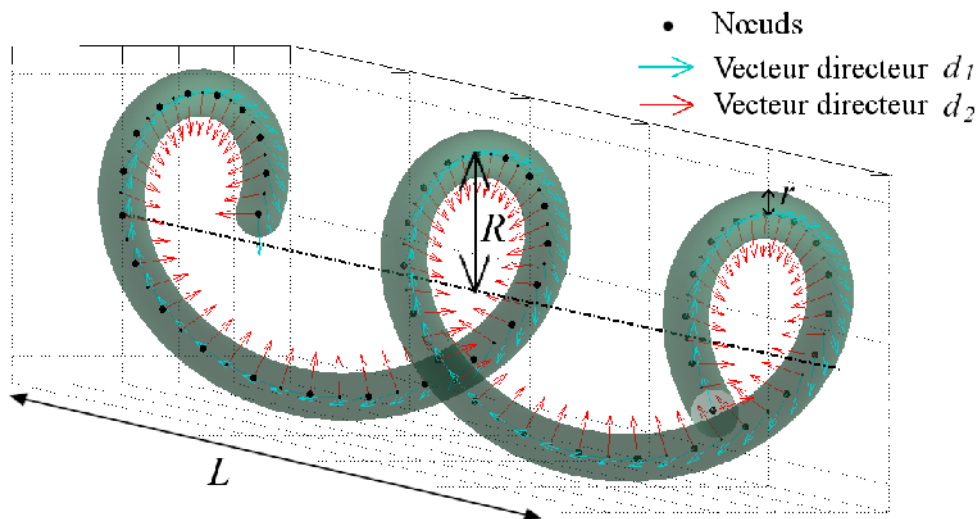


Illustration III 15 : Géométrie hélicoïdale utilisée pour modéliser chaque fibre dans la configuration de référence.

Il existe en effet pour les tresses, comme pour les tissus classiques, plusieurs schémas de tressage qu'on appelle respectivement tressage *Hercules*, *ordinaire* ou *diamant*, suivant que chaque

fibre passe périodiquement « à l'intérieur » et « à l'extérieur » de trois, deux ou une seule autre fibre [Ayranci2010]. Le schéma issu du procédé de tressage décrit dans le chapitre précédent est de type *ordinaire* : on doit donc déterminer pour chaque croisement entre deux fibres d'une même couche laquelle doit être « à l'intérieur » ou « à l'extérieur ». Pour calculer la configuration initiale, l'idée est de laisser les interactions de contact séparer progressivement les fibres initialement interpénétrées. Pour cela, nous fixons temporairement l'orientation de la normale de contact N_C de manière à ce que la séparation se fasse dans la direction souhaitée par rapport au schéma de tressage imposé, et on ne cherche à réduire à chaque étape qu'une portion du *gap*, de manière à se diriger progressivement vers la configuration d'équilibre. La configuration initiale obtenue est donc la solution d'un équilibre mécanique.

3.3.2 Pilotage des conditions aux limites

Le pilotage des conditions aux limites est un point délicat de la simulation de telles structures, dans la mesure où l'on doit autoriser le réarrangement des fibres tout en imposant des conditions globales à des groupes de fibres. Nous allons séparer ici la structure en deux niveaux N_1 et N_2 , constitués respectivement des couches de fibres et des fibres isolées (Illustration III 16). Un corps rigide sera virtuellement attaché aux deux extrémités de chacun des composants des niveaux N_1 et N_2 ; ces deux extrémités seront arbitrairement nommées *gauche* et *droite*. Les corps rigides attachés à gauche et à droite de chacun des composants du niveau i seront notés respectivement C_i^g et C_i^d . Nous allons associer un repère à chacun des composants des niveaux N_1 et N_2 , qui seront notés $\{L, T_1, T_2\}$ et $\{l, t_1, t_2\}$ respectivement, et qui posséderont une direction longitudinale et deux directions transverses (Illustration III 16). Les conditions aux limites pourront être définies dans les repères locaux associés à chaque corps rigide et pilotées par rapport à un repère fixe $\{x, y, z\}$. Nous pourrons imposer des rotations \mathbf{R} et des déplacements \mathbf{u} dans un repère global ou de façon relative entre les différents niveaux hiérarchiques. Nous pourrons également imposer un déplacement

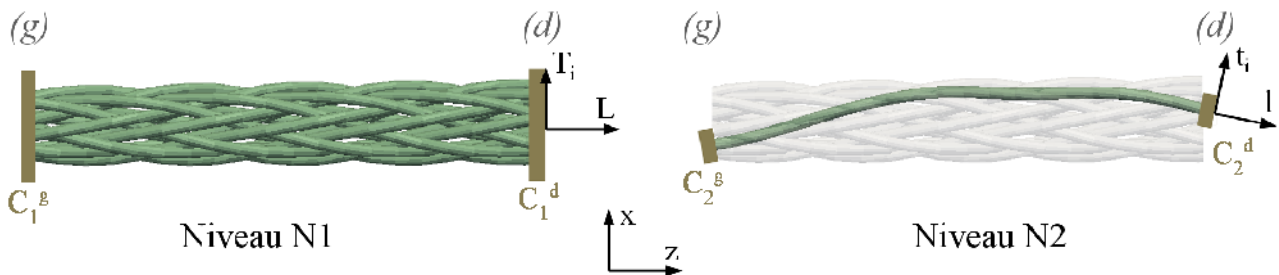


Illustration III 16: Définition des niveaux, des corps rigides et des repères utilisés pour le pilotage des conditions aux limites. Chaque niveau possède deux extrémités gauche (g) et droite (d), auxquelles sont associés des corps rigides C_i et des repères locaux $\{L, T_1, T_2\}$ et $\{l, t_1, t_2\}$.

moyen dans la direction j .

À partir de la configuration de référence, trois types différents de conditions aux limites sont imposés :

- une série d'étapes d'initialisation est consacrée à supprimer l'interpénétration qui existe entre les fibres d'une même couche (Illustration III 17.b).

(i) le déplacement et la rotation des couches sont bloqués par rapport à $\{x, y, z\}$:

$$\begin{aligned} \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} &= \mathbf{0} & \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^d} &= \mathbf{0} \\ \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} &= \mathbf{0} & \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^d} &= \mathbf{0} \end{aligned} \quad (26)$$

(ii) le déplacement des fibres est bloqué relativement au déplacement des couches dans la direction L (les fibres sont libres de se déplacer dans les directions transverses) :

$$u_L^{C_2^g} - u_L^{C_1^g} = 0 \quad u_L^{C_2^d} - u_L^{C_1^d} = 0 \quad (27)$$

(iii) la rotation des fibres est bloquée par rapport à celle des couches :

$$\mathbf{R}_{\{L, t_1, t_2\}}^{C_2^g} - \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} = \mathbf{0} \quad \mathbf{R}_{\{L, t_1, t_2\}}^{C_2^d} - \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^d} = \mathbf{0} \quad (28)$$

(iiii) pour stabiliser le calcul, le déplacement transverse moyen des fibres ainsi que leur rotation moyenne selon l'axe L dans le repère $\{L, T_1, T_2\}$ sont bloqués :

$$\begin{aligned} \tilde{u}_{T_i}^{C_2^g} - u_{T_i}^{C_1^g} &= 0 & \tilde{u}_{T_i}^{C_2^d} - u_{T_i}^{C_1^d} &= 0 & \text{pour } i = \{1, 2\} \\ \tilde{R}_L^{C_2^g} - R_L^{C_1^g} &= 0 & \tilde{R}_L^{C_2^d} - R_L^{C_1^d} &= 0 \end{aligned} \quad (29)$$

- Les étapes précédentes génèrent des tensions dans la structure, qui doivent être relâchées afin de modéliser l'état de la matrice au repos. Un effort F_0 est imposé à droite de chaque couche, l'extrémité gauche étant fixe, de manière à reproduire la tension appliquée lors du procédé de tressage des fibres (Illustration III 17.c).

(i) le déplacement et la rotation des couches dans le repère $\{L, T_1, T_2\}$ sont bloqués à gauche par rapport au repère global $\{x, y, z\}$. À droite, un effort F_0 selon L est appliqué à chaque couche, et la rotation est bloquée par rapport à $\{x, y, z\}$:

$$\begin{aligned} \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} &= \mathbf{0} & F_L^{C_1^d} &= F_0 \\ \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} &= \mathbf{0} & \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^d} &= \mathbf{0} \end{aligned} \quad (30)$$

Cet effort vise à simuler la tension des fibres exercée sur chaque couche lors du procédé de

tressage, et a été estimé à 0,5 N.

(ii) le déplacement des fibres est bloqué relativement au déplacement des couches :

$$\mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^g} - \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} = \mathbf{0} \quad \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^d} - \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^d} = \mathbf{0} \quad (31)$$

(iii) la rotation des fibres est bloquée par rapport à celle des couches :

$$\mathbf{R}_{\{l, t_1, t_2\}}^{C_2^g} - \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} = \mathbf{0} \quad \mathbf{R}_{\{l, t_1, t_2\}}^{C_2^d} - \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^d} = \mathbf{0} \quad (32)$$

- enfin, un essai de traction et/ou torsion peut être simulé en imposant un incrément de déplacement u_0 et/ou d'angle θ_0 à l'extrémité droite de chaque couche (Illustration III 17.d).

(i) le déplacement et la rotation des couches dans le repère dans le repère $\{L, T_1, T_2\}$ sont bloqués à gauche par rapport à $\{x, y, z\}$. À droite, ils sont égaux à u_0 et θ_0 selon L , et nuls dans les autres directions :

$$\begin{aligned} \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} &= \mathbf{0} & u_L^{C_1^d} &= u_0 \\ \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^d} &= \mathbf{0} & R_L^{C_1^d} &= \theta_0 \\ u_{T_i}^{C_1^d} &= 0 & R_{T_i}^{C_1^d} &= 0 \quad \text{pour } i = \{1, 2\} \end{aligned} \quad (33)$$

(ii) le déplacement des fibres est bloqué relativement au déplacement des couches :

$$\mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^g} - \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} = \mathbf{0} \quad \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^d} - \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^d} = \mathbf{0} \quad (34)$$

(iii) la rotation des fibres est bloquée par rapport à celle des couches :

$$\mathbf{R}_{\{l, t_1, t_2\}}^{C_2^g} - \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^g} = \mathbf{0} \quad \mathbf{R}_{\{l, t_1, t_2\}}^{C_2^d} - \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_1^d} = \mathbf{0} \quad (35)$$

Cette série de conditions aux limites permet de déterminer la configuration initiale à partir d'une configuration de référence, puis de simuler des essais de traction et/ou torsion sur la matrice.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

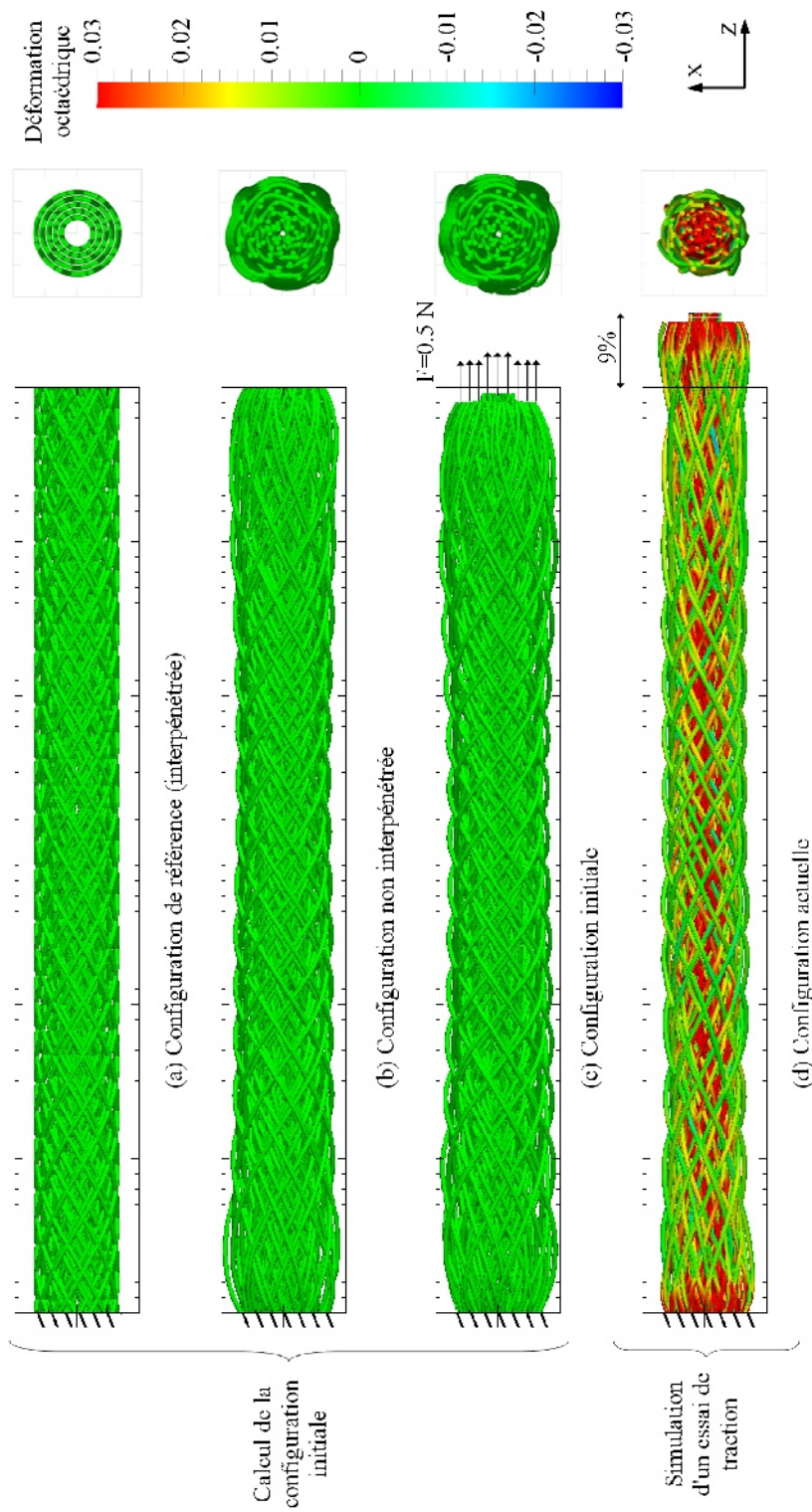


Illustration III 17: Types de conditions aux limites imposées afin de simuler un essai de traction (ici $F_{zz} = 0,09$) à partir d'une configuration de référence (matrice de 5 couches, $h = 100 \text{ mm}$, $d_{\text{fil}} = 165 \text{ }\mu\text{m}$). La configuration initiale est calculée en imposant un pré-tension de $0,5 \text{ N}$ séparément sur chaque couche.

3.3.3 Traitement des résultats

En sortie de chaque étape de calcul, deux types de fichiers textes sont créés :

- le premier contient une description de la géométrie calculée. Dans notre cas, il est constitué dans un premier temps des coordonnées des centres et des vecteurs directeurs \mathbf{d}_1 et \mathbf{d}_2 de chaque section, ainsi que de la connectivité du maillage. Les tenseurs de déformation \mathbf{E} sont disponibles pour chaque nœud du maillage. Ce fichier contient enfin la définition des éléments de contact créés lors du calcul ;
- le second fichier rassemble les efforts et moments (dans les trois directions $\{x, y, z\}$) au niveau de chaque corps rigide dont les conditions aux limites ont été définies dans le repère

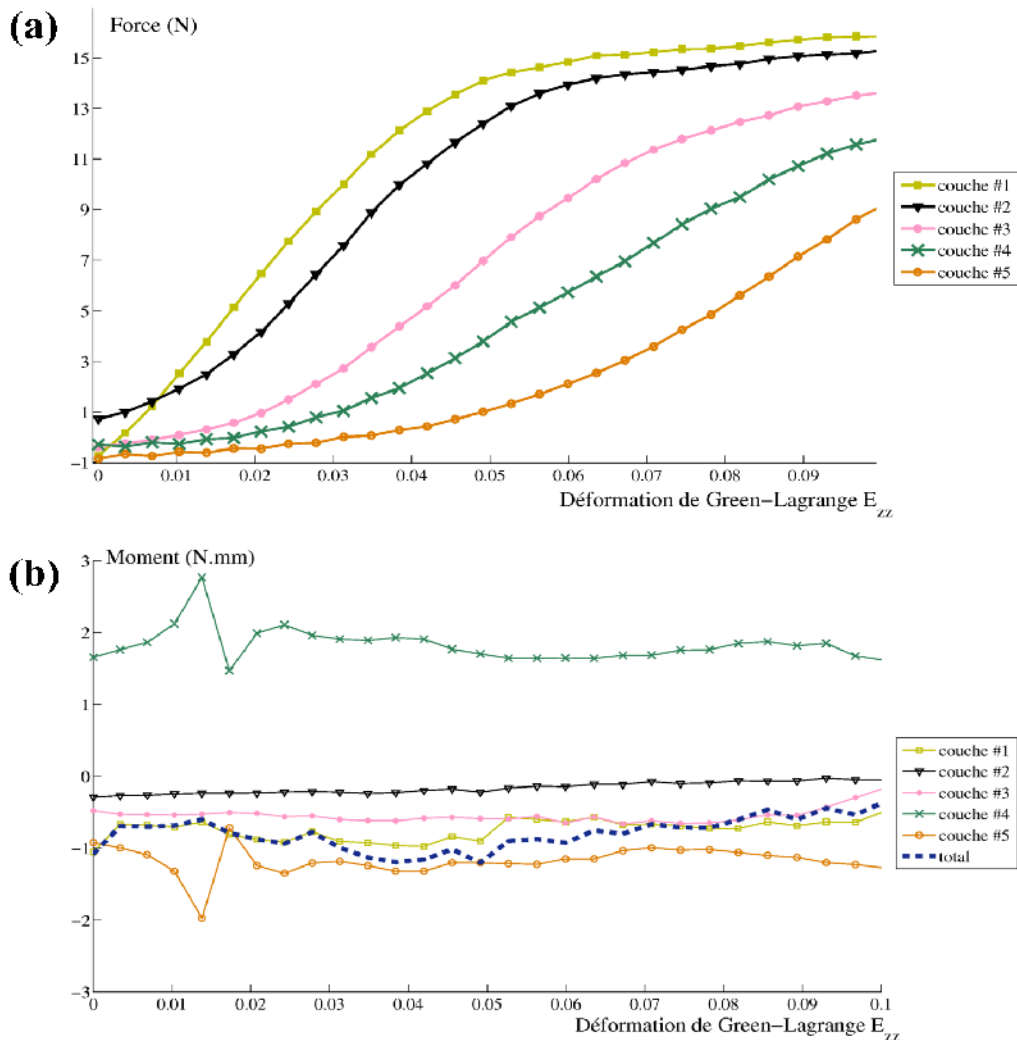


Illustration III 18: (a) Efforts et (b) moments dans chaque couche en fonction de la déformation de Green-Lagrange F_{zz} pour la simulation d'un essai de traction ($F_{zz}=0.01$) sur une matrice de cinq couches. Les couches sont numérotées du centre à la périphérie de la matrice.

global $\{x, y, z\}$. Dans notre cas, ce second fichier contient donc les efforts et les moments par rapport au repère $\{L, T_1, T_2\}$ à gauche et à droite de chacune des couches qui composent la matrice.

Des programmes de post-traitement ont été créés afin de tracer les courbes de réponse en effort-déformation. Ces courbes sont calculées pour chaque couche de façon individuelle, puis sommées afin d'obtenir la réponse globale de la structure. La même démarche peut être adoptée concernant la rigidité en torsion de la matrice, en reliant la déformation angulaire globale de la matrice et les moments calculés pour chaque couche qui la compose. À titre illustratif, nous avons représenté ci-dessus les efforts et les moments séparément dans chaque couche en fonction de la déformation de Green-Lagrange E_{zz} , pour un essai de traction à 10% sur une matrice de 5 couches (Illustration III 18).

Nous pouvons remarquer que la répartition des efforts au sein des couches est hétérogène, et que les couches les plus extérieures participent progressivement à s'opposer au déplacement imposé à la structure (Illustration III 18.a). De plus, selon l'illustration III 18.b, nous constatons que les moments considérés séparément dans chaque couche ainsi que la somme de ces moments ne sont pas nuls ; en effet, la rotation de l'ensemble des couches est bloquée lors d'essais de traction (équation 33), ce qui peut générer des moments résiduels, néanmoins relativement faibles.

Dans un second temps, une suite de programmes est mise en œuvre afin de représenter l'état de déformation des fibres en surface. Un maillage surfacique triangulaire est généré à partir de la définition de chaque section, puis les tenseurs de Green-Lagrange (calculés selon l'expression 3) en chaque nœud de ce nouveau maillage sont évalués par interpolation à partir d'une décomposition au premier ordre, en considérant une partie du tenseur constant dans toute la section et des variations linéaires du tenseur selon les vecteurs d_1 et d_2 . Dans notre cas, nous avons choisi d'affecter à chacun de ces nœuds un scalaire correspondant à la déformation octaédrique des fibres (équation 1), en raison de son utilisation privilégiée pour représenter la distorsion susceptible d'être ressentie par la cellule [Lacroix2006]. On pourrait, bien entendu, envisager de considérer d'autres descripteurs de cette déformation, comme la valeur de la déformation principale notamment. Ce post-traitement conduit à la visualisation de l'état de déformation superficielle pour chaque itération de calcul effectué pendant la simulation (Illustration III 17).

Le coefficient μ qui intervient dans l'équation 23 doit prendre en compte le matériau constitutif des fibres ainsi que leur état de surface. Or, des études préliminaires ont permis de se rendre compte que ce coefficient de frottement n'avait pas d'effet significatif sur le comportement simulé en traction uniaxiale de la matrice. À titre d'exemple, nous avons représenté ci-dessous (Illustration III 19) un test de traction uniaxiale pour des coefficients μ valant 0,1 et 0,5, à partir de la même

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

configuration initiale pour une matrice de cinq couches. Il était possible de s'attendre à ce qu'une augmentation du coefficient de frottement se traduise par une modification de la capacité des fibres à se ré-arranger et à s'aligner selon la direction de chargement. Or, nous constatons que l'effet du coefficient de frottement est insignifiant en comparaison à la variabilité qui existe parmi les résultats des simulations (variabilité due à la définition aléatoire de la disposition relative des couches dans la configuration de référence). Cette insignifiance du coefficient de frottement est due au faible glissement relatif entre les fibres de la matrice lors de la simulation d'un essai de traction uniaxiale sur une structure tressée multicouche. En effet, l'arrangement des fibres dans la direction de la sollicitation se traduit essentiellement par des variations des angles que forment les fibres entre elles à chaque croisement, et n'induisent donc pas de glissements importants. En revanche, il est important de souligner que cela ne sera certainement plus vrai dans le cas de sollicitations plus complexes.

Les données disponibles dans la littérature concernant les coefficients de frottement entre fibres sont relativement rares, et les protocoles associés sont souvent complexes [Sinoimeri2009]. Dans le cadre de cette étude, le coefficient de frottement a été arbitrairement fixé à $\mu=0,1$.

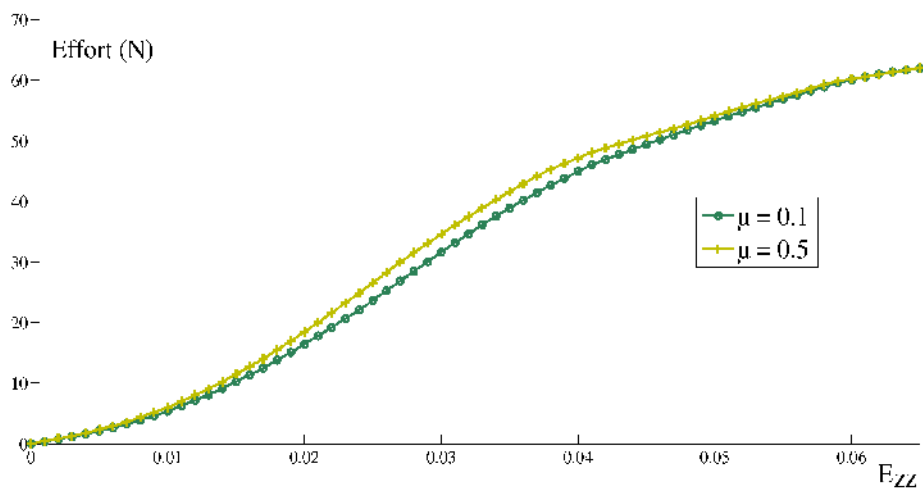


Illustration III 19: Effet du coefficient de frottement sur la réponse en traction d'une matrice de cinq couches.

L'arrangement entre les fibres lors de sollicitations axiales se traduit principalement par une contraction radiale de la structure pouvant être décrite par un coefficient de Poisson global apparent. Cette contraction radiale de la structure est importante dans la mesure où elle va se traduire par une diminution de la taille des pores à l'intérieur de la matrice, et par la création d'une circulation de milieu de culture lors de sollicitations mécaniques : ce point sera abordé plus en détail en section V.3.3. Cet effet peut être mis en exergue par la représentation des variations relatives du diamètre externe de la matrice dans sa partie centrale en fonction de la déformation macroscopique imposée

selon son axe, comme c'est le cas ci-dessous avec toujours la même matrice que précédemment (Illustration III 20). Si l'on considère le phénomène comme linéaire dans une première approximation, nous constatons que le «coefficient de Poisson *effectif*» est supérieur à 1, ce qui traduit bien la capacité de la matrice à se contracter radialement lors d'une déformation axiale.

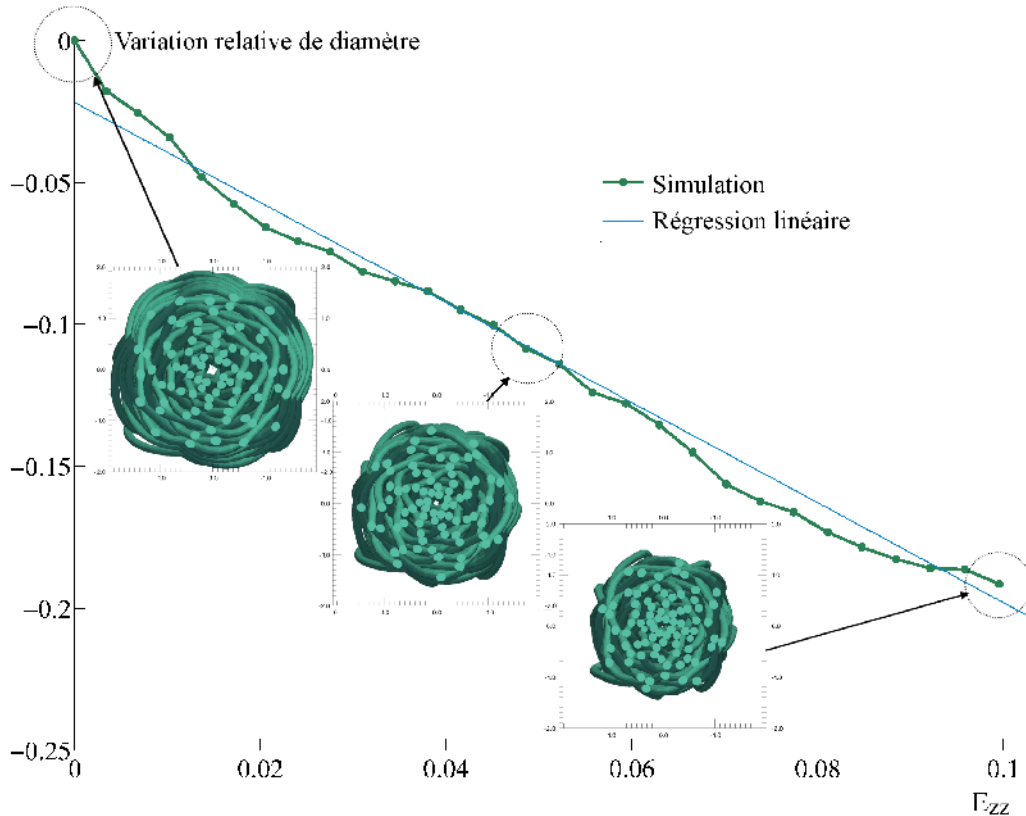


Illustration III 20: Estimation d'un effet Poisson apparent réalisée en considérant les variations relatives du diamètre externe de la matrice en fonction de la déformation E_{zz} lors d'un essai de traction uniaxiale (5 couches, $h=100$ mm, $d_{\text{fibre}}=165\mu\text{m}$).

3.4. Analyse et évaluation des résultats des simulations

3.4.1 Pertinence de la configuration initiale calculée

Nous avons présenté précédemment une modélisation géométrique de la matrice s'appuyant sur l'analyse du procédé de tressage (Illustration III 21.a). Cette géométrie a été comparée à la géométrie de matrices réelles, et il en a été déduit que cette modélisation donnait une bonne estimation de la géométrie des matrices réelles, avec une légère sous-évaluation de la compacité des fibres au sein de la matrice. Cette erreur a été expliquée par le fait que la déformation des couches antérieures lors de l'ajout d'une nouvelle couche n'était pas prise en compte. Le code de calcul

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

présenté ici permet en revanche de déterminer une configuration initiale issue d'un équilibre mécanique, qui prend donc en compte la déformation de la structure (Illustration III 21.b). Il en résulte que les géométries issues de ce calcul possèdent un diamètre extérieur globalement inférieur au diamètre extérieur des géométries issues de la modélisation purement géométrique (Illustration III 21.d-e).

On peut remarquer cependant que cela n'est pas vrai si l'on se place au voisinage des extrémités de la matrice, où la modélisation géométrique conduit à un diamètre inférieur à celui de la configuration initiale calculée (Illustration III 21.c). En effet, en raison des conditions aux limites imposées lors du calcul qui laissent les extrémités des fibres libres de se réarranger dans un plan transverse, nous remarquons que les fibres ont une légère tendance à se « détresser » près des extrémités : il est donc nécessaire de se placer suffisamment loin des extrémités pour que ces effets dus aux conditions aux limites disparaissent (principe de Saint-Venant). Nous noterons enfin une différence entre les maillages des géométries issues de la modélisation purement géométrique et du calcul de la configuration initiale (Illustration III 21.f). En effet, le temps de calcul étant bien inférieur dans le cas de la modélisation géométrique, il est possible de considérer un maillage nettement plus fin lors des simulations mécaniques. Cette particularité de la modélisation géométrique pourra amener à la préférer lors du calcul de la distribution des pores dans la matrice : en effet, l'algorithme de détection des pores est sensible à la finesse du maillage de la géométrie utilisée.

Pour comparer la configuration initiale issue des simulations avec la géométrie réelle des matrices, nous avons eu recours aux méthodes détaillées dans la section III.2.2. appliquées à la configuration initiale calculée. Le diamètre extérieur de deux matrices de huit couches ($d_{fibres} = 200 \mu\text{m}$, $h=100 \text{ mm}$) a été mesuré à quatre reprises entre la fabrication de chaque nouvelle couche, et comparés au diamètre extérieur de chaque couche de six configurations initiales calculées (Illustration III 22). Le coefficient de corrélation entre les deux séries de données est de 0,99, et aucune différence significative n'a été trouvée entre les diamètres mesurés et calculés (ANOVA, $p<0,05$). Les sections des matrices réelles (N=8) obtenues par imprégnation des matrices dans de la résine, puis par analyse des coupes réalisées au microtome ont été comparées à différentes sections (N=4) de la configuration initiale calculée. Aucune différence significative n'a été observée entre la densité de fibres dans les sections des géométries réelles et simulées, respectivement $0,237\pm 0,032$ et $0,248\pm 0,011$. De plus, les distributions radiales des fibres dans ces sections (Illustration III 22) montrent des profils similaires, et le coefficient de corrélation entre ces deux types d'informations est de 0,95. Des différences légères sont néanmoins observées au centre de ces sections, révélant que les fibres sont davantage compactées au centre des géométries réelles qu'au centre des géométries simulées.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

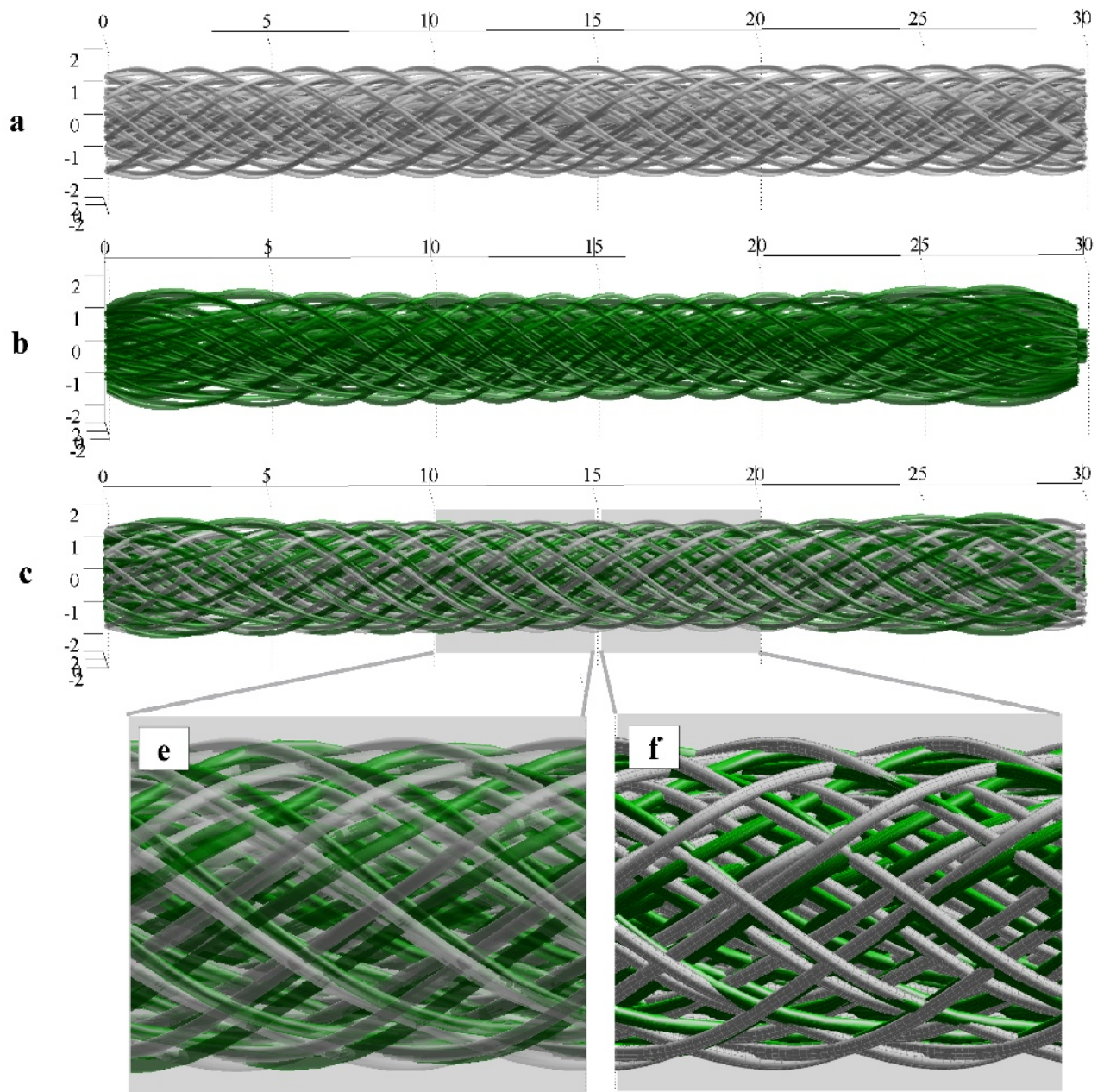


Illustration III 21: (a) Géométrie issue de l'analyse de la cinématique de tressage (b) Configuration initiale issue de l'équilibre mécanique (c) Superposition des deux géométries. (d) et (e): partie centrale de la matrice avec et sans représentation du maillage. (matrice de 5 couches, $h=100$ mm, $d_{\text{fibre}}=165$ μm).

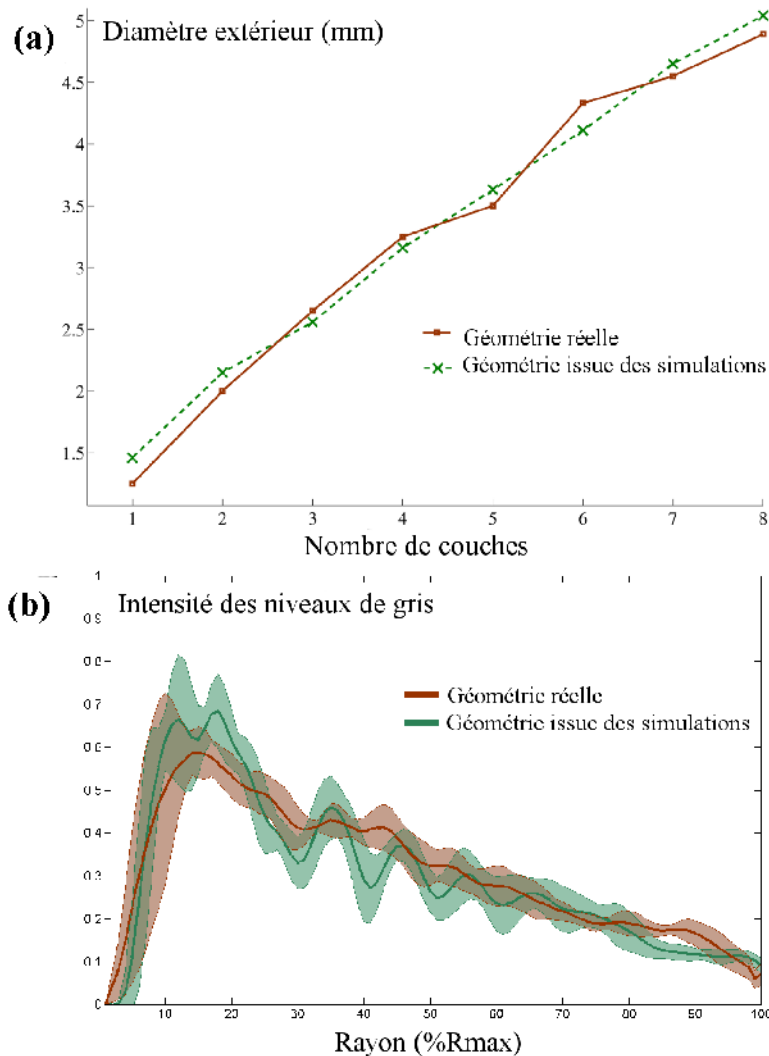


Illustration III 22: Comparaison entre les géométries d'une matrice réelle (8 couches, $d_{\text{libre}}=200 \mu\text{m}$, $h=100 \text{mm}$) et de la configuration initiale correspondante. (a) Comparaison entre les diamètres extérieurs moyens (b) Distribution des fibres dans les sections des matrices.

3.4.2 Protocole de traction uniaxiale des matrices de support

Des essais de traction uniaxiale ont été effectués sur plusieurs configurations de matrices réelles et confrontés aux résultats issus des simulations mécaniques. Des essais préliminaires ont montré que le système d'amarrage des matrices directement par l'intermédiaire des mors auto-serrants de la machine de traction n'évitait pas les glissements, et imposait un écrasement important des extrémités des matrices pouvant influencer sur leur comportement mécanique. Par conséquent, nous avons mis au point un dispositif permettant d'imposer un déplacement par contact aux

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

extrémités de la matrice noyées dans des cylindres de résine (Illustration III 23). Les essais ont été conduits à une vitesse d'allongement égale à 1 mm/s.

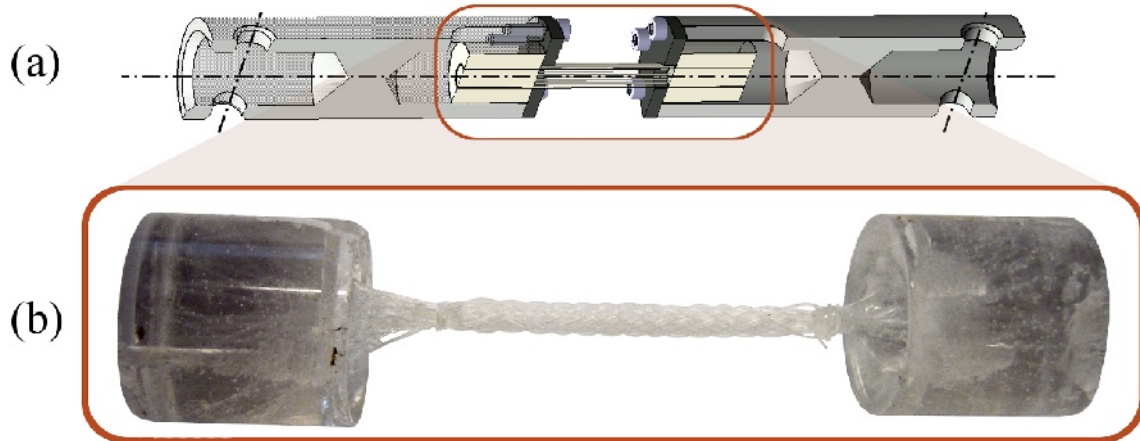


Illustration III 23: (a) Vue en coupe du montage de traction. Le déplacement est imposé par contact avec des cylindres de résine contenant les extrémités de la matrice (b).

Afin de comparer les données expérimentales issues de ces tests de traction avec les résultats des simulations mécaniques, nous avons considéré une série de paramètres descriptifs de la réponse en traction obtenue. Dans un premier temps, nous avons déterminé la droite D tangente à la partie linéaire de la courbe par la méthode des moindres carrés sur une plage définie manuellement. Trois

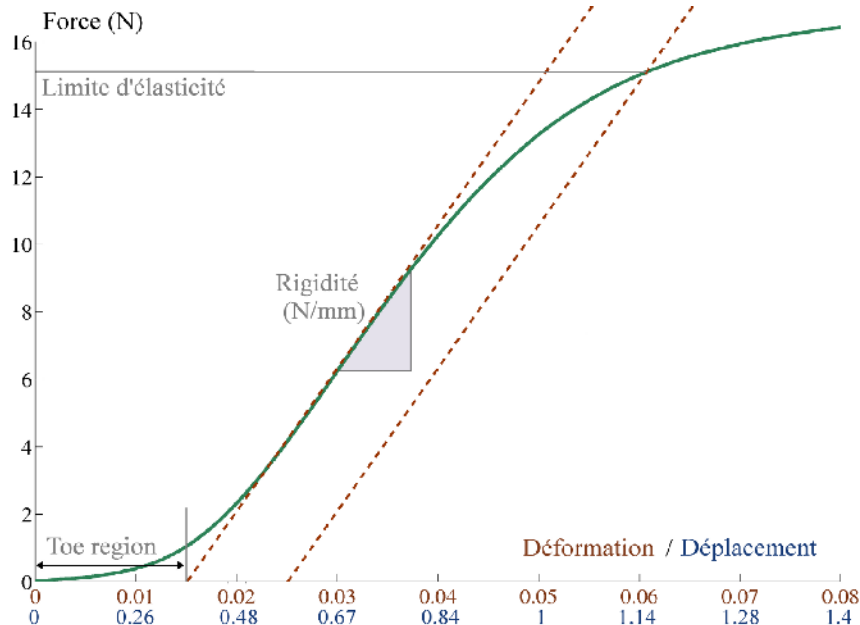


Illustration III 24: Paramètres retenus décrivant la réponse en traction d'une matrice : rigidité, toe region et limite d'élasticité.

paramètres ont ensuite été retenus pour caractériser les réponses obtenues (Illustration III 24) : la rigidité, correspondant à la pente de cette droite D sur une courbe effort/déplacement; la *toe region*, correspondant à l'intersection de cette droite avec l'axe des déformations; la limite d'élasticité, définie par l'effort à l'intersection de la courbe de réponse avec la droite D décalée de 1%.

3.4.3 *Évaluation des résultats des simulations*

Des matrices composées de une, trois et cinq couches ont été testées (N=2) en traction uniaxiale en utilisant le présent protocole. Les réponses issues de ces essais ont été comparées aux résultats de simulations d'essais de traction (N=5) obtenus à l'aide du code de calcul présenté ci-dessus. La synthèse des comparaisons est donnée Illustration III 25 et Tableau III 1.

Le code de calcul permet de reproduire la réponse en traction des matrices avec des erreurs maximales inférieures à 7%, 25% et 5% en ce qui concerne respectivement la *toe region*, la rigidité et la limite d'élasticité. Ces différences, notamment en ce qui concerne la rigidité de la matrice, peuvent être interprétées en fonction des raisons suivantes :

- le comportement mécanique et les dimensions des fibres sont identiques dans toute la matrice lors des simulations. En réalité, ces caractéristiques fluctuent autour d'une valeur moyenne qui a été utilisée pour les simulations, mais peuvent être différentes d'une fibre à l'autre. Par conséquent, alors que l'entrée en plasticité des fibres se fait de manière progressive dans la structure réelle, elle est plus brutale lors des simulations où toutes les fibres présentent un comportement identique (Illustration III 25);
- le pas de tressage de chaque couche de la matrice a été décrit par une loi empirique approchée, ce qui peut entraîner des erreurs significatives par rapport aux matrices réelles ;
- le comportement des fibres constitutives de la matrice a été déterminé pour une vitesse d'allongement fixe, vitesse qui a été conservée lors des essais de traction sur les matrices. Or, le comportement des fibres montre une dépendance vis à vis de la vitesse d'allongement, et il paraît vraisemblable que certaines régions de la matrice soient soumises à des vitesses plus faibles que la vitesse globale à laquelle la matrice est soumise ;
- les conditions aux limites utilisées lors des simulations diffèrent notablement des conditions aux limites imposées expérimentalement à travers l'imprégnation des extrémités des matrices dans la résine.

On notera néanmoins que, compte tenu de la complexité de la structure et des nombreuses interactions de ses différents composants, les méthodes numériques proposées permettent une bonne estimation de la réponse en traction de la matrice.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

| | | Rigidité (N/mm) | Toe region (%) | Limite d'élasticité (N) |
|-----------|------------|-----------------|-----------------|-------------------------|
| 1 couche | Expérience | $14,2 \pm 0,8$ | $1,54 \pm 0,03$ | $15,7 \pm 0,7$ |
| | Simulation | $14,3 \pm 1,0$ | $1,43 \pm 0,18$ | $16,2 \pm 1,1$ |
| | Erreur (%) | 0,7 | 7,1 | 3,1 |
| 3 couches | Expérience | $25 \pm 1,5$ | $1,07 \pm 0,07$ | $41,8 \pm 1,3$ |
| | Simulation | $31,1 \pm 2,8$ | $1,2 \pm 0,17$ | $41,7 \pm 2,9$ |
| | Erreur (%) | 24,4 | 12,1 | 0,2 |
| 5 couches | Expérience | $32,7 \pm 3,0$ | $0,78 \pm 0,07$ | $59,3 \pm 4,1$ |
| | Simulation | $34 \pm 2,6$ | $0,78 \pm 0,07$ | $56,4 \pm 3,9$ |
| | Erreur (%) | 3,9 | 0,1 | 4,9 |

Tableau III 1: Comparaison entre les valeurs de la rigidité, de la toe region et de la limite d'élasticité issues des données expérimentales ($N=2$) et des simulations mécaniques ($N=5$), pour des matrices composées de 1,3 et 5 couches de fibres de $165 \mu\text{m}$ de diamètre.

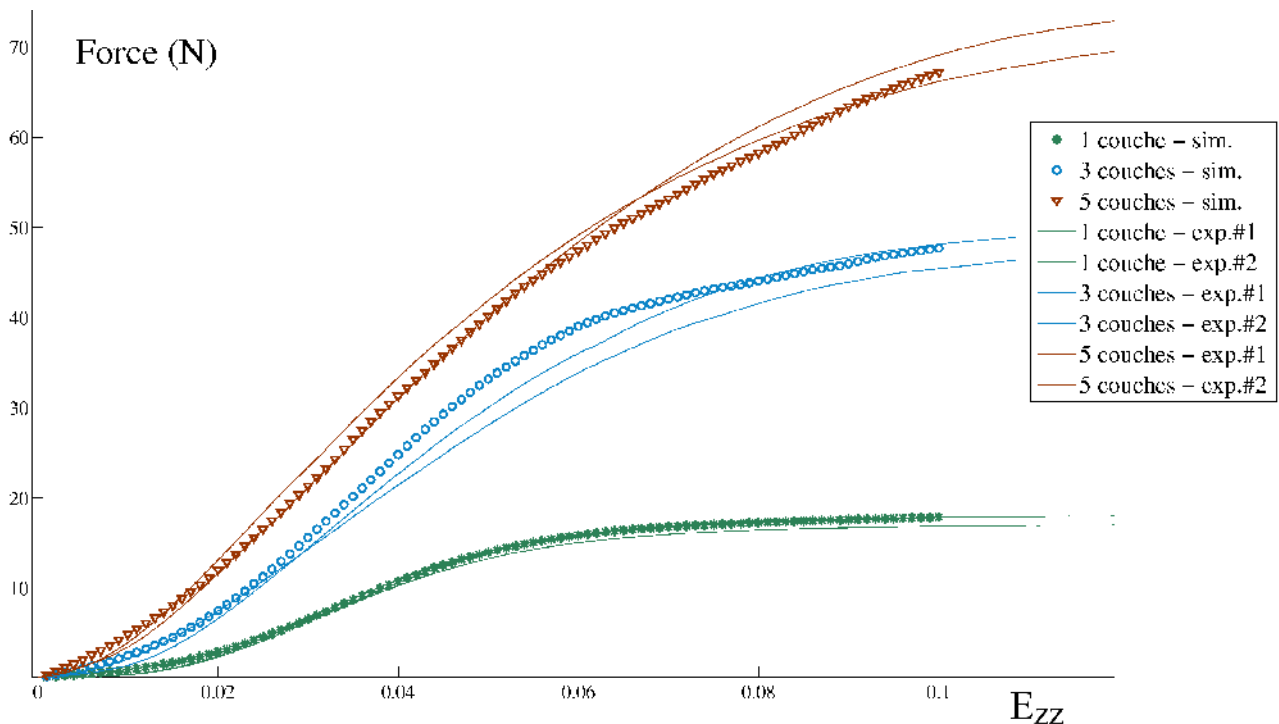


Illustration III 25: Comparaisons entre les données expérimentales (exp.) et la moyenne des résultats des simulations (sim.) pour des tests en traction uniaxiale sur des matrices de 1, 3 et 5 couches ($d_{\text{fibre}}=165 \mu\text{m}$, $h=100 \text{ mm}$).

3.5. Application à une reconstruction double faisceau

Nous avons vu précédemment (I.5.3.) qu'une reconstruction du LCA visant à reproduire sa structure en double faisceau (Illustration I 10) semblait montrer des résultats supérieurs à une reconstruction classique. Les larges possibilités d'ajustement offerte par la matrice tressée multicouche permettent d'envisager de la décliner en une version adaptée à une telle reconstruction double faisceau. Il peut alors être intéressant de comparer le comportement mécanique de ces deux types de substituts, en étendant les simulations présentées ci-dessus au cas d'une structure composée de deux matrices pouvant se torsader. Cela complique le pilotage des conditions aux limites de la structure, que nous allons donc présenter dans cette section.

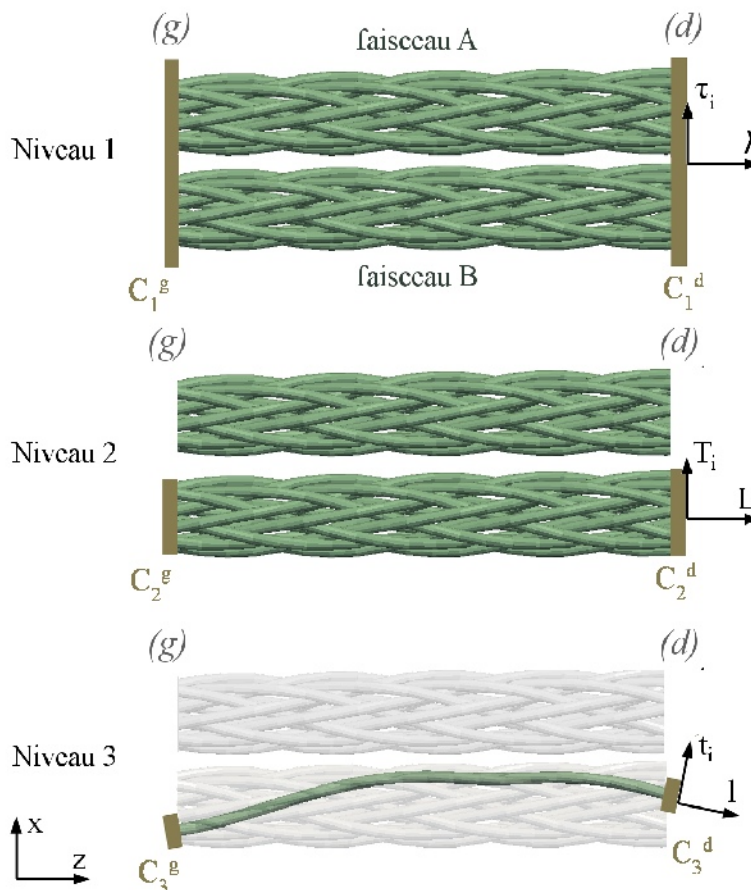


Illustration III 26: Définition des niveaux, des corps rigides et des repères utilisés pour le pilotage des conditions aux limites dans le cas de deux faisceaux A et B. Chaque niveau possède deux extrémités gauche (g) et droite (d), auxquelles sont associés des corps rigides C et des repères locaux.

Afin d'imposer une rotation à la structure constituée des deux matrices multicouches, notées A et B, un niveau hiérarchique supplémentaire est requis. La structure est désormais décomposée en

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

trois niveaux N_1 , N_2 et N_3 correspondant respectivement à l'ensemble des deux faisceaux A et B , aux couches qui composent ces deux faisceaux, et aux fibres isolées (Illustration III 26).

La géométrie issue du calcul de la configuration initiale n'étant pas connue *a priori*, il est délicat de placer les axes des deux faisceaux A et B au début du calcul. Ainsi, nous calculons dans un premier temps les configurations initiales pour les deux faisceaux A et B suffisamment espacés, en suivant les conditions aux limites détaillées dans les équations 26 à 32, en remplaçant les composants 1 et 2 par les composants 2 et 3. La distance d_{min} qui sépare les faisceaux A et B est ensuite supprimée par la suite de conditions aux limites suivantes (Illustration III 27) :

- (i) le déplacement et la rotation de l'ensemble des deux faisceaux sont bloqués par rapport à $\{x, y, z\}$:

$$\begin{aligned} \mathbf{u}_{\{\lambda, \tau_1, \tau_2\}}^{C_1^g} &= \mathbf{0} & \mathbf{u}_{\{\lambda, \tau_1, \tau_2\}}^{C_1^d} &= \mathbf{0} \\ \mathbf{R}_{\{\lambda, \tau_1, \tau_2\}}^{C_1^g} &= \mathbf{0} & \mathbf{R}_{\{\lambda, \tau_1, \tau_2\}}^{C_1^d} &= \mathbf{0} \end{aligned} \quad (36)$$

- (ii) une translation positive pour les couches du faisceau A (composants C_{2A}) et négative pour les couches du faisceau B (composants C_{2B}) est imposée dans la direction τ_1 associée à chaque couche. Les translations dans les autres directions et les rotations dans le repère $\{L, T_1, T_2\}$ sont bloqués par rapport au repère $\{\lambda, \tau_1, \tau_2\}$:

$$\begin{aligned} u_{T_1}^{C_{2A}^g} - u_{T_1}^{C_1^g} &= d_{min}/2 & u_{T_1}^{C_{2A}^d} - u_{T_1}^{C_1^d} &= d_{min}/2 \\ u_{T_1}^{C_{2B}^g} - u_{T_1}^{C_1^g} &= -d_{min}/2 & u_{T_1}^{C_{2B}^d} - u_{T_1}^{C_1^d} &= -d_{min}/2 \\ u_{T_2}^{C_2^g} - u_{T_2}^{C_1^g} &= 0 & u_{T_2}^{C_2^d} - u_{T_2}^{C_1^d} &= 0 \\ u_{\lambda}^{C_2^g} - u_{\lambda}^{C_1^g} &= 0 & u_{\lambda}^{C_2^d} - u_{\lambda}^{C_1^d} &= 0 \\ \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^g} &= \mathbf{0} & \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^d} &= \mathbf{0} \end{aligned} \quad (37)$$

- (iii) le déplacement des fibres est bloqué relativement au déplacement des couches :

$$\mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_3^g} - \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^g} = \mathbf{0} \quad \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_3^d} - \mathbf{u}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^d} = \mathbf{0} \quad (38)$$

- (iiii) la rotation des fibres est bloquée par rapport à celles des couches :

$$\mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_3^g} - \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^g} = \mathbf{0} \quad \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_3^d} - \mathbf{R}_{\{L, T_1, T_2\}}^{C_2^d} = \mathbf{0} \quad (39)$$

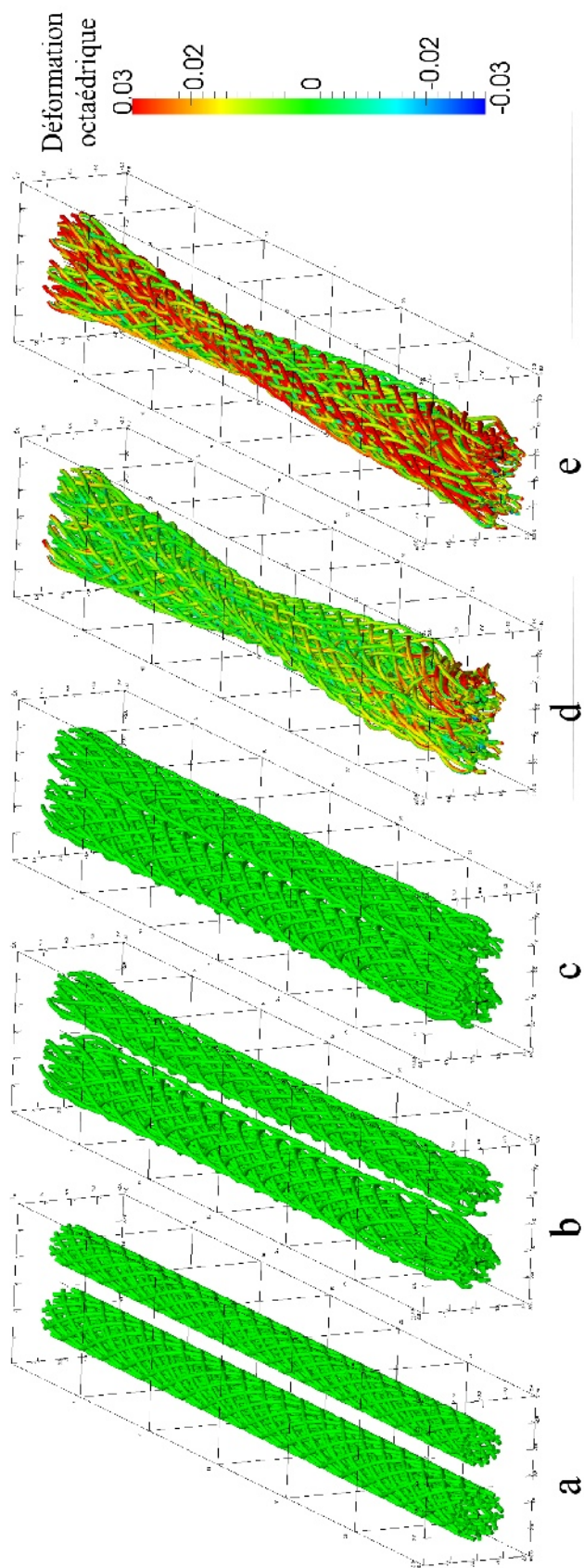


Illustration III 27. Simulation d'un essai de traction sur deux faisceaux torsadés. A partir de la configuration de référence (a), les différentes étapes sont : (b) le calcul de la configuration initiale pour les deux faisceaux séparés, (c) le rapprochement des deux faisceaux, (d) le torsadage des deux faisceaux, et (e) l'essai de traction.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

On peut alors imposer une torsion et/ou un déplacement à l'ensemble des deux faisceaux (Illustration III 27), en imposant des conditions similaires à celles décrites dans les équations 33 à 35, en faisant correspondre les indices. À titre illustratif, nous avons représenté ci-dessus (Illustration III 27) les résultats d'une simulation pour une structure qui contient le même nombre de fibres que la structure représentée en Illustration III 17, composée de deux faisceaux de deux et trois couches chacun. Les deux faisceaux sont d'abord torsadés à 180° , puis un essai de traction uniaxiale est simulé. De plus, nous avons comparé ci-dessous (Illustration III 28) les résultats des simulations représentés en Illustration III 17 (un faisceau, 5 couches, $h=100$ mm, $d_{\text{fibre}}=165$ μm) et Illustration III 27 (deux faisceaux, 3+2 couches, $h=100$ mm, $d_{\text{fibre}}=165$ μm). Nous pouvons nous apercevoir que la rigidité du double faisceau est supérieure à celle du simple faisceau, pour un même nombre de fibres. Cela est dû au fait que, comme nous l'avons vu précédemment, les couches extérieures participent progressivement à supporter la charge imposée à la matrice ; dans le cas du double faisceau, les fibres s'opposent donc davantage au déplacement imposé. En revanche, ce recrutement progressif des fibres dans le cas du simple faisceau agit comme une « sécurité » pour éviter la rupture de la structure, sécurité qui est alors moins présente dans le cas de la matrice double faisceau. Nous pouvons remarquer également que dans le cas du double faisceau, la répartition des déformations octaédriques dans la matrice lors d'essai de traction peut être radicalement différente de celle observée lors d'essai de traction sur un seul faisceau (Illustration III 17 et III 27).

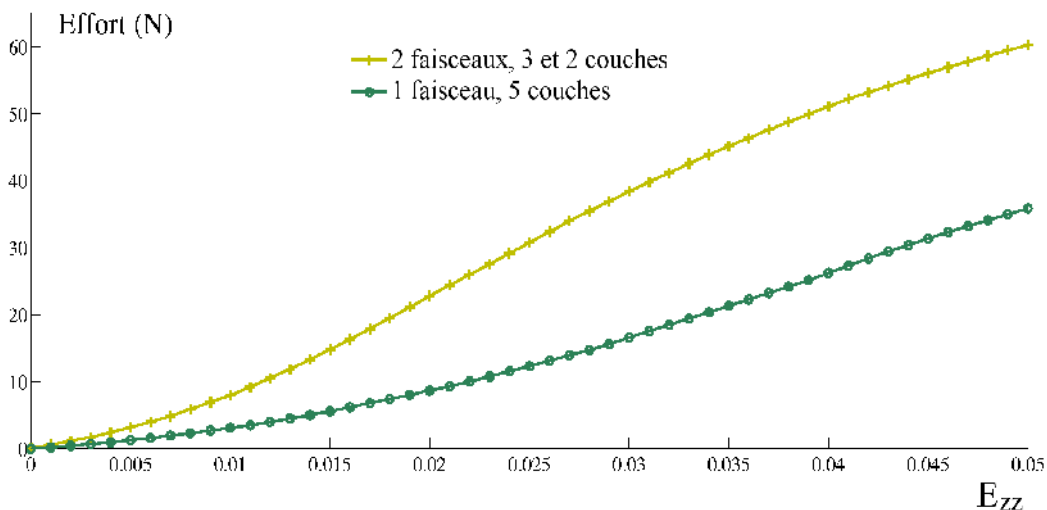


Illustration III 28: Comparaison des réponses de deux structures simple et double faisceaux, pour un même nombre de fibres.

L'extension de cet outil numérique au cas d'une reconstruction double faisceau permettra, par la suite, d'envisager de comparer la réponse mécanique sous différents types de sollicitations des deux types de reconstructions. Cela présume néanmoins une bonne connaissance de la localisation 3D des zones d'insertions des deux faisceaux, ainsi que des sollicitations appliquées au deux faisceaux

séparément lors d'exercices de réhabilitation classiques ; ces données sont, pour l'instant, peu présentes dans la littérature et pourraient nécessiter la mise en place d'études supplémentaires basées sur des données d'imagerie 3D.

4. Sélection d'un jeu de paramètres pour la matrice de support

Dans cette section, nous allons tenter d'évaluer les effets des paramètres du procédé sur certaines propriétés de la matrice de support en nous servant des outils de modélisation présentés ci-dessus, et de proposer une matrice adaptée au cahier des charges. Nous nous limiterons au cas d'une reconstruction simple faisceau car, comme nous venons de l'évoquer partiellement, une extension au cas du double faisceau nécessiterait de définir un cahier des charges différents concernant la fonction et les propriétés de chacun des deux faisceaux, et de connaître précisément la cinématique des deux faisceaux afin de pouvoir simuler le comportement mécanique de l'ensemble. Ces aspects n'ont pas été considérés dans la présente étude, mais ils en constituent en revanche une perspective évidente.

4.1. Effet des paramètres du procédé sur la morphologie

La morphologie de la matrice dépend des paramètres de procédés tels que le diamètre des fibres, la hauteur h séparant les deux plateaux du dispositif de tressage et le nombre de couches. L'algorithme présenté en section III.2.3. permet d'estimer, quantitativement, l'influence de ces paramètres sur la distribution des tailles de pores au sein de la matrice. Ainsi, cette distribution a été caractérisée pour des matrices ($N=8$) comprenant 2, 4 et 6 couches, des paramètres h égaux à 100, 150 et 200 mm, et pour des diamètres de fibres de 120, 200 et 280 μm . L'influence de ces paramètres sur la distribution des tailles de pores a été représentée ci-dessous (Illustration III 29), et les valeurs moyenne, médiane et maximale de ces tailles de pores ont été rassemblées dans le Tableau III 2.

Nous pouvons observer que la taille de pore moyenne dans la structure augmente significativement avec le diamètre des fibres : le diamètre des fibres agit en effet globalement comme un « facteur d'échelle » pour l'ensemble de la structure (Illustration III 29). La taille de pore moyenne augmente également significativement avec le nombre de couches ; comme nous l'avons vu en section III.2.3., la matrice montre un gradient de taille de pores de son cœur à sa périphérie. Lorsque le nombre de couches augmente, le nombre de pores de grande taille augmente, ce qui agit significativement sur la moyenne ; cependant, la taille et le nombre de pores présents dans les couches inférieures reste globalement inchangé.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

| $D_{\text{fibre}}=200 \mu\text{m}, h=150 \text{ mm}$ | | | | 4 couches, $h=150 \text{ mm}$ | | | | 4 couches, $d_{\text{fibre}}=200\mu\text{m}$ | | | |
|--|--------|--------|--------|----------------------------------|--------|--------|--------|--|--------|--------|--------|
| Nombre de couches | 2 | 4 | 6 | $d_{\text{fibre}} (\mu\text{m})$ | 120 | 200 | 280 | $h (\text{mm})$ | 100 | 150 | 200 |
| Moyenne (μm)* | 226±17 | 295±21 | 361±33 | Moyenne (μm)* | 185±20 | 295±21 | 377±38 | Moyenne (μm) | 291±19 | 295±21 | 285±19 |
| Médiane (μm)* | 215±23 | 270±19 | 350±50 | Médiane (μm)* | 174±29 | 270±19 | 347±49 | Médiane (μm) | 263±19 | 270±19 | 258±27 |
| Maximum (μm)* | 428±15 | 616±83 | 875±54 | Maximum (μm)* | 372±27 | 616±83 | 747±90 | Maximum (μm) | 616±99 | 616±83 | 613±48 |
| Nombre de pores* | 233±21 | 501±71 | 765±75 | Nombre de pores* | 477±58 | 501±71 | 599±87 | Nombre de pores | 580±54 | 501±71 | 563±86 |

Tableau III 2: Influence du nombre de couches, du diamètre de fibre et du paramètre h sur la distribution de tailles de pores à l'intérieur de la matrice. Le signe (*) signifie que l'effet du paramètre étudié est significatif (ANOVA, $p < 0,05$) sur la quantité considérée.

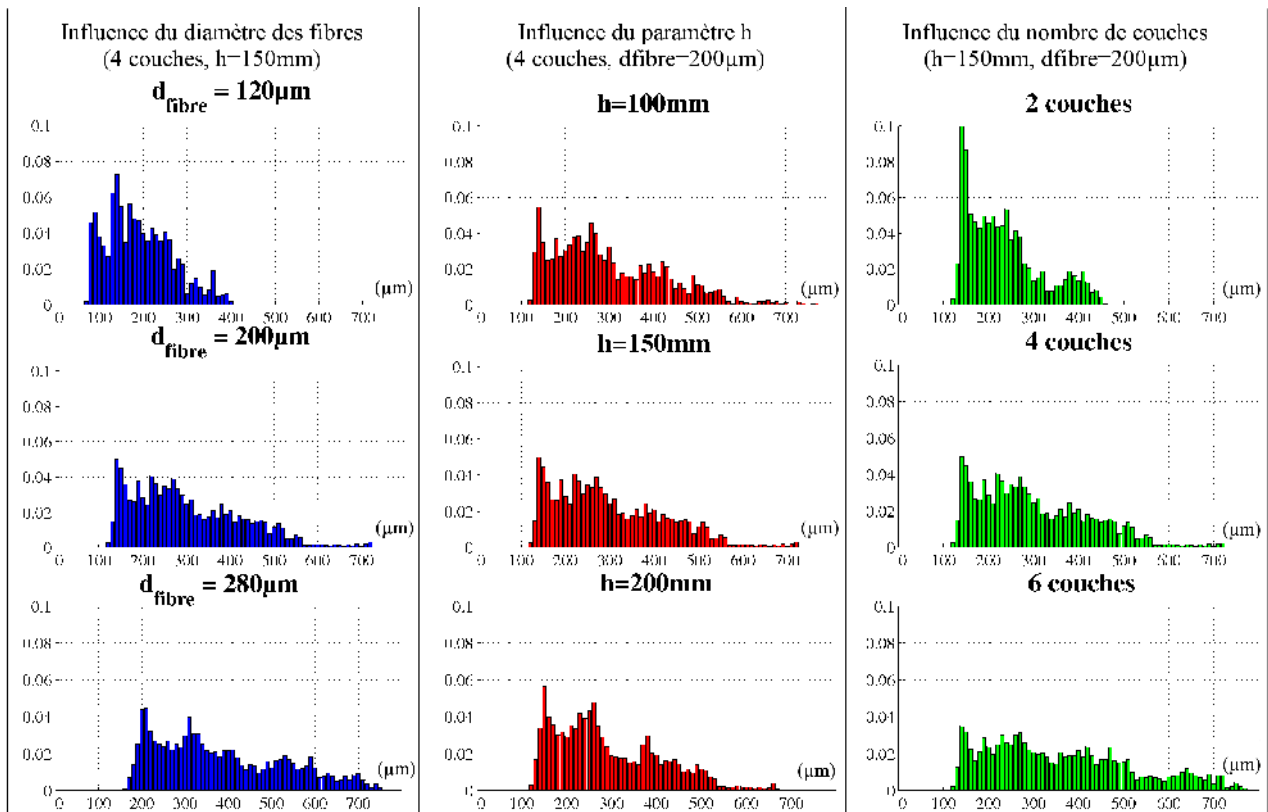


Illustration III 29: Influence du diamètre des fibres (bleu, à gauche), du paramètre h (rouge, au milieu) et du nombre de couches (vert, à droite) sur la distribution de taille de pores (en μm).

Il est donc naturel d'observer un effet très significatif du nombre de couches sur le nombre de pores détectés par l'algorithme. Enfin, selon les résultats de cette caractérisation morphologique, le paramètre h (relié au pas de tressage) n'a pas d'effet significatif sur la distribution des tailles des pores. Ceci peut être expliqué par le fait qu'une augmentation du pas de tressage a tendance à déformer les pores ; cependant, la taille de la plus grande sphère incluse dans ce pore ne change pas nécessairement. Ceci constitue clairement une limite de la méthode présentée; néanmoins, bien que l'extension de la méthode au calcul de la plus grande ellipsoïde incluse dans la structure soit envisageable, il n'a pas été jugé nécessaire d'effectuer ce travail compte tenu (1) des résultats satisfaisants obtenus avec la méthode présentée, et (2) du manque de précision et de consensus sur la taille idéale des pores (section I.7.4.).

4.2. Effet des paramètres du procédé sur la réponse en traction uniaxiale

Une étude numérique similaire à la précédente a été réalisée au sujet de l'effet du diamètre des fibres, du paramètre h et du nombre de couches sur la réponse en traction uniaxiale de la matrice. Des essais de traction ont été simulés numériquement pour des matrices comprenant 2, 4, et 6 couches, pour des paramètres h valant 100, 150 et 200 mm et pour des diamètres des fibres de 120, 200 et 280 μm . Les valeurs correspondantes ont été rapportées Tableau III 3.

| $d_{\text{fibre}}=200 \mu\text{m}, h=150 \text{ mm}$ | | | | 4 couches, $h=150 \text{ mm}$ | | | | 4 couches, $d_{\text{fibre}}=200 \mu\text{m}$ | | | |
|--|-----------------|----------------|-------------------------|--------------------------------------|-----------------|----------------|-------------------------|---|-----------------|----------------|-------------------------|
| Nombre de couches | Rigidité (N/mm) | Toe region (%) | Limite d'élasticité (N) | D_{fibre} (μm) | Rigidité (N/mm) | Toe region (%) | Limite d'élasticité (N) | h (mm) | Rigidité (N/mm) | Toe region (%) | Limite d'élasticité (N) |
| 2 | 63,2 | 0,90 | 52,6 | 120 | 20,8 | 0,99 | 25,5 | 100 | 66,5 | 0,95 | 72,8 |
| 4 | 72,3 | 0,83 | 85,1 | 200 | 72,3 | 0,83 | 86,1 | 150 | 72,3 | 0,93 | 86,1 |
| 6 | 97,4 | 0,73 | 88,1 | 280 | 161,0 | 1,02 | 191,1 | 200 | 105,2 | 0,61 | 97,9 |

Tableau III 3: Influence du nombre de couches, du diamètre de fibre et du paramètre h sur les caractéristiques de la réponse en traction de la matrice.

On peut observer dans un premier temps que la rigidité et la limite d'élasticité de la matrice augmentent avec le nombre de couches: nous avons vu en effet précédemment (section III. 3.3.3) que les couches participaient progressivement à supporter les efforts imposés à la matrice. Le diamètre de fibres a pour effet d'augmenter la section de la matrice ; il est donc naturel de trouver une rigidité et une limite d'élasticité croissantes en fonction de ce paramètre. Le paramètre h , relié au pas de tressage de la matrice, a également pour effet d'augmenter les valeurs de la rigidité et de la

limite d'élasticité. En effet, lorsque h augmente, les fibres sont davantage alignées selon la direction des efforts qui sont imposés. En revanche, ce meilleur alignement a pour effet de diminuer la longueur de la « toe region », qui est due à la fois à l'alignement des fibres avec la direction des efforts et à la contraction radiale de la matrice.

4.3. Sélection d'une matrice adaptée au cahier des charges

4.3.1 Choix des paramètres géométriques

On peut observer, d'après les valeurs rapportées ci-dessus (Tableau III 2 et Tableau III 3), que les paramètres géométriques de la matrice ont des effets importants et parfois antagonistes sur les propriétés effectives de la matrice. Ces effets ont été synthétisés sous forme schématique dans le Tableau III 4. La matrice choisie doit donc être le résultat d'un compromis, afin de satisfaire au mieux au cahier des charges détaillé précédemment (section I.7.). Il est important de souligner ici que ce choix d'un jeu de paramètre ne sera pas issu d'une démarche précise d'optimisation multi-critères, qui a été jugée peu compatible avec la précision du cahier des charges énoncé : en effet, les critères que nous avons retenus se sont appuyés sur des données bibliographiques rares et parfois sujettes à caution.
















| | Nombre de couches | Diamètre des fibres | Paramètre h (lié au pas de tressage) |
|----------------------------|---|---|---|
| Rigidité |  |  |  |
| Toe region |  |  |  |
| Limite d'élasticité |  |  |  |
| Taille des pores moyenne |  |  |  |
| Quantité de pores détectés |  |  |  |

Tableau III 4: Synthèse de l'effet des paramètres du procédé sur certaines propriétés effectives de la matrice de support.

Nous avons pu voir tout d'abord qu'une augmentation du nombre de couches se traduisait en une augmentation du nombre de pores dans la matrice et, étant donné le gradient de tailles de pores du centre à la périphérie, augmentait également la taille moyenne des pores. D'une part, une augmentation des couches augmente la surface sur laquelle les cellules peuvent adhérer ; de l'autre,

cela ajoute des « barrières » à la circulation du milieu de culture dans la matrice. Il est donc nécessaire de formuler un compromis. Nous avons également vu que d'un point de vue mécanique, une augmentation du nombre de couches se traduit tout d'abord par une augmentation de la rigidité et de la limite d'élasticité de la matrice, mais que les couches situées à l'extérieur participaient de manière décroissante à la résistance aux sollicitations imposées à la matrice. Le nombre de couches sera fixé par la suite à 6, limite au-delà de laquelle l'effet de l'ajout de couches supplémentaires devient négligeable sur la réponse mécanique de la matrice ; la matrice sera donc constituée de 96 fibres.

Nous avons également constaté que la distance h , reliée au pas de tressage de la matrice, n'avait pas d'effet décelable sur la morphologie de la matrice par le biais des outils numériques qui ont été développés ici. Ce paramètre a en revanche un effet prononcé sur la réponse mécanique de la matrice : la rigidité et la limite d'élasticité de la matrice augmentent avec h , tandis que la longueur de la *toe region* diminue lorsque h devient grand. Ce paramètre a été fixé à sa valeur intermédiaire, soit 150 mm.

Enfin, d'après les données rapportées ci-dessus, la taille des pores augmente globalement avec le diamètre des fibres de la matrice, ainsi que la rigidité et la limite d'élasticité. En revanche, un diamètre important implique que la taille moyenne des pores s'éloigne de la valeur de 250 μm souvent citée comme adaptée à la culture des fibroblastes. Pour la suite, ce paramètre sera fixé à $d_{\text{fibre}}=230 \mu\text{m}$.

4.3.2 Propriétés de la matrice sélectionnée

La distribution des tailles de pores au sein de la matrice sélectionnée a été calculée dans 6 matrices à partir de l'algorithme détaillé en section III.2.3. L'histogramme moyen des tailles de pores à l'intérieur de cette matrice a été représenté Illustration III 30. La matrice offre une taille de pores moyenne de $392\pm34 \mu\text{m}$, avec une médiane de $368\pm32 \mu\text{m}$ et un maximum de $902\pm142 \mu\text{m}$.

Comme il a été montré ci-dessus, une telle structure possède un gradient positif de tailles de pores, du centre à la périphérie de la matrice (Illustration III 31). Ce gradient a été mis en exergue ci-dessous (Illustration III 31) en traçant le diamètre des pores en fonction de leur distance à l'axe de la matrice : si l'on considère la tendance générale de ce nuage de points, on observe en effet une augmentation de la taille des pores en fonction de la distance à l'axe.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

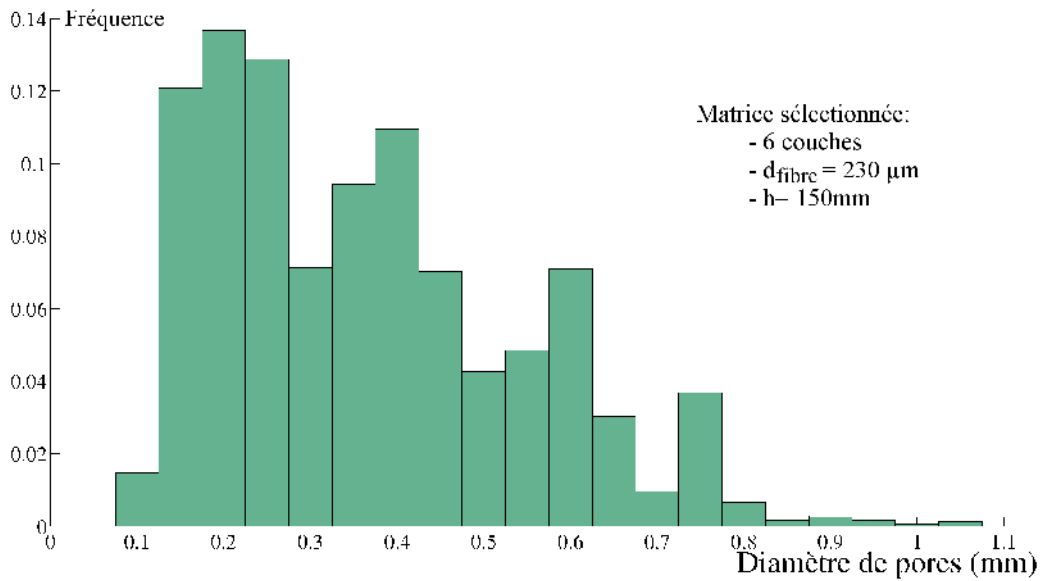


Illustration III 30: Histogramme des tailles de pores au sein de la matrice sélectionnée.

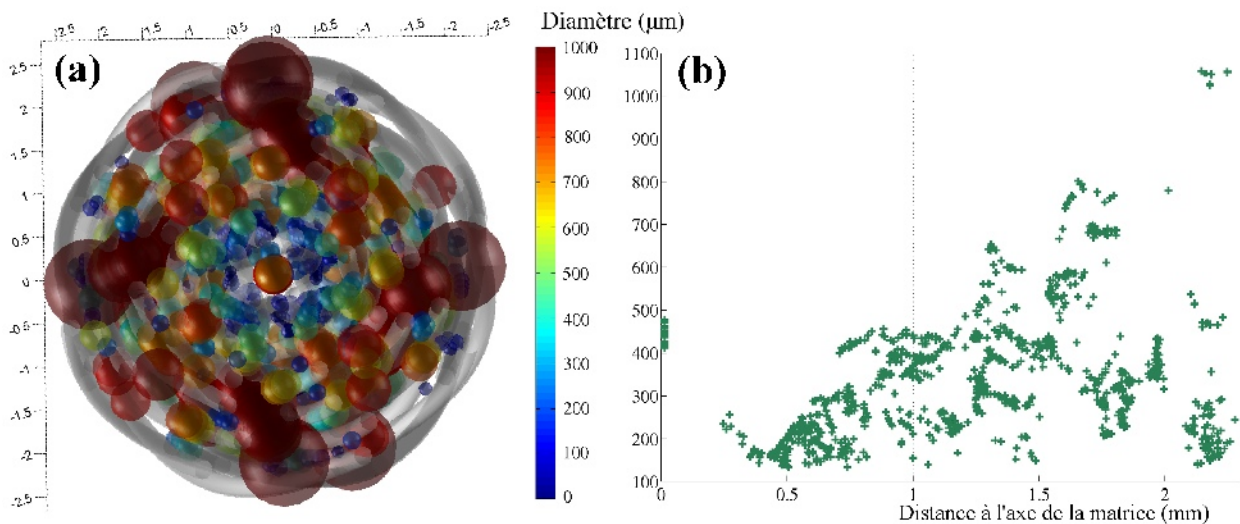


Illustration III 31: (a) Distribution spatiale et taille des pores à l'intérieur de la matrice choisie (b) taille des pores en fonction de leur distance à l'axe de la matrice.

Enfin, la courbe de réponse typique en traction uniaxiale de cette matrice calculée à partir de la méthode présentée en section III.3.3. a été représentée ci-dessous (Illustration III 32). D'après ces résultats de simulation ($N=5$), la matrice offre une rigidité de $131,7 \pm 4,4 \text{ N/mm}$, une limite d'élasticité de $133,4 \pm 9,3 \text{ N}$ et une *toe region* de $0,67 \pm 0,06\%$. La limite d'élasticité est obtenue pour une déformation de $5,15\%$. Ces différentes propriétés effectives de la matrice seront discutées et comparées avec les critères qui composent le cahier des charges retenu en section V.2.1., où un bilan de la pertinence clinique de la matrice proposée sera dressé.

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

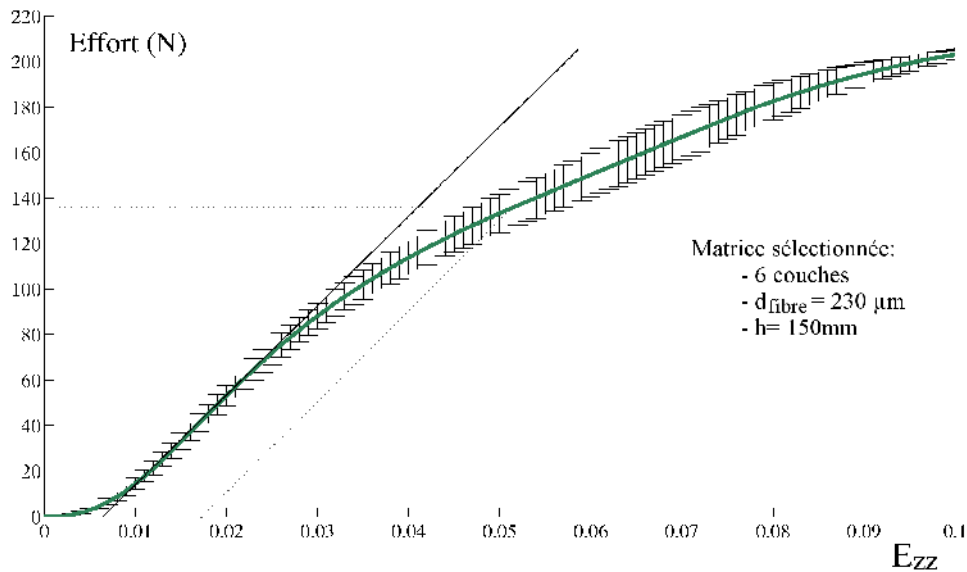


Illustration III 32: Résultats de la simulation d'une traction uniaxiale de la matrice sélectionnée.

À titre d'illustration concernant le comportement de cette matrice, les deux exercices de réhabilitation provoquant les déformations maximales au niveau du LCA (contraction isométrique des quadriceps à 15° de flexion et squats avec cordes élastiques, voir I.3.3.) ont été simulés pour cette matrice. La contraction isométrique des quadriceps à 15° de flexion a été modélisée par une déformation globale de 4.4% [Beynnon1998a], et le squat avec cordes élastiques a été modélisé par une combinaison d'une déformation globale de 4% [Beynnon1998a] et d'une torsion de 35° résultant d'une flexion de l'articulation de 0 à 90° [Li2005]. Les efforts et les moments générés par de tels exercices en fonction de la déformation longitudinale imposée ont été représentés ci-dessous (Illustration III 33). On remarque que l'effet de la torsion ne semble pas avoir d'effet sur la courbe effort/déformation de la matrice ; en revanche, cela induit bien évidemment un moment résistant. Au passage, nous noterons que les déformations *in situ* observées par [Beynnon1998a] ont été définies comme une déformation conventionnelle ; en revanche, nous avons utilisé la déformation de Green-Lagrange, ce qui explique qu'une déformation maximum de 4.6% et non 4.4% dans le cas du premier exercice par exemple puisse être observée. Nous pouvons également remarquer que les efforts générés par de telles sollicitations sur cette matrice sont largement inférieurs aux efforts maximaux généralement rapportés lors de sollicitations classiques qui peuvent atteindre 400 N [Markolf1990][Wascher1993][Mommersteeg1997][Toutoungi2000]. Cette différence peut être due aux méthodes utilisées pour estimer ces efforts, à la différence de rigidité entre la matrice de support proposée et celles du LCA natif (les études rapportées étant en désaccord à ce sujet, Tableau I 2), et/ou aux conditions aux limites imposées lors de ces simulations qui peuvent ne pas refléter la

réalité des sollicitations imposées au LCA. En effet, il est important de souligner qu'une réelle simulation du comportement *in situ* de la matrice mériterait de définir le moyen de fixation, ainsi que les interactions entre le LCA, le ligament croisé postérieur, et les surfaces des tibia et fémur : lors d'une flexion de l'articulation notamment, il est connu que le LCA vient partiellement s'enrouler autour du condyle latéral du fémur (voir Illustration I 3). Enfin, nous soulignerons qu'il est difficile d'établir une réelle cohérence entre les différentes données de la littérature. En effet, le LCA possède une rigidité entre 120 N/mm et 250 N/mm (Tableau I 2), et les déformations physiologiques de 4,4% qui ont été mesurées devraient donc induire, sur un LCA d'une longueur moyenne de 30 mm, des efforts situés entre 160 N et 330 N, si l'on ne considère pas la *toe region*. Si l'on considère cette région, ces efforts deviennent bien inférieurs à la valeur de 400 N qui a été proposée dans la littérature : ceci soulève à nouveau le besoin de données supplémentaires concernant les réelles sollicitations physiologiques imposées au LCA lors d'activités quotidiennes.

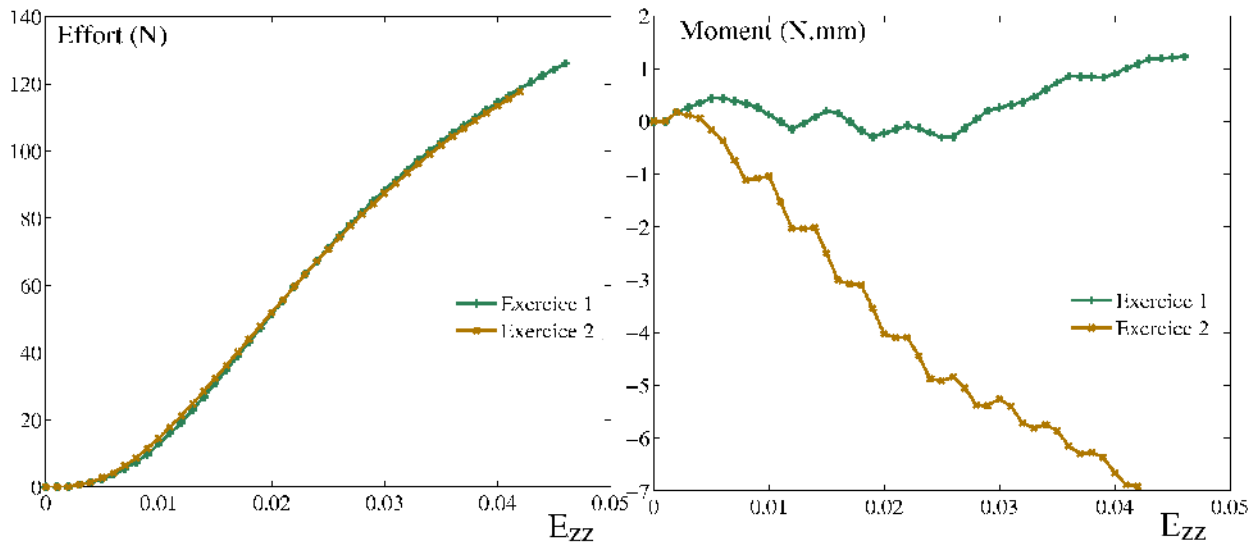


Illustration III 33: Efforts et moments dans la matrice sélectionnée causés par un contraction isométrique des quadriceps à 15° de flexion (Exercice 1) ainsi que par des squats avec cordes élastiques (Exercice 2).

5. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre, des outils numériques permettant de prédire certaines propriétés effectives de la matrice en fonction des différents paramètres de procédé ont été présentés. Comme nous l'avons souligné en introduction, une démarche d'*Ingénierie Tissulaire Assistée par Ordinateur* repose systématiquement sur une description numérique de la géométrie de la matrice. Celle-ci a été obtenue de deux façons dans ce chapitre : dans un premier temps, elle a été déterminée à partir de la cinématique du procédé de tressage de façon purement géométrique, dans un second elle a été

calculée à partir d'une configuration de référence en considérant l'équilibre mécanique de la structure. Ces deux géométries ont été évaluées par comparaison avec la géométrie réelle de la matrice, et aucune différence significative entre les différents types de géométries virtuelles et réelles n'a été trouvée, d'après les critères de comparaison choisis. Il est important de souligner néanmoins que les deux géométries « virtuelles » reposent sur un pas de tressage déterminé de manière empirique, et pourraient donc faire l'objet de futurs ajustements, en s'appuyant en particulier sur une plus grande quantité de données expérimentales.

La morphologie de la matrice en termes de taille des pores, d'interconnectivité des pores et de distribution spatiale des pores a été modélisée à partir des plus grandes sphères incluses dans la structure. Il a été montré que la matrice sélectionnée présentait un réseau de pores entièrement interconnecté, dont la taille était compatible avec le cahier des charges énoncé. La modélisation des pores par des sphères parfaites constitue la limite principale de cette caractérisation, et il en résulte que l'influence du pas de tressage sur les tailles de pores n'est pas quantifiable avec cette méthode. Néanmoins, la distribution de taille de pores déterminée à partir de cette méthode est cohérente avec des mesures qui ont été effectuées sur de véritables matrices. Les outils numériques développés dans ce cadre ont en particulier permis de mettre en évidence la non-homogénéité des tailles des pores au sein de la matrice : un gradient positif des tailles de pores du cœur à la périphérie de la matrice a en effet été clairement rapporté. Cette particularité constitue un point fort de la structure présentée en ce qui concerne l'ensemencement et les transports de masse à l'intérieur de ces pores.

Dans un second temps, la réponse mécanique en traction de la matrice a été modélisée à partir d'un code EF dédié aux matériaux fibreux. Ce code a été appliqué au cas de la modélisation de notre matrice de support, ce qui a nécessité les apports suivants :

- utilisation et identification d'une loi de comportement représentant la réponse non-linéaire du polymère utilisé ;
- définition de la configuration de référence et du schéma de tressage nécessaires à reproduire la géométrie de la matrice tressée multicouche dans le cas de reconstructions à simple et double faisceau;
- définition d'une méthode de pilotage des conditions aux limites dans le cas de reconstructions à simple et double faisceau.

Cette modélisation repose sur une hypothèse forte concernant le comportement mécanique des fibres de PLCL, modélisé par un comportement élastoplastique. Ainsi, la modélisation proposée ne permet pas de reproduire les phénomènes viscoélastiques tels que le fluage ou la relaxation de la matrice, ce qui en constitue la limite principale. Néanmoins, l'utilisation de cette loi approchée a permis de reproduire les réponses expérimentales en traction uniaxiale pour différentes matrices

III. Modélisations géométrique et mécanique de la matrice de support

avec une précision satisfaisante. Un protocole spécifique a notamment été développé dans le but d'acquérir ces différentes données expérimentales. Un bilan critique de ces différents outils de modélisation sera formulé plus en détail en section V.3.1.

Ces outils de modélisation ont ensuite été utilisés pour quantifier l'effet des différents paramètres de procédé sur la réponse en traction de la matrice ainsi que sur ses propriétés morphologiques. Ainsi, un jeu de paramètres a été proposé afin de satisfaire les critères initialement retenus comme étant nécessaires à la restauration de la fonction physiologique du genou durant la période de réhabilitation et à la formation d'un néo-tissu au sein de la matrice. La matrice sélectionnée est constituée de 6 couches de 16 fibres de P(L85/CL15), d'un diamètre de 230 μm , et réalisée avec un paramètre h du dispositif de tressage fixé à 150 mm. Un bilan critique de la solution proposée sera exposé en section V.2.

En particulier, l'extension de cet outil numérique à une reconstruction anatomique double faisceau du LCA qui a été proposé permet d'envisager une future étude concernant les performances des deux types de techniques de reconstruction du LCA lors de sollicitations physiologiques. De plus, nous soulignerons que ces outils de modélisation pourraient être aisément étendus dans le futur à des matrices plus complexes, contenant par exemple des couches composées de différentes quantités de fibres, de différents diamètres et de différents matériaux.

La modélisation par EF de la matrice tressée multicouche à l'échelle de la fibre permet d'avoir des informations sur l'environnement mécanique local à l'échelle de la cellule qui va adhérer sur une de ces fibres. Ces informations concernent notamment l'amplitude et la direction des déformations locales, mais également l'évolution de la géométrie en termes de glissement entre les fibres et de contraction radiale de la structure résultant d'un chargement extérieur. Cette modélisation offre donc de nombreuses perspectives en ce qui concerne l'optimisation des conditions de culture qui vont permettre d'encourager l'activité cellulaire, et l'interprétation des observations qui seront issues d'expérimentations biologiques menées sous différentes conditions de culture. Quelques-unes de ces perspectives seront abordées plus en détail dans le dernier chapitre de ce mémoire, visant à lister les principales perspectives du présent travail. Dans le prochain chapitre, nous allons nous intéresser à présenter les protocoles et les matériels qui ont été mis en place dans le but d'effectuer la culture *in vitro* de cellules souches au sein de la matrice tressée multicouche.

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

Chapitre 4

| | |
|--|-----|
| IV.Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur..... | 145 |
| 1.Introduction..... | 146 |
| 2.Protocoles expérimentaux..... | 146 |
| 2.1.Source cellulaire..... | 146 |
| 2.2.Facteurs biochimiques..... | 148 |
| 2.3.Aspects techniques..... | 149 |
| 2.3.1 Matériels et techniques de culture..... | 149 |
| 2.3.2 Essais de viabilité..... | 150 |
| 2.3.3 Imagerie..... | 151 |
| 3.Essais biologiques préliminaires..... | 152 |
| 3.1.Biocompatibilité..... | 152 |
| 3.2.Ensemencement..... | 154 |
| 3.3.Résultats de cultures statiques..... | 155 |
| 3.3.1 Essai 1 : prolifération de cellules ovines..... | 155 |
| 3.3.2 Essai 2 : cellules humaines..... | 159 |
| 4.Culture dynamique et bioréacteur..... | 160 |
| 4.1.Présentation du bioréacteur utilisé..... | 161 |
| 4.1.1 Présentation générale..... | 161 |
| 4.1.2 Circulation du milieu de culture..... | 163 |
| 4.1.3 Partie commande et interface logicielle..... | 164 |
| 4.1.4 Sécurité du système..... | 165 |
| 4.2.Protocole de mise en culture..... | 166 |
| 4.3.Résultats préliminaires d'utilisation du bioréacteur..... | 167 |
| 5.Discussion et conclusion..... | 169 |

1. Introduction

Dans le chapitre précédent, des outils numériques spécifiques ont été utilisés afin de déterminer des configurations de matrice qui paraissent adaptées au cahier des charges qui a été initialement fixé. Jusqu'ici, nous avons néanmoins formulé l'hypothèse que la matrice proposée était biocompatible et qu'elle était susceptible d'êtreensemencée et colonisée par des cellules. Dans ce chapitre, nous allons proposer de vérifier ces hypothèses par le biais d'études biologiques préliminaires. Dans un premier temps, les notions et les techniques nécessaires à la présentation de ces études seront détaillées, essentiellement à l'usage des non-biologistes. Le protocole d'ensemencement qui a été mis en place dans le cadre de cette thèse sera ensuite présenté, puis les résultats d'études de culture statique seront exposés et discutés.

Dans un second temps, nous nous intéresserons à la mise en place d'un bioréacteur spécifique permettant la culture dynamique des matrices de support. Les aspects de conception liés à ce bioréacteur ne seront pas discutés ici ; en revanche, nous détaillerons pour la première fois son fonctionnement, ses particularités, et une première application. La mise en place d'un protocole permettant à la fois l'ensemencement et la mise en culture de cellules dans les matrices de support avec les contraintes liées au fonctionnement de ce bioréacteur sera présentée, et nous évoquerons les études biologiques futures qui pourront être envisagées à la suite de ce travail, en particulier en ce qui concerne l'optimisation des conditions de culture.

Nous soulignerons cependant que les configurations de matrices qui seront utilisées dans cette partie seront différentes de la configuration qui vient d'être sélectionnée dans le précédent chapitre ; en effet, la chronologie des différentes études qui ont été effectuées ne correspondent pas nécessairement à l'ordre dans lequel elles sont exposées dans ce mémoire.

2. Protocoles expérimentaux

2.1. Source cellulaire

La source cellulaire idéale pour l'ingénierie tissulaire doit fournir des cellules directement utilisables pour un usage clinique et offrant un fort potentiel de prolifération, ainsi que le potentiel de générer une matrice extracellulaire organisée [Petrigliano2006] et de provoquer des réactions immunes bénignes [Ge2005]. Au vu de la diversité des fonctions de différents types de cellules, le choix d'une source de cellule adaptée apparaît comme un point crucial de la démarche d'ingénierie

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

tissulaire [Ge2005][Sengers2007]. Afin d'éviter les problèmes liés aux rejets immunitaires ou aux transmissions de maladie, les cellules utilisées en ingénierie tissulaire sont idéalement de type autologues (provenant du patient lui-même). Cependant, à l'échelle de la recherche *in vitro*, nous utiliserons bien entendu des cellules animales ou des cellules humaines provenant d'un individu quelconque.

Les fibroblastes (cellules entrant dans la composition des tissus ligamenteux) issus de différents tissus conjonctifs ont été considérés très tôt comme une source intéressante de cellules pour l'ingénierie tissulaire [Petrigliano2006]. Ils pourraient notamment être prélevés par l'intermédiaire du ligament collatéral médial, directement à partir du LCA lésé mais également par la peau [Ge2005]. Les fibroblastes sont capables de proliférer et synthétiser du collagène, et répondent à des stimuli mécaniques et biochimiques [Vunjak-Novakovic2004][Petrigliano2006]. Cependant, la faible activité de leur métabolisme et leur potentiel de différenciation limité [Petrigliano2006] ont souvent amené les auteurs à les considérer comme un second choix, et à notre connaissance aucune utilisation concluante de ces cellules n'a encore été rapporté [Liu2008a].

Les cellules souches embryonnaires peuvent également constituer une source de cellules intéressante, notamment en raison de leur grand potentiel de prolifération et de différenciation ; elles posent cependant des problèmes de prélèvement et surtout des problèmes éthiques qui restreignent leur utilisation [Ge2005]. Les chercheurs en ingénierie tissulaire se sont rapidement tournés vers les cellules autologues disponibles dans la moelle osseuse, qui constituent une véritable réserve de cellules souches mésenchymateuses [Vunjak-Novakovic2004][Petrigliano2006]. Ces cellules souches adultes (contrairement aux cellules souches embryonnaires) sont dites multipotentes, c'est-à-dire qu'elles peuvent se différencier en plusieurs phénotypes cellulaires [Liao2008], notamment en ostéoblastes (os), chondroblastes (cartilage), myoblastes (muscles) et fibroblastes (tissus conjonctifs) [Ge2005] (Illustration IV 1).

Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) peuvent être facilement prélevées à partir d'une biopsie au niveau de la crête iliaque et développées *in vitro* en grandes quantités [Ge2005]. Une étude comparative entre fibroblastes et CSM a rapporté que le second type de cellules montrait des sécrétions de collagène plus importantes et surtout une prolifération bien supérieure au premier [Ge2005].

En résumé, l'utilisation de CSM autologues montre les avantages suivants : un prélèvement aisé, l'absence de risque de transmission de maladie ou de rejet immunitaires, la suppression des problèmes éthiques pouvant être liés à l'utilisation de cellules embryonnaires, d'importantes sécrétions de matrice extracellulaire, et une différenciation pouvant être orientée vers divers phénotypes [Vunjak-Novakovic2004][Benhardt2009].

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

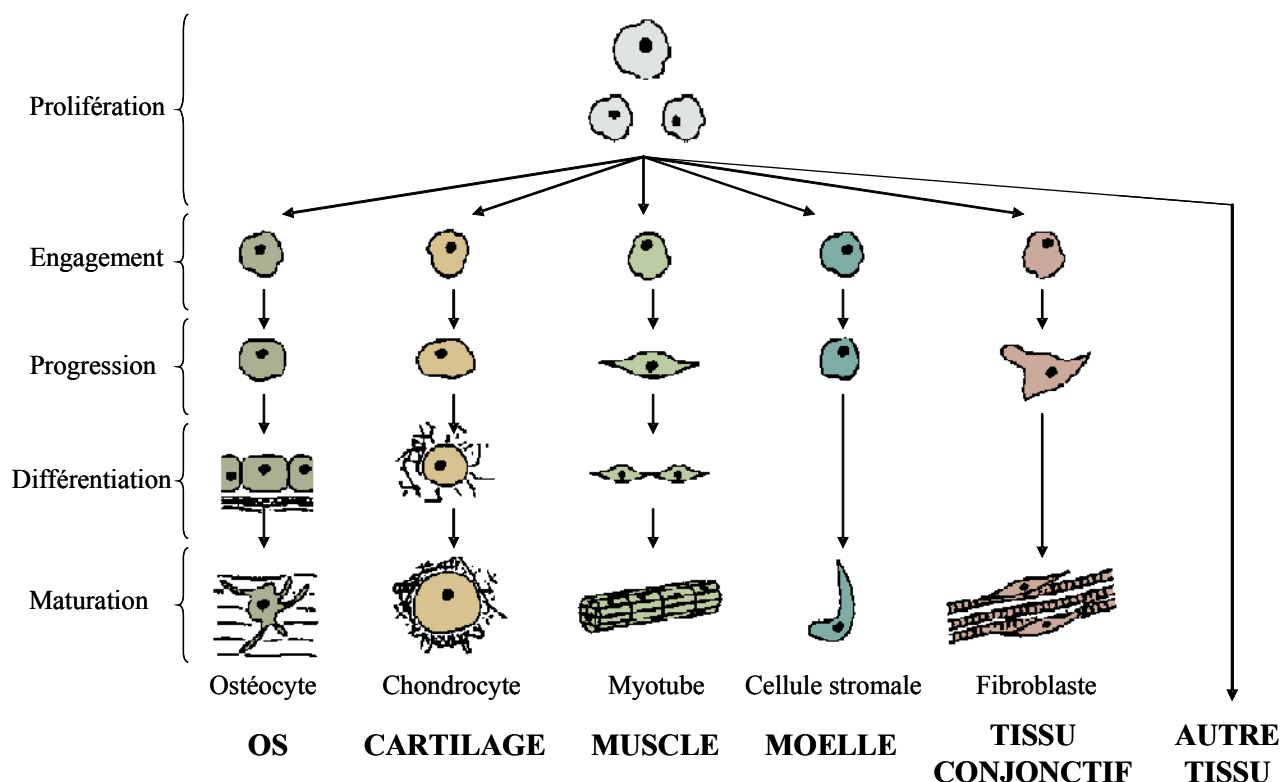


Illustration IV 1: Évolution d'une cellule souche mésenchymateuse. Adapté de [Fisher2007]

Lors des études biologiques qui vont être effectuées ci-dessous, les cellules utilisées seront de deux types : CSM ovines dans un cas (section IV. 3.3.1), et CSM humaines dans l'autre (sections IV.3.1. et IV. 3.3.2). Dans le premier cas, les cellules sont issues de la moelle osseuse de moutons mérinos ; dans le second, les CSM utilisées sont issues de ponctions de la moelle osseuse humaine au niveau de la crête iliaque, réalisés au CHU de Nancy. Le prélèvement a ensuite été centrifugé, puis les cellules ont été aspirées et suspendues dans du milieu de culture (voir IV. 2.3.1) ; enfin, elles ont été cultivées jusqu'à confluence. Les CSM peuvent être isolées grâce à leur capacité à adhérer au fond des boîtes de culture, contrairement aux autres cellules composant la moelle osseuse qui sont éliminées lors du changement de milieu.

2.2. Facteurs biochimiques

En général, le milieu de culture dans lequel les cellules sont cultivées contient de nombreux stimulateurs potentiels de la croissance ou de la différenciation cellulaires vers un phénotype fibroblastique, parmi lesquels on trouve acides aminés, facteurs de croissance, vitamines, protéines,

hormones, lipides et minéraux [Vunjak-Novakovic2004]. Lors de la culture des cellules implantées ou non dans un scaffold, certains facteurs biochimiques sont en effet nécessaires à la stimulation des cellules [Jeong2008]. En particulier, il a été montré que les deux facteurs de croissance PDGF (*platelet-derived growth factor*) et TGF- β (*transforming growth factor β*) étaient présents en forte concentration durant les deux semaines suivant la rupture du LCA chez un modèle de lapin [Petrigliano2006]. Le PDGF ainsi que le bFGF (*basic fibroblast growth factor*) sont essentiels à la cicatrisation, à la régénération tissulaire et à l'angiogenèse [Liao2008], et stimulent la prolifération des CSM. Les protéines présentes dans le TGF- β induisent une prolifération cellulaire ainsi que la synthèse de collagène, de fibronectine, de biglycane et de décorine, et peuvent donc par ce biais agir sur le comportement mécanique du tissu final [Benhardt2009]. De nombreux autres facteurs de croissances (EGF, GDF, IGF) ont montré une certaine capacité à améliorer la prolifération cellulaire et la production de matrice extracellulaire [Petrigliano2006].

L'oxygène joue également un rôle essentiel dans le taux de production de matrice extracellulaire conditionnant le développement *in vitro* du néo-tissu [Vunjak-Novakovic2004]. Les cellules souches développent en effet une activité qui dépend de la quantité d'oxygène présente dans leur environnement. Enfin, nous soulignerons que des nutriments comme l'ascorbate-2-phosphate, dérivés de la vitamine C, encouragent la prolifération des cellules ainsi que la maintenance des tissus conjonctifs en stimulant la synthèse de collagènes [Vunjak-Novakovic2004] [Petrigliano2006].

Comme nous l'avons vu, ces différents facteurs sont souvent introduits par l'intermédiaire du milieu de culture dans lequel ces cellules sont cultivées ; cependant, ils peuvent également être mélangés au matériau constitutif de la matrice de support ou bien encore la recouvrir [Liao2008], comme nous le verrons ultérieurement.

2.3. Aspects techniques

2.3.1 Matériels et techniques de culture

La culture des cellules se fait sous un environnement contrôlé à 37°C et sous 5% de CO₂. Ces conditions étant particulièrement propices à une contamination, tout matériel en contact avec les cellules ou avec le milieu de culture doit être exempt de germes bactériologiques. La stérilisation du matériel est généralement réalisée par une ou plusieurs des méthodes suivantes : exposition à des rayons ultra-violets (UV), passage sous une solution d'éthanol, ou autoclavage. L'autoclave utilise de la vapeur d'eau saturée sous pression pour détruire les germes, et nécessite bien évidemment que

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

les dimensions du matériel soient compatibles avec celles de l'enceinte de l'autoclave, et que ces matériaux supportent une température d'environ 130°C. Dans la suite de cette étude, la stérilisation des échantillons de matrice sera réalisée dans un premier temps par immersion dans une solution d'éthanol à 70% pendant 30 minutes, puis par irradiation aux rayons ultra-violet pour encore 30 minutes. Les échantillons seront ensuite conservés stérilement sous une hotte à flux laminaire pendant 12h dans un environnement sec. Le matériel en contact avec le milieu de culture sera soit stérilisé au préalable sous autoclave (vaisselle, pinces, ...), soit à usage unique et jeté après utilisation (boîtes de culture, pipettes, ...).

Les cellules sont cultivées dans un milieu de culture qui sera appelé *milieu de culture complet* et qui sera composé de α -MEM (Lonza, USA) auquel nous avons ajouté les composants suivants (Gibco, France) : pénicilline et streptomycine (antibiotiques), rouge de phénol (dont la coloration donne une indication du pH du milieu), L-glutamine, sérum de veau fœtal (à 10%) et fongicide. Éventuellement, à ce milieu de culture complet sera ajouté de l'ascorbate-2-phosphate pour stimuler la synthèse des collagènes. De plus, lors de la culture en bioréacteur, le milieu de culture sera complété par une solution tampon (HEPES à 25mM) de manière à éviter la diminution de pH due à l'ajout de CO₂ dans le milieu.

Les cellules sont déposées dans des boîtes de culture, composées généralement de plusieurs puits de cultures séparés. Lorsqu'elles sont ancrées à la paroi de ces boîtes, elles peuvent être détachées en utilisant une solution de trypsine à 0,25% en volume dans une solution de HBSS (*Hank's Buffered Salt Solution*) qui a pour effet de couper les protéines membranaires responsables de l'ancrage des cellules. L'action de la trypsine est ensuite inhibée par l'ajout de milieu de culture complet. Les cellules alors en suspension peuvent être utilisées à une concentration donnée *via* une centrifugation puis un comptage, réalisé grâce à des cellules de Thoma (dont le principe consiste à compter sous microscope le nombre de cellules dans un volume donné).

2.3.2 Essais de viabilité

Le test *AlamarBlue*® (Abd Serotec, USA) a été utilisé pour quantifier la prolifération cellulaire. Ce test consiste à additionner au milieu de culture exempt de rouge de Phénol un agent dont l'un des composants (la résazurine) est réduit au contact des cellules vivantes, donnant lieu à de la résorufine. L' *AlamarBlue*® est ajouté à une concentration de 3% en volume, puis incubé pendant 30 minutes. Le mélange milieu de culture + *AlamarBlue*® est ensuite retiré et remplacé par du milieu de culture habituel, puis placé dans une seconde plaque de culture. L'ensemble des manipulations des solutions contenant de l'*AlamarBlue*® doit impérativement être exécuté à l'abri de la lumière. Le pourcentage de réduction de ce mélange peut être relié de façon linéaire au

nombre de cellules, et la mesure de cette valeur permet ainsi de suivre l'évolution d'un métabolisme de manière non destructive. Le pourcentage de réduction est obtenu en mesurant l'absorbance à deux longueurs différentes (correspondant aux états réduit et oxydé du composant actif de l'*AlamarBlue*®) du mélange milieu de culture + *AlamarBlue*® à l'aide d'un spectro-photomètre (Beckman Coulter Inc, USA) et en utilisant une relation faisant intervenir les valeurs d'absorbances d'un témoin sans cellule. Cette mesure indirecte et non-destructive est facile à réaliser ; en revanche, elle ne permet pas de quantifier un nombre de cellules, mais uniquement de suivre son évolution.

Le test *Picogreen*® est aussi largement utilisé pour quantifier la viabilité cellulaire en employant également la fluorescence, et s'intéresse particulièrement aux acides nucléiques (ADN et/ou ARN) contenus dans le noyau des cellules. Lors de cet essai, les acides nucléiques sont préalablement extraits de l'échantillon par le biais d'enzymes (généralement la Protéinase K) qui hydrolysent les protéines (et en particulier les liaisons peptidiques) et inactivent les acides nucléiques sans les dénaturer. L'agent fluorescent *Picogreen*® est alors ajouté à la solution, puis l'ensemble est incubé cinq minutes à l'abri de la lumière. Le protocole de mesure est alors semblable au précédent : le *Picogreen*® permet de marquer les structures en doubles hélices constituant l'ADN, et permet de quantifier l'ADN présent dans l'échantillon *via* des mesures de fluorescence de la solution à l'aide d'un spectro-photomètre. Cette quantification est effectuée par comparaison à une courbe standard obtenue pour des concentrations connues d'ADN, et elle peut être directement corrélée au nombre de cellules présentes dans l'échantillon [Doroski2007]. Il est important de souligner que contrairement à l'essai *AlamarBlue*®, l'essai *Picogreen*® est destructif et nécessite donc une quantité supérieure d'échantillons pour suivre l'évolution d'un nombre de cellules ; en revanche, cet essai est plus précis et plus reproductible que le précédent, et permet d'estimer quantitativement un nombre de cellules.

2.3.3 Imagerie

Les images qui seront exposées ci-après seront issues d'imagerie confocale d'une part et de microscopie électronique à balayage (MEB) d'autre part. Sans vouloir trop détailler le fonctionnement de ces deux appareils, quelques brèves explications méritent d'être présentées ici.

La particularité de l'imagerie confocale est sa capacité à se focaliser sur des plans horizontaux distincts dans un espace 3D du fait de sa faible profondeur de champ. Elle fonctionne par fluorescence, c'est-à-dire qu'il est nécessaire de marquer les entités que l'on veut visualiser par des éléments dont les fréquences d'excitation et d'émission sont connues. Dans notre cas, nous nous intéresserons en particulier à la mise en évidence du cytosquelette et/ou au noyau cellulaire. L'idée de l'imagerie confocale est de balayer le plan focal de l'objectif par un laser focalisé sur le même

plan, d'où le nom *confocal*. La lumière provenant des plans hors du plan focal est arrêtée par un sténopé (plus communément appelé *pinhole*), et seule reste la lumière issue de l'excitation des éléments fluorescents situés dans le plan focal. Une représentation 3D peut donc être obtenue à partir de ces plans moyennant des algorithmes de reconstruction. L'un des inconvénients majeurs de ce type d'imagerie réside dans le photodégradation des marqueurs fluorescents qui peut résulter d'une exposition prolongée au faisceau laser, et conduire à certaines difficultés pour analyser quantitativement le signal obtenu. Une plateforme d'imagerie confocale performante dédiée à l'imagerie cellulaire et tissulaire est disponible sur le site du biopôle de Nancy (PTIBC-IBISA, Nancy). Elle présente entre autres un microscope et un macroscopie confocaux : ceux-ci se différencient majoritairement par la taille des échantillons qu'ils permettent d'imager.

Le MEB est également largement utilisée en ingénierie tissulaire, notamment pour sa résolution pouvant atteindre 5nm et pour sa large plage de grossissement allant de 5 à 250 000x qui en sont les avantages majeurs [Doroski2007]. Les images issues du MEB n'utilisent non plus un faisceau de lumière mais un faisceau d'électrons qui balaye la surface de l'échantillon. Les informations sur la topographie de l'échantillon sont alors obtenues en analysant les électrons secondaires générés par ce premier faisceau d'électrons. Le MEB permet donc des analyses de surface, et non de volume, ce qui constitue une limite évidente par rapport au microscope confocal ou même par rapport au microscope électronique à transmission. De plus, la surface exige d'être préparée notamment par l'ajout d'une fine couche d'un matériau métallique (sauf dans le cas d'un MEB environnemental).

3. Essais biologiques préliminaires

3.1. Biocompatibilité

En premier lieu, une rapide étude de biocompatibilité a été réalisée de manière à s'assurer d'une part de la biocompatibilité des fibres de PLCL issues du procédé décrit précédemment et d'autre part de s'assurer que le protocole de stérilisation ci-dessus permettait d'éviter les contaminations pendant la culture. Des essais préliminaires d'ensemencement sur un ensemble de fibres isolées n'ont pas permis d'évaluer cette biocompatibilité, car les cellules s'ancraient principalement sur le fond des boîtes de culture plutôt que sur la paroi des fibres. Ainsi, dans une seconde étude, des surfaces de la taille des puits de culture ont été réalisées à partir de fibres des deux polymères P(LL97/CL3) et P(LL85/CL15) (synthétisés comme détaillé dans en section II.2.2.) de manière à tapisser le fond des boîtes de culture. Ces surfaces ont été réalisées en enroulant les fibres de polymère de façon compacte autour d'un cylindre d'un diamètre de 8cm. L'ensemble a ensuite été

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

chauffé à une température d'environ 90°C à 105°C selon le polymère jusqu'à ce que les fibres collent les unes aux autres ; en déroulant cet ensemble de fibres collées, des surfaces d'environ 0,5x25cm ont été obtenues. Enfin, ces surfaces ont été découpées à l'aide d'un emporte-pièce de la taille des puits de culture (0,5 cm de diamètre). Ces surfaces ont ensuite étéensemencées de cellules souches humaines à deux concentrations : 2000 et 5000 cellules/puits. L'ensemencement a été effectué en déposant les cellules suspendues dans 1mL de milieu sur les surfaces de PLCL disposées au fond des puits de culture, en faisant l'hypothèse que les cellules iraient s'ancrer par sédimentation sur les surfaces.

Quatre surfaces pour chaque polymère et chaque concentration ont été utilisées. Des puits témoins, c'est-à-dire des puitsensemencés dans les mêmes conditions mais sans surface de PLCL, ont été également utilisés (N=3) pour chacune des deux concentrations. L'ensemble a été incubé pendant 31 jours, et un test *AlamarBlue*® a été réalisé à J2, J7, J14, J21 et J31. Le milieu de culture a été renouvelé tous les trois jours. Les résultats de ces expériences en termes de pourcentage de réduction moyen pour chacune de ces dates ont été rassemblés ci-dessous (Illustration IV 2).

Il est nécessaire de préciser que le nombre d'échantillons utilisés ne permet pas de tirer des conclusions quantitatives avec une pertinence statistique suffisante. Nous nous contenterons donc simplement ici de comparer des tendances plutôt que des valeurs de pourcentage de réduction. La liste des remarques suivantes peut être dressée à partir de ces résultats préliminaires :

- Alors que l'ensemencement sur les surfaces de P(LL85/CL15) paraît très satisfaisant à J2, le pourcentage de réduction décroît ensuite brutalement durant la première semaine. Cela peut certainement s'expliquer par le caractère hydrophobe connu de ce type de matériau, qui limite les capacités d'ancrage des cellules.
- À J7, le pourcentage de réduction pour les surfaces de P(LL85/CL15) et de P(LL97/CL3) sont semblables et inférieurs à celui correspondant au témoin. L'ensemencement ces cellules paraît donc moins efficace sur les surfaces de PLCL que sur le fond des boîtes de culture.
- Dans le cas d'une concentration à 5000 cellules/puits, une forte croissance est observée entre J7 et J14, suivie par une décroissance puis un début de stabilisation vers J31. Cette évolution peut être interprétée par une forte prolifération cellulaire tout d'abord, puis une diminution/stabilisation due à l'arrivée à confluence des cellules.
- Le pourcentage de réduction à J31 est semblable (et même supérieur) pour les surfaces de PLCL et pour les boîtes de culture, pour une concentration de 5000 cellules/puits.
- Bien qu'une croissance du pourcentage de réduction soit observée pour les surfaces de PLCL à une concentration à 2000 cellules/puits, il reste néanmoins bien inférieur à celui

correspondant au témoin à J31.

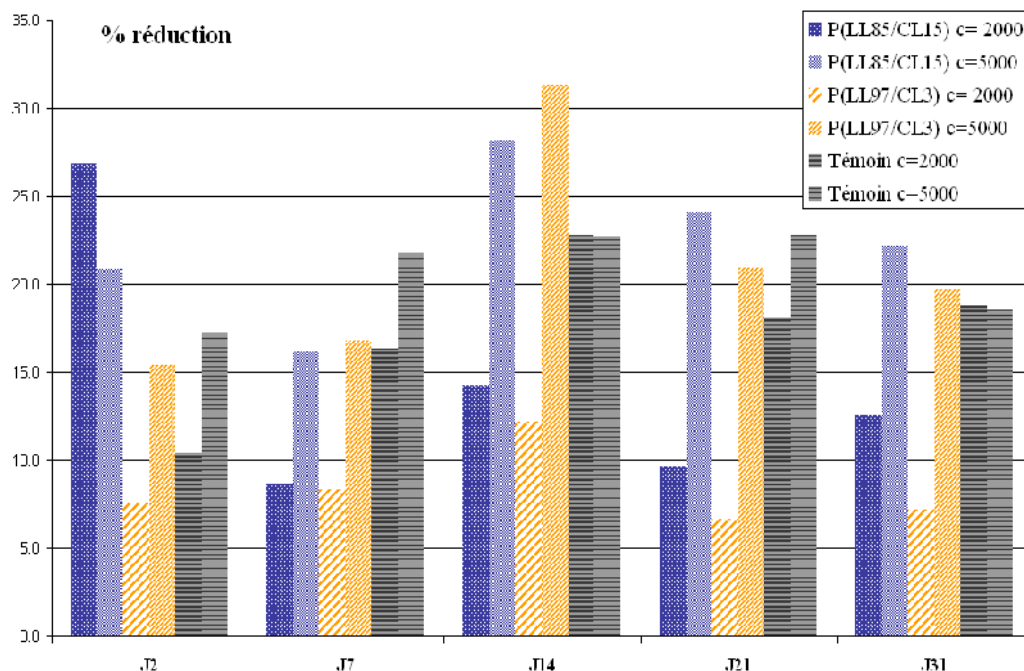


Illustration IV 2: Résultat de l'étude de biocompatibilité réalisé pour deux polymères (P(LL85/CL15) et P(LL97/3)) et deux concentrations (2000 et 5000 cellules/puit) différents. Résultats issues d'un test AlmarBlue® (section IV. 2.3.2).

À partir de ces quelques observations, nous pouvons affirmer que les surfaces de PLCL sont biocompatibles et permettent une prolifération cellulaire satisfaisante si la concentration de cellulesensemencées initiale est importante. Aucune contamination n'a été observée durant cette période, et le protocole de stérilisation adopté paraît donc satisfaisant. Nous soulignerons néanmoins que l'effet de cette stérilisation sur le comportement mécanique des fibres n'a pas été étudié ; ce point méritera donc d'être abordé dans une prochaine étude. S'il s'avérait qu'une stérilisation à l'alcool altèrait notablement les propriétés du matériau, d'autres protocoles comme l'irradiation β couramment utilisé pour stériliser les prothèses ligamentaires synthétiques pourraient être envisagés [Viateau2011].

3.2. Ensemencement

En ce qui concerne l'ensemencement de ces cellules, le protocole doit permettre une distribution homogène dans la matrice de manière reproductible et sans endommager les cellules [Adebiyi2011]. En effet, nous verrons par la suite qu'une distribution spatiale homogène des cellules dans la matrice ainsi qu'un apport de nutriments et une évacuation des déchets sans restrictions

locales sont impérativement requis pour éviter l'accumulation des cellules en périphérie de la matrice [Sengers2007].

Le protocole d'ensemencement d'une matrice tridimensionnelle diffère du cas présenté en section précédente, en ceci que les cellules ne vont pas tomber par sédimentation sur l'échantillon. Dans une étude préliminaire qui ne sera pas rapportée dans ce mémoire, les matrices ont été immergées dans une solution de concentration connue en CSM avec ou sans agitation du milieu. Ce protocole s'est montré inefficace, probablement à cause de la tendance des CSM à aller de façon privilégiée tapisser le fond de la boîte de culture plutôt que la matrice.

Le protocole qui a été mis au point ensuite (et sera utilisé dans la section IV.3.3.) est le suivant : des échantillons de matrice (4 couches, fibres de 170 μm) d'une longueur de 7 mm sont découpés à l'aide d'un soude-sac, puis stérilisés suivant le protocole présenté précédemment. Une suspension contenant 200 000 cellules est ensuite déposée sur chaque matrice placée dans un puits de culture et, en raison de leur morphologie et des forces de capillarité mises en jeu, la suspension vient se placer immédiatement au cœur des matrices. Les matrices ensemencées sont alors placées 30 minutes en incubateur, de manière à permettre l'adhésion des CSM. Le milieu est ensuite ajouté progressivement, et les matrices sont immergées au total dans 1.5mL de milieu de culture complet. Le milieu a été complété avec de l'ascorbate-2-phosphate à 100 $\mu\text{g/mL}$ et changé 3 fois par semaine.

3.3. Résultats de cultures statiques

3.3.1 *Essai 1 : prolifération de cellules ovines*

Un premier essai de prolifération cellulaire a été réalisé en collaboration avec l'université de Technologie Queensland (Australie). Les 200 000 cellules par matrice ont été ici ensemencées de façon très concentrée, dans une suspension de 15 μL placée au centre de la matrice. Cinq matrices ont été prélevées aux jours 3, 7, 14, 21 et 28 pour les quantifications ADN et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. Les matrices ont été ensuite placées dans 500 μL de Proteinase K à 60°C pendant 36 heures afin d'extraire les acides nucléiques présents dans les échantillons. Un essai *Picogreen*® a été ensuite réalisé suivant le protocole détaillé précédemment. Les résultats de ce test sont représentés Illustration IV 3. Une nette prolifération est observée durant les trois premières semaines de culture, suivie par une diminution la dernière semaine. Cette diminution peut être expliquée par une obstruction des pores situés à la périphérie de la matrice, privant d'apports en nutriments le cœur de la matrice. Les barres d'erreurs conséquentes sont notamment dues au fait qu'un tapis cellulaire recouvrant le fond des puits de culture s'est formé durant la culture, et a

parfois été difficilement isolé de la matrice.

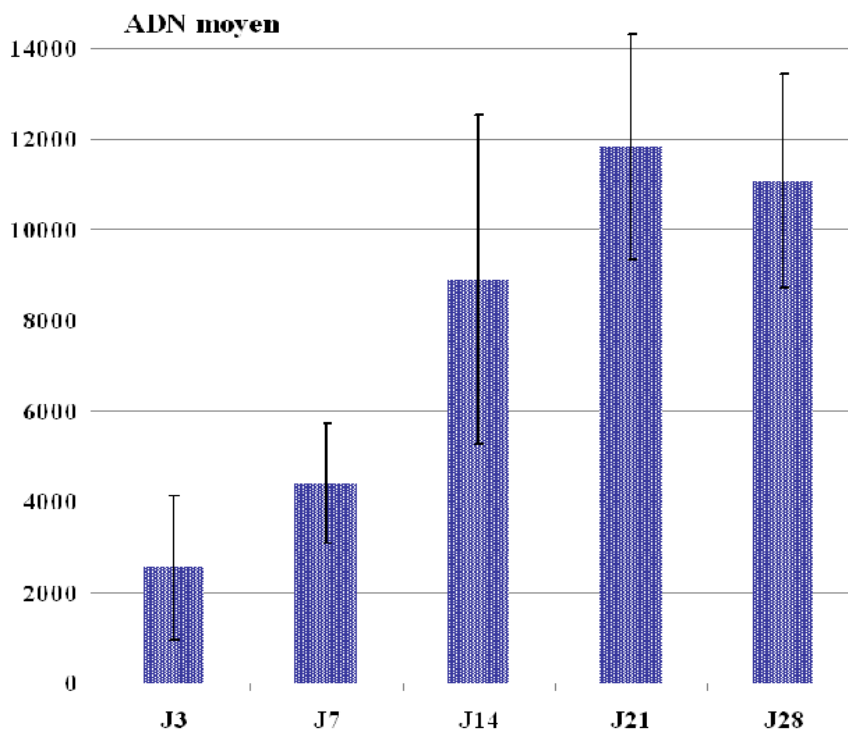


Illustration IV 3: Évolution de l'ADN sur des échantillons (N=5) de matrices. Résultats issus d'un test Picogreen® (section IV. 2.3.2).

Deux matrices ont été conservées aux jours 3, 7, 14, 21 et 28 pour être visualisées au microscope confocal et au MEB, de manière à examiner la morphologie des cellules ainsi que la distribution spatiale du néo-tissu. En ce qui concerne l'analyse au MEB, les échantillons ont été fixés dans une solution à 2.5% de glutaraldéhyde, puis déshydratés par des solutions d'éthanol de concentrations croissantes, et finalement recouvertes d'une pellicule de carbone. Les résultats de ces acquisitions sont donnés Illustration IV 4.

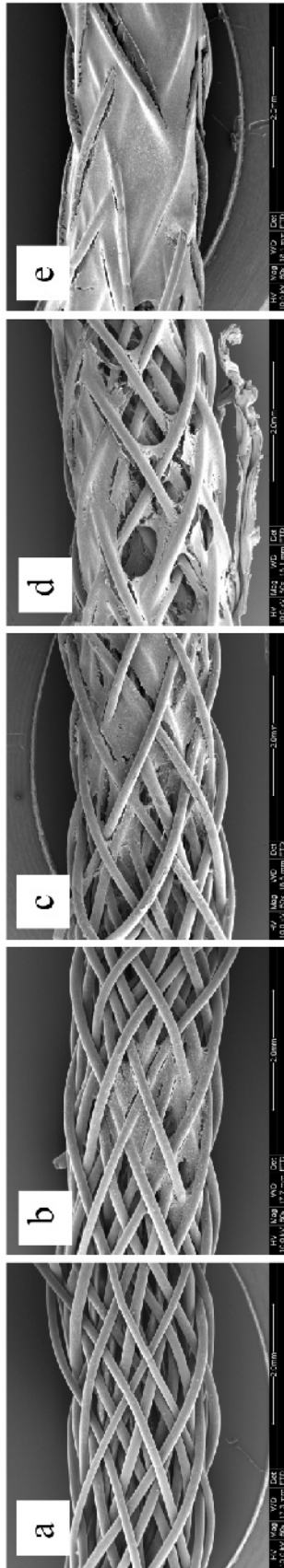


Illustration IV 4: Prolifération de CSM ovines dans la matrice. Images issues de microscopie à balayage électronique à (a) J3 (b) J7 (c) J14 (d) J21 (e) J28. La barre d'échelle correspond à 2mm.

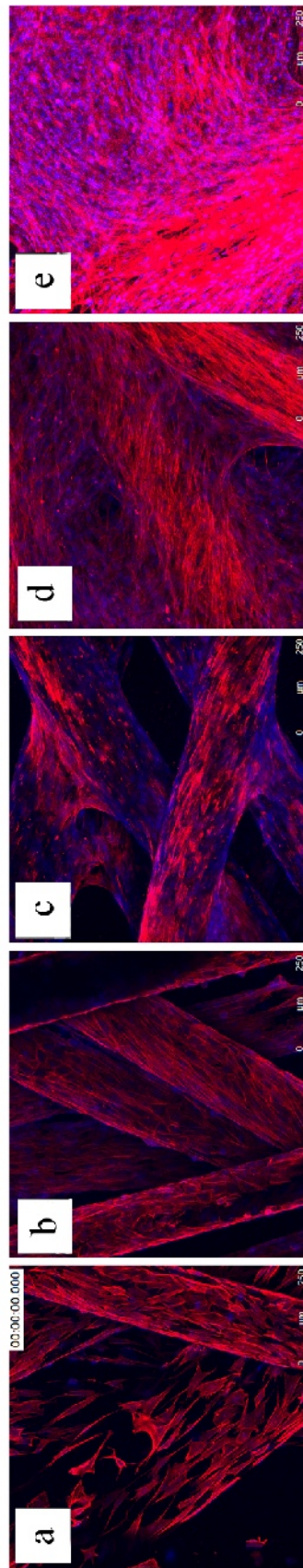


Illustration IV 5: Prolifération de CSM ovines dans la matrice. Images issues de microscopie confocale à (a) J3 (b) J7 (c) J14 (d) J21 (e) J28. Le cytosquelette d'actine est marqué en rouge, tandis que le noyau des cellules est visible en bleu. L'échelle sur chaque image correspond à 250 µm.

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

À l'échelle macroscopique (Illustration IV 4), nous observons clairement que la prolifération cellulaire s'effectue en premier lieu autour du centre de la matrice, où la suspension de cellules a été déposée lors de l'ensemencement. Il a d'ailleurs été rapporté que ce type d'ensemencement au centre de la matrice était préférable pour éviter les phénomènes de restriction des transports de masse causés par l'obstruction des pores extérieurs [Chung2010]. Cette distribution spatiale semble devenir homogène sur la longueur de la matrice au bout de quatre semaines. Sur l'image MEB à J21 (Illustration IV 4.d), nous pouvons remarquer qu'une couche de matrice extracellulaire s'est dissociée de la matrice, probablement suite au protocole de fixation. Nous observons également que les pores extérieurs de la matrice semblent totalement obstrués à J28, ce qui peut expliquer la diminution du nombre de cellules observées durant la dernière semaine de culture. Cette obstruction des pores extérieurs peut être expliquée par le fait que la matrice utilisée possède des pores relativement petits en raison du diamètre de fibres et du nombre de couches alors utilisés. De plus, aucune circulation fluide de la périphérie au cœur de la matrice n'est présente lors d'une culture statique, tandis qu'une circulation radiale due à la « contraction » de la matrice est attendue lors de l'application de sollicitations mécaniques par le biais du bioréacteur, dont l'intérêt et le fonctionnement vont être présentés ci-après (section IV.4.).

Pour l'imagerie confocale, les matrices ont été fixées dans une solution à 4% de paraformaldéhyde, puis exposées 5 minutes à une solution à 0,2% de triton X permettant de perméabiliser la membrane cellulaire et ainsi d'accéder au noyau des cellules. Les cellules ont ensuite été marquées par immersion dans un mélange de 0,8 U/mL de phalloïdine-TRITC (marquage du cytosquelette d'actine) et de 5 µg/mL d'une solution de DAPI (marquage du noyau). Après rinçage, les matrices ont alors été analysées à l'aide d'un microscope confocal (Leica TCS SP5 II, Leica). Une série d'images d'une épaisseur de 4 µm ont été acquises sur une épaisseur totale de 400 à 600 µm suivant l'échantillon, puis une projection a été effectuée *via* le logiciel Leica Microsystems LAS AF (v.1.8.2). Les résultats de ces acquisitions sont donnés Illustration IV 5, le cytosquelette d'actine étant représenté en rouge et les noyaux cellulaires en bleu. Nous pouvons observer d'après la morphologie élancée des cellules à J3 que le protocole d'ensemencement adopté permet aux cellules de s'ancrer aux fibres de PLCL. En une semaine, les cellules semblent avoir recouvert les fibres de la matrice ; à partir de la seconde semaine, des ponts entre les fibres commencent à apparaître, et à partir de la troisième semaine un tapis cellulaire lie l'ensemble des fibres de la matrice. Il est intéressant d'observer qu'un premier stade de la culture (Illustration IV 5.a et Illustration IV 5.b), les cellules semblent s'orienter de façon privilégiée dans la direction des fibres. Cette capacité des cellules à s'adapter à la courbure de leur substrat est connue, et des éléments de modélisation ont été fait l'objet de travaux récents [Sanz-Herrera2009a].

3.3.2 Essai 2 : cellules humaines

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

Dans un second temps, le protocole précédent a été répété au biopôle de Nancy en utilisant des cellules humaines. Deux échantillons de matrice ont été ensemencés suivant le protocole précédent (section IV.3.2.), les 200 000 cellules étant cette fois placée dans 50 μ L de milieu de façon à distribuer la suspension cellulaire de façon plus homogène dans la matrice. Les cellules ont été

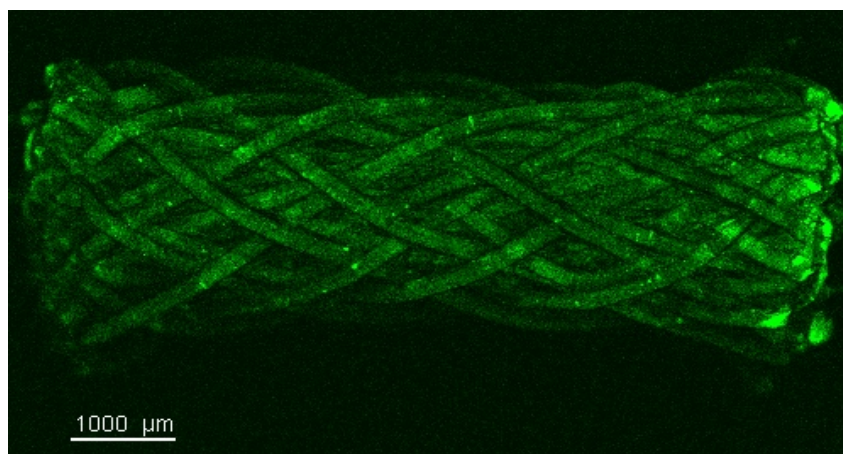


Illustration IV 6: Exemple de matrice utilisée pour la culture statique. Image obtenue grâce à l'autofluorescence des matrices dans le vert (excitation à 488 nm). Image obtenue à l'aide d'un microscope à fluorescence.

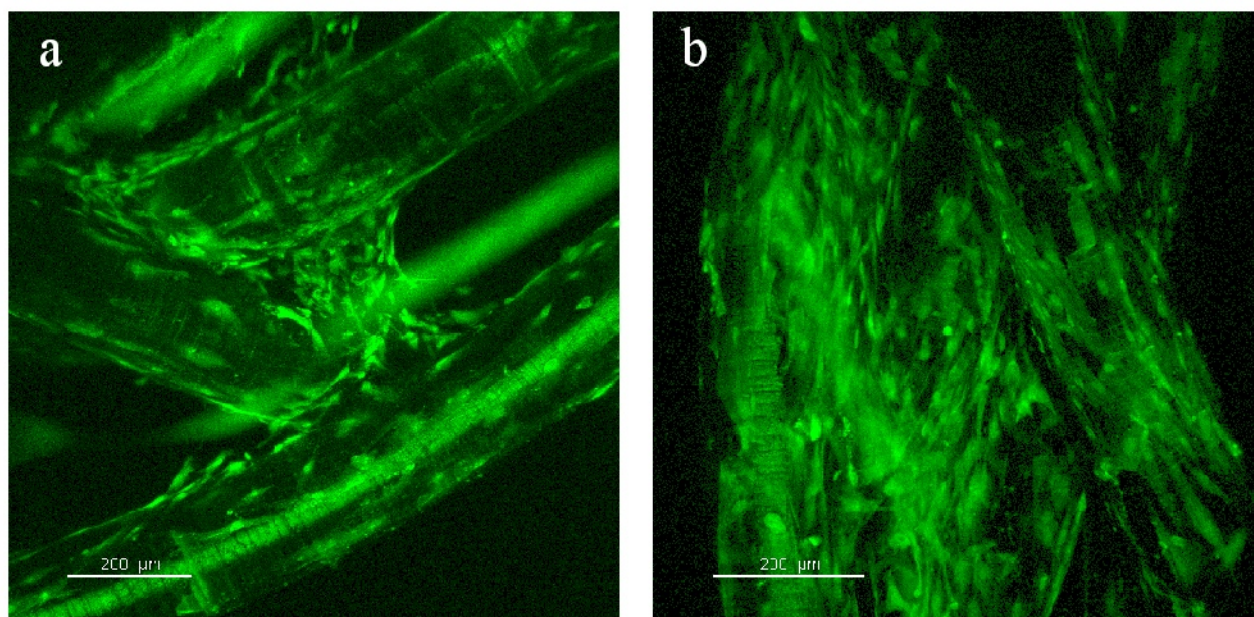


Illustration IV 7: Cellules ensemencées sur la matrice de support à (a) J1 et (b) J7. Images issues de la superposition de plusieurs acquisitions réalisées pour des plans focaux séparés de 10 μ m, et avec une excitation à 514 nm, permettant de visualiser l'autofluorescence des fibres ainsi que les noyaux cellulaires marqués à l'EthD-1.

cultivées 7 jours, avec un changement de milieu à J4. Les échantillons de matrice ont été fixés à J1 et J7 dans une solution à 4% de paraformaldéhyde puis conservés à -18°C jusqu'à leur utilisation en imagerie. Nous avons ensuite marqué les noyaux cellulaires à l'aide d'ethidium homodimer-1 (EthD-1) à une concentration de 4mM. Ce marqueur est excité autour de 528 nm et possède une émission maximale à 617 nm ; or, des essais préliminaires ont permis de constater que les matrices présentaient de l'autofluorescence dans le vert, principalement autour de 488nm (Illustration IV 6). Ainsi, les images confocales ont été réalisées sur la plateforme PTIBC-IBISA à l'aide d'un microscope confocal (Leica Z16 APO A) et avec une excitation à 514 nm, ce qui a permis de visualiser à la fois les fibres de la matrice et le noyau des cellules marquées à l' EthD-1. Deux résultats de ces acquisitions pour J1 et J7 sont présentés en Illustration IV 7.

Ces images ne peuvent pas être utilisées pour quantifier la prolifération cellulaire, d'autant plus sur une cinétique de culture aussi courte. Néanmoins, on peut affirmer que l'ensemencement a permis aux CSM humaines d'adhérer à la matrice proposée, et que ces cellules étaient encore présentes à J7. On peut également remarquer sur ces acquisitions que des « ponts » cellulaires sont formés dès le premier jour de culture.

4. Culture dynamique et bioréacteur

L'intérêt du bioréacteur dans notre démarche de reconstruction du LCA par ingénierie tissulaire peut être vu sous deux aspects. D'une part, nous avons vu que le bioréacteur vise à fournir aux cellules les stimuli régissant leur comportement, et ainsi d'optimiser la formation de néo-tissu au sein des matrices. D'autre part, à l'échelle fondamentale de la recherche où nous nous plaçons, le bioréacteur peut être aussi utilisé pour simuler *in vitro* l'implantation du biosubstitut à l'intérieur du genou, de manière à évaluer son comportement dans le temps sans avoir recours à des implantations animales coûteuses.

Dans ces deux cas (optimisation de la culture *in vitro* et simulation d'une implantation *in vivo*), le bioréacteur doit être capable d'imposer des sollicitations mécaniques parfaitement maîtrisées à la matrice de support. En effet, ces sollicitations mécaniques vont dans le premier cas être transmises aux cellules *via* la matrice de support et ainsi influencer leur différenciation [Altman2002a], leur prolifération [Webb2006] ou encore la composition de la matrice extracellulaire sécrétée [Altman2002a][Chiquet2003]. Dans le second cas, nous avons vu que le LCA était soumis à plusieurs types de sollicitations durant la phase de réhabilitation [Beynon1998a][Toutoungi2000][Li2005][Hosseini2009] qu'il est nécessaire de reproduire par l'intermédiaire du bioréacteur de manière à juger de l'évolution du comportement du biosubstitut lors d'un fonctionnement physiologique. Par conséquent, la mise en place d'un bioréacteur dynamique spécifique au cas du

ligament constitue une étape cruciale de la démarche d'ingénierie tissulaire adoptée dans la présente étude. En outre, nous avons vu que ces sollicitations mécaniques dynamiques permettaient également de générer un mouvement de l'environnement fluide, potentiellement ajustable en faisant varier la fréquence des sollicitations cycliques [Milan2009]. Cette circulation fluide est souhaitable non seulement pour améliorer la circulation des différentes substances biochimiques à l'intérieur de la matrice (apports en nutriments et évacuation des déchets), mais également pour générer des contraintes de cisaillement qui ont un effet avéré sur l'activité cellulaire [Bakker2001] [McGarry2005].

Bien que des bioréacteurs commerciaux évolués soient maintenant disponibles (Bose® Biodynamic system), ils restent pour l'instant peu abordables et la majorité des équipes de recherche continue de développer elles-mêmes leurs bioréacteurs [Langelier1999][Altman2002b][Kahn2009]. Un bioréacteur permettant d'imposer des cycles de traction-torsion a donc été développé au sein du LEMTA et fabriqué à l'atelier mécanique de l'ENSEM, de manière à reproduire une cinématique proche de la cinématique réelle du LCA. La conception mécanique de ce bioréacteur a été réalisée en parallèle de cette thèse, et ne sera donc pas présentée en détail ici ; en revanche, sa finalisation et sa mise en place ont été réalisées dans le cadre du travail qui fait l'objet de ce mémoire, et seront donc présentées ci-après.

4.1. Présentation du bioréacteur utilisé

4.1.1 Présentation générale

La science expérimentale, lorsqu'elle est appliquée au domaine du vivant, doit inévitablement faire face à une forte variabilité des résultats et faire intervenir une dimension statistique. Ainsi, le bioréacteur qui a été développé permet de cultiver de façon isolée six échantillons sous les mêmes conditions de culture, et ainsi de tirer des conclusions statistiques sur la signification d'une observation. Le bioréacteur possède six chambres indépendantes, disposées circulairement, alimentées en milieu de culture et dans lesquelles les matrices de support peuvent être fixées et soumises à des cycles de traction-torsion identiques. La traction est assurée par la translation d'un plateau solidaire des mors hauts de chaque chambre, tandis que la torsion est assurée par la rotation des chambres, solidaires des mors bas de chaque chambre (Illustration IV 8). Pour assurer la stérilité des éléments potentiellement en contact avec le milieu de culture, les chambres doivent être naturellement étanches à l'air. Or, le mouvement relatif des mors haut par rapport aux chambres nécessite une liaison avec un jeu suffisant, jeu qui peut donc être à la source d'une contamination ; l'étanchéité à l'air des chambres a donc été imaginée à travers un joint d'étanchéité jetable qui

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

n'oppose aucune résistance au mouvement relatif de translation/rotation des axes par rapport aux chambres. Les matrices sont introduites dans les chambres à travers des fenêtres dont l'étanchéité est assurée par un joint plat autoclavable. Les chambres ont été réalisées en polycarbonate, permettant d'observer la matrice en cours de culture.

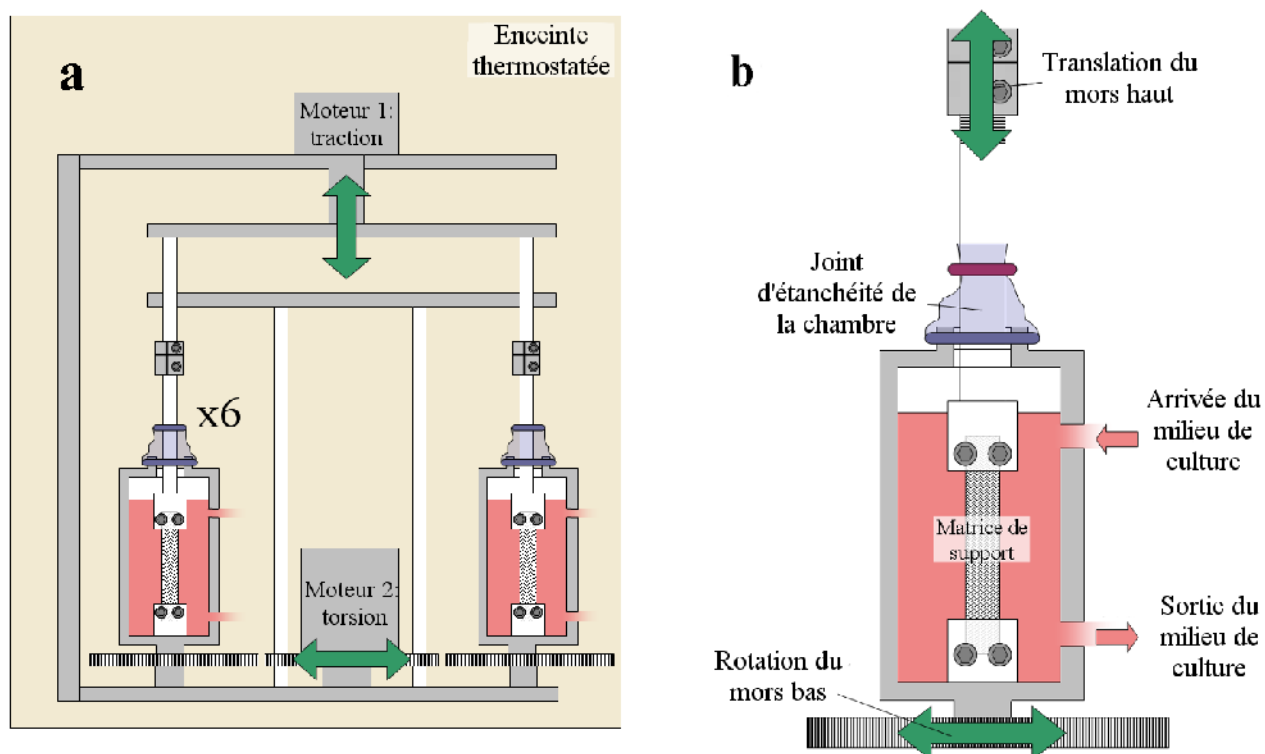


Illustration IV 8: (a) Fonctionnement général du bioréacteur (b) Zoom sur l'une des six chambres.

Les mouvements de translation et de rotation sont assurés par deux servo-moteurs indépendants asservis en permanence (le retour assuré par le codeur du moteur est ajusté en permanence sur un signal de commande). Le mouvement de rotation des chambres est transmis du moteur aux chambres par des liaisons par engrenages, tandis que la translation du plateau haut est assurée par le biais d'une vis à billes.

La régulation en température de l'ensemble des chambres est assurée en plaçant l'ensemble des six chambres dans une enceinte thermostatée (Illustration IV 8.a et Illustration IV 9). La régulation en température de l'enceinte du bioréacteur s'effectue grâce à d'une circulation d'air chaud, assurée par deux résistances chauffantes ventilées et une sonde de température liées à un régulateur PID.

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

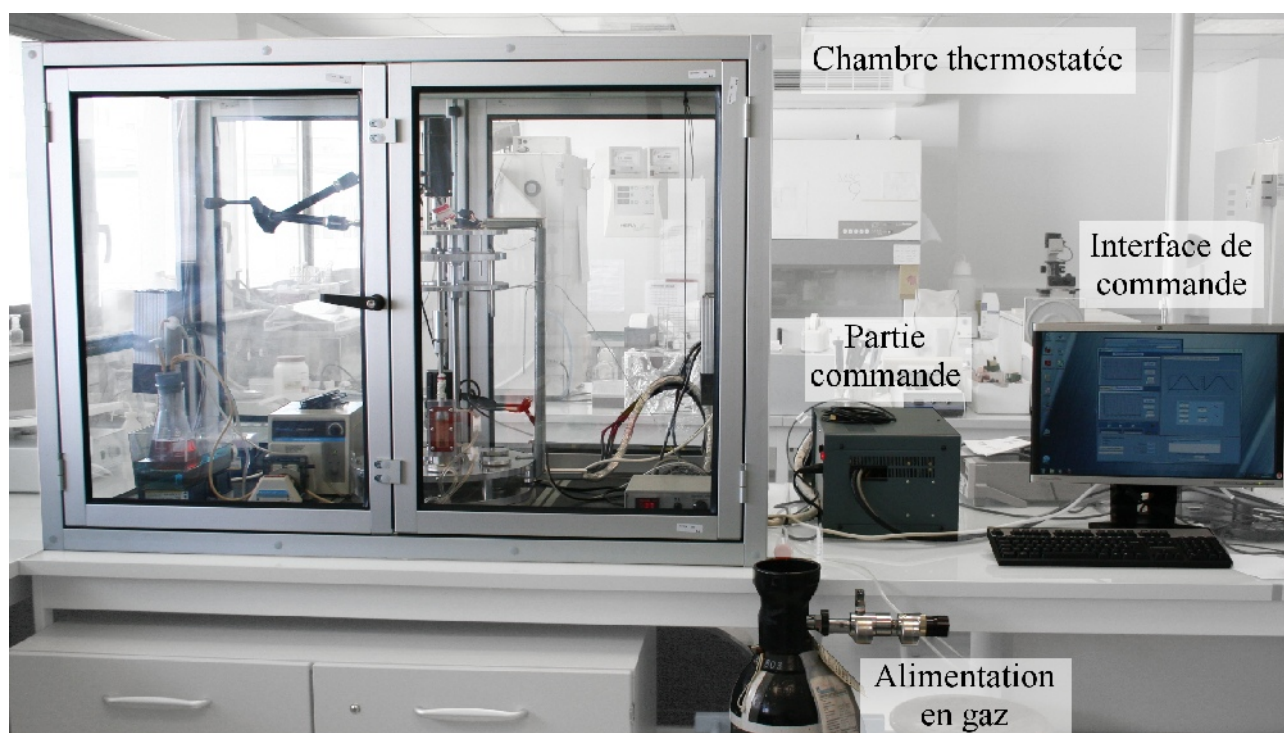


Illustration IV 9: Vue générale du bioréacteur en fonctionnement.

4.1.2 Circulation du milieu de culture

Un circuit permettant une circulation continue du milieu de culture dans les chambres est placée dans l'enceinte thermostatée du bioréacteur : il a été représenté schématiquement Illustration IV 10. La circulation est assurée par une pompe péristaltique et un ensemble de tubulures *Masterflex*® autoclavables. Les différentes connections entre tubulures, erlenmeyers et chambres sont assurées par des raccords *Luer*® également autoclavables. L'alimentation des six chambres est effectuée en rassemblant les chambres deux à deux, et trois erlenmeyers sont donc utilisés pour alimenter les trois groupes de deux chambres. Lorsque le régime permanent est établi, le niveau stabilisé au sein des chambres correspond au niveau de milieu dans les erlenmeyers, avec une différence due à la fois aux pertes de charges dans les tubulures et au fait que la pression dans les chambres est différente de la pression atmosphérique (les chambres étant totalement étanches à l'air). Néanmoins, nous noterons que les joints d'étanchéité jetable sont souples et permettent en partie d'atténuer ses variations de pression dans les chambres suivant qu'ils gonflent ou se contractent.

Au préalable, il est nécessaire que les tubulures soient intégralement remplies de milieu ; il est possible de chasser les bulles qui subsistent en déplaçant l'erlenmeyer, c'est-à-dire en provoquant des circulations de milieu à cause du différentiel de hauteur entre l'erlenmeyer et la chambre. Le

milieu de culture est alimenté en gaz *via* une bombonne située hors de l'enceinte du bioréacteur (Illustration IV 9). Ce gaz est branché sur un filtre de 22 μm , de manière à assurer la stérilité avant le raccordement au gaz. Les réservoirs de milieu de culture permet l'échappement des gaz vers l'extérieur, *via* un autre filtre 22 μm .

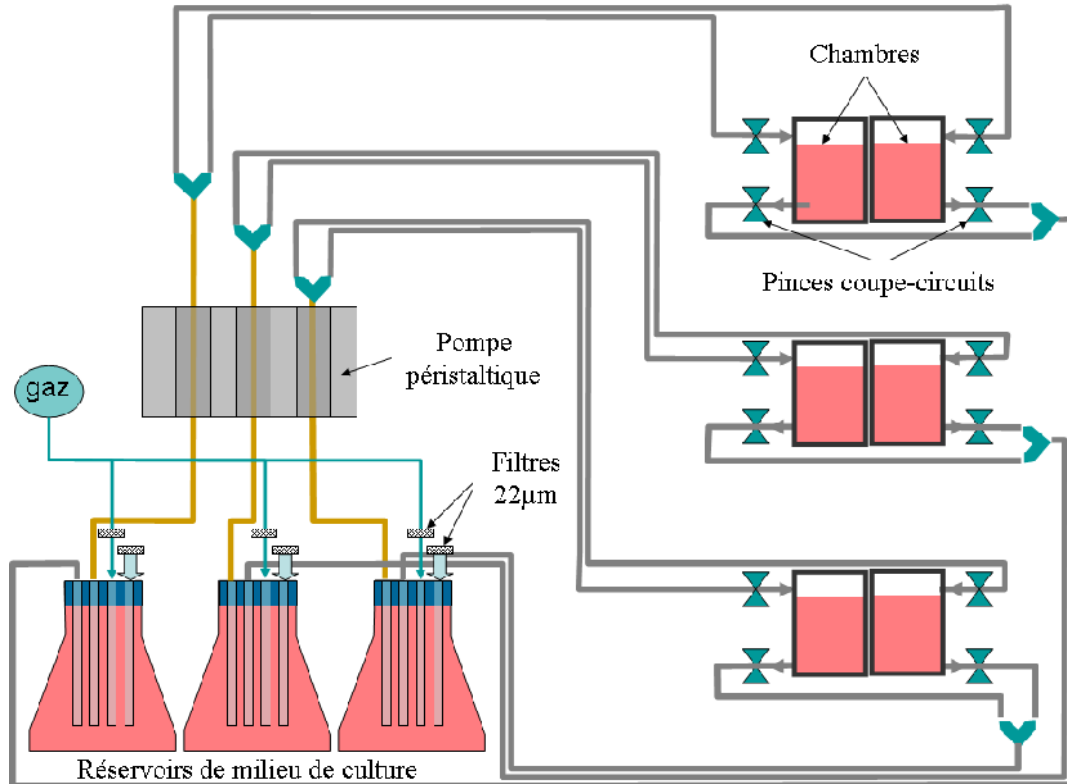


Illustration IV 10: Schéma de la circulation du milieu de culture dans l'enceinte du bioréacteur.

4.1.3 Partie commande et interface logicielle

La partie commande ainsi que le matériel informatique nécessaires au pilotage du bioréacteur sont situés hors de l'enceinte thermostatée (Illustration IV 9). Par le biais de cette interface logicielle, des cycles de traction seule, torsion seule ou traction-torsion combinées peuvent être imposés de façon entièrement planifiée sur plusieurs journées. Ces cycles peuvent suivre une allure sinusoïdale ou en dents de scie ; les points qui composent ces signaux sont calculés à partir de paramètres d'entrées comprenant l'amplitude et la fréquence du signal, ainsi que le déphasage entre traction et torsion. Un retour sur le cycle de chargement réellement effectué, assuré par deux codeurs magnétiques, est également disponible à travers l'interface logicielle (Illustration IV 11.a). Une caméra synchronisée sur la commande du bioréacteur permet de capturer des vidéos des cycles en temps réel, ou d'acquérir une image chaque n cycles de manière à suivre une évolution sur une

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

longue durée. Les paramètres d'acquisition ainsi que la visualisation et la gestion des fichiers vidéos se font également à travers l'interface logicielle.

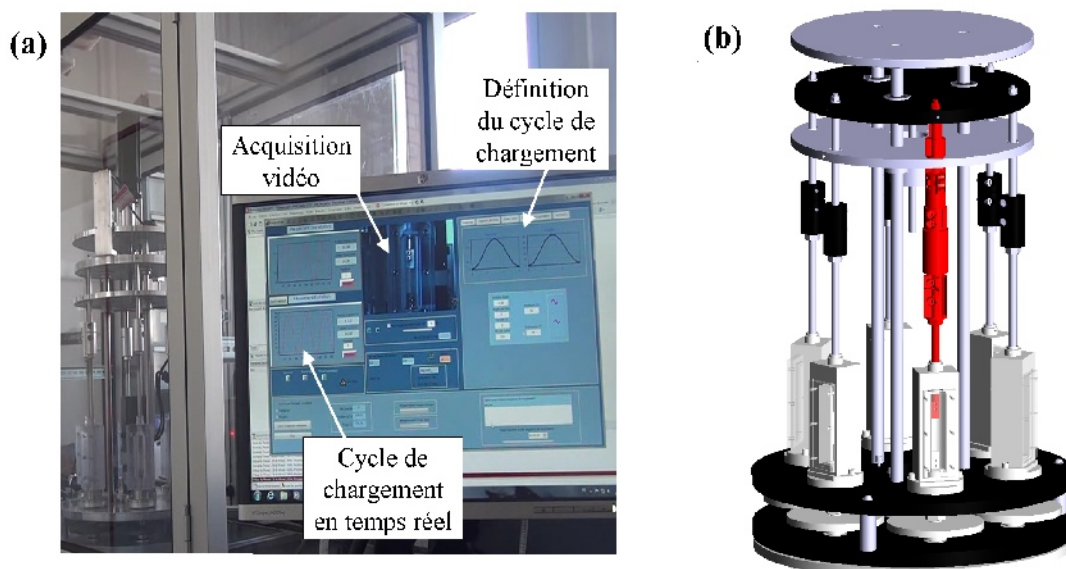


Illustration IV 11: (a) Interface logicielle utilisée pour le pilotage du bioréacteur. (b) Définition CAO du bioréacteur et du futur capteur de force qui viendra équiper l'une des six chambres (en rouge).

L'un des intérêts du bioréacteur -à terme- sera de pouvoir quantifier l'évolution des propriétés mécaniques des matrices en culture due à la fois à la dégradation du matrices et à la formation du néo-tissu. Dans cette optique, l'acquisition de données provenant d'un futur capteur de force qui équipera l'une des six chambres du bioréacteur (Illustration IV 11.b) a été intégré à la partie commande et à l'interface logicielle ; ce dispositif n'est néanmoins pas encore opérationnel en l'état actuel du bioréacteur.

4.1.4 Sécurité du système

Le fonctionnement du bioréacteur implique des mouvements de pièces en translation et en rotation générés par des moteurs relativement puissants. La sécurisation de l'ensemble représente donc un point clé de sa mise en place, tant au niveau de la protection de l'utilisateur que de la limitation des risques d'endommagement du système.

En particulier, un déplacement vertical trop important du plateau lié aux axes des 6 chambres représente un risque d'endommagement important des différentes pièces du système. Or, la position initiale du plateau avant le chargement cyclique peut varier entre deux expériences à cause des dimensions des échantillons placés dans les chambres. Par conséquent, deux types de sécurités ont

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

été mis en place pour le déplacement de ce plateau : la première est constituée de deux butées matérielles agissant en coupe-circuits sur la commande du bioréacteur (Illustration IV 12). Un second type de dispositif a été installé afin d'ajouter une limite logicielle qui ne permet pas d'imposer un mouvement considéré dangereux. Ce dispositif est composé de deux fourches optiques réglables (en fonction de la dimension des échantillons notamment), qui constituent des capteurs de fin de course (Illustration IV 12). Une fonction automatisée du logiciel d'utilisation du bioréacteur permet d'aller détecter ces capteurs de fin de course, puis d'ajuster les limites logicielles en fonction des valeurs détectées. Le mouvement des engrenages permettant la rotation des six chambres constitue également un risque important pour l'utilisateur qui manipule dans l'environnement du bioréacteur : un capot de protection a été rajouté de manière à isoler cette partie du système. Enfin, un bouton-poussoir global permet de couper l'alimentation de l'ensemble du bioréacteur en cas d'urgence.

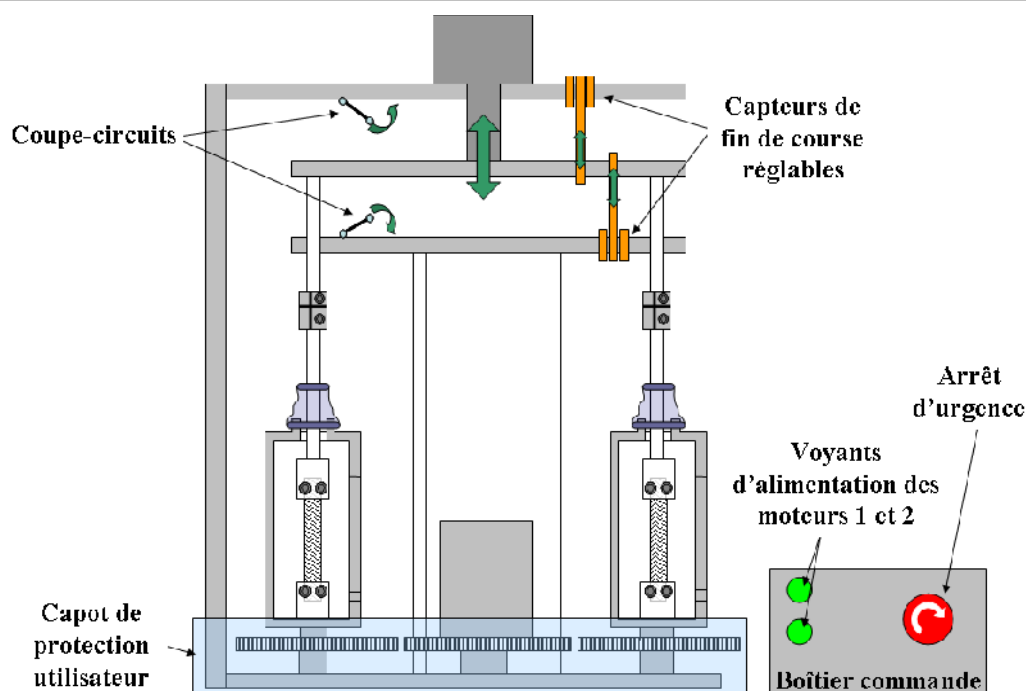


Illustration IV 12: Dispositifs de sécurité installés sur le bioréacteur.

4.2. Protocole de mise en culture

L'utilisation du bioréacteur présenté ci-dessus dans le cas de la culture de cellulesensemencées sur la matrice de support tressée nécessite la mise en place d'un protocole de stérilisation, d'ensemencement et de montage détaillé. Ce protocole est présenté dans son intégralité en annexe 3 ; il est principalement destiné aux futurs utilisateurs du bioréacteur qui auront notamment à évaluer l'activité biologique résultant de différentes conditions de culture. Brièvement, le protocole comprend d'abord la stérilisation de l'ensemble des pièces potentiellement en contact avec le milieu de culture. Pour toutes les pièces, à l'exception du joint d'étanchéité et de la matrice de support, cette stérilisation est effectuée par autoclavage ; pour ces deux autres pièces, elle est effectuée par immersion dans l'alcool puis par exposition aux UVs. Le reste des opérations est ensuite réalisé sous une hotte à flux laminaire pour éviter les contaminations par l'air, jusqu'à ce que l'ensemble composé des chambres et du circuit d'alimentation soit rendu étanche à l'air. Les matrices de supports sont d'abord montées dans les mors, puis l'ensemencement est effectué selon le protocole décrit plus haut. Une pièce permettant de supprimer le mouvement relatif des mors haut par rapport aux chambres est utilisée durant cette étape. Les chambres sont ensuite fermées, et après une incubation de 30 minutes, elles sont reliées sous la hotte à l'ensemble des éléments assurant leur alimentation. Une fois l'ensemble des chambres et des circuits d'alimentation rendus étanches à l'air, les chambres sont montées dans le bioréacteur, le circuit d'alimentation est placé dans l'enceinte

thermostatée du bioréacteur, et les réserves de milieu de culture sont alimentées en gaz par une bonbonne extérieure.

4.3. Résultats préliminaires d'utilisation du bioréacteur

Des essais préliminaires ont été effectués en vue de s'assurer que le protocole mis au point permettait de cultiver des cellules sans contamination, en imposant des cycles de traction-torsion de manière programmée, et avec un renouvellement du milieu de culture. En particulier, des CSM humaines ont étéensemencées sur deux matrices d'une longueur de 20 mm suivant le protocole défini précédemment (section IV.3.2.), à deux concentrations de 200 000 cellules/matrice et 600 000 cellules/matrice. Les cellules ont été placées dans 100 μ L de milieu de culture complet pour chaque matrice. Les matrices ont ensuite été placées 48 heures dans le bioréacteur avec une circulation du milieu de culture et une alimentation en CO₂. Vingt-quatre heures après le début de la culture, les matrices ont été sollicitées à 2.5% d'allongement et 10° de torsion à 1 Hz à raison de deux minutes toutes les 30 minutes, et pendant 10 heures. Les matrices ont ensuite été fixées puis marquées avec une solution d'EthD-1 à 4 mM. Les observations au microscope confocal (Leica Z16 APO A) de ces matrices sont données ci-dessous (Illustration IV 13).

De nouveau, le nombre d'échantillons et la période de culture ne permettent pas de dresser des conclusions quantitatives. En revanche, on peut affirmer que les cellules sont encore présentes à J2 après avoir été sollicitées par le biais du bioréacteur. Nous avons pu remarquer également qu'une concentration plus élevée de cellules ne se traduisait pas pour une cinétique aussi courte en une meilleure homogénéité de l'ensemencement. En revanche, les cellules étaient présentes en plus grand nombre aux endroits où elles ont adhéré.

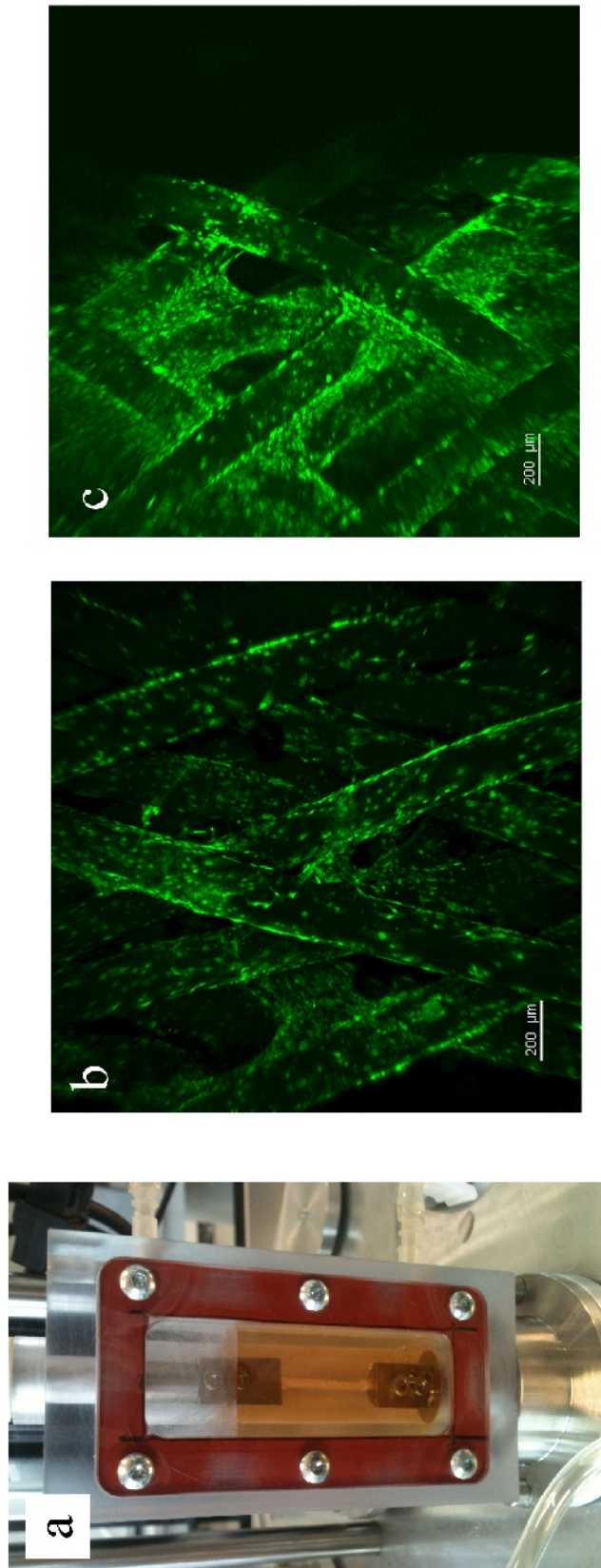


Illustration IV 13: (a) matrice en culture au sein d'une chambre du bioréacteur. (b) et (c) cellules ensesencées sur la matrice de support à (b) 200 000 cellules/matrice et (c) 600 000 cellules/matrice. Images issues de la superposition de plusieurs acquisitions réalisées pour des plans focaux séparés de 15µm, et avec une excitation à 514 nm, permettant de visualiser l'autofluorescence des fibres ainsi que les noyaux cellulaires marqués à l'EthD-1.

5. Discussion et conclusion

Dans ce chapitre, une série d'évaluations biologiques visant à caractériser la capacité des cellules à s'ancrer sur la matrice puis à proliférer et à sécréter de la matrice extracellulaire a été présentée dans un premier temps. Il a été montré que le matériau constitutif de la matrice était biocompatible et permettait aux cellules de s'ancrer et de proliférer. Il a également été souligné que, en raison notamment de l'hydrophobicité connue du PLCL, il était nécessaire d'ensemencer les cellules à de fortes concentrations. Ceci peut constituer une limite pour la matrice proposée ; en effet, il sera nécessaire dans une démarche clinique de faire en sorte que les cellules soient prélevées au patient en grand nombre (ou puissent être fortement multipliées) pour permettre l'adhésion d'un nombre suffisant de cellules à la matrice.

Dans un second temps, une série de cultures statiques a été réalisée pour évaluer le protocole d'ensemencement ainsi que l'aptitude de la matrice à être colonisée par le néo-tissu. Nous avons montré avec des CSM ovines que l'ensemencement de la matrice proposée par une suspension de cellules fortement concentrée permettait d'obtenir en quelques semaines une distribution uniforme de néo-tissu et des sécrétions importantes de matrice extracellulaire, en particulier en présence d'ascorbate-2-phosphate. Nous avons également observé que le protocole établi permettait également à des CSM humaines d'adhérer sur notre matrice de support. Néanmoins, nous noterons que le protocole d'ensemencement ne permet pas d'obtenir une distribution homogène de cellules dans la matrice lors des premiers jours de culture. Comme nous aurons l'occasion de le mentionner dans le chapitre suivant, il sera possible en perspective de ce travail d'envisager de recouvrir la matrice de différents facteurs qui pourraient encourager une adhésion plus homogène des CSM sur les différentes fibres de la matrice.

Lors de ces études statiques, la nécessité d'une circulation de milieu a alors été mentionnée, de manière à éviter l'obstruction des pores situés à la périphérie de la matrice. Nous noterons que, même si cette circulation peut être imposée *in vitro* par le biais d'un bioréacteur par perfusion [Maes2009][Porter2005], cette circulation « artificielle » n'est plus présente après l'implantation. Il est alors préférable de penser que la circulation fluide souhaitée va être provoquée par la contraction radiale de la structure lorsque celle-ci va être soumise à des sollicitations physiologiques. Ce point apporte une justification supplémentaire à l'utilisation d'un bioréacteur permettant d'imposer des sollicitations cycliques.

Le fonctionnement de cet appareil, dont la conception mécanique a été effectuée en parallèle de la thèse qui fait l'objet de ce mémoire, a été ensuite présenté. Il permet d'imposer des cycles de traction-torsion simultanément aux six matrices, afin de répéter *in vitro* les sollicitations physiologiques auxquelles la matrice sera soumise une fois implantée. Un protocole permettant

IV. Caractérisation biologique de la matrice de support et présentation du bioréacteur

d'effectuer la culture dynamique des matrices a été exposé, et des résultats préliminaires encourageants ont été présentés concernant la possibilité de cultiver des CSH humaines dans ce bioréacteur.

La mise en place de ce bioréacteur offre comme perspective évidente la caractérisation de l'activité cellulaire sous différentes conditions de culture. En effet, il sera possible d'envisager à la suite du présent travail de caractériser par le biais du bioréacteur les aspects suivants :

- Influence de la composition du milieu de culture : l'ajout de différents facteurs de croissance ou nutriments devrait influencer la quantité et la composition du néo-tissu qui va être sécrété par les cellules [Rodrigues2011] ;
- Influence de l'alimentation en gaz : la quantité de gaz incorporée dans le milieu de culture peut être régulée *via* un manomètre en sortie de bouteille, et pourrait avoir une influence sur l'activité cellulaire observée [Rodrigues2011] ;
- Influence du type de sollicitation imposée et de son amplitude : suivant que les matrices seront sollicitées à différentes amplitudes et en traction simple, en torsion simple ou en traction-torsion combinées, la distribution et l'amplitude des stimuli mécaniques locaux vont être différents et devraient avoir un certain impact sur le comportement des cellules. Ces stimuli peuvent être quantifiés grâce aux outils numériques développés précédemment ;
- Influence de la fréquence du signal périodique : la vitesse des cycles de sollicitations imposés va notamment jouer sur la circulation de milieu de culture à l'intérieur de la matrice et produire un effet sur l'activité cellulaire. Ces variations de l'activité cellulaire pourront être dues d'une part à des variations de contraintes de cisaillement fluide à l'échelle des cellules, et de l'autre à des variations d'apports en nutriments ;
- Influence de la planification des sollicitations : l'effet de différents régimes d'application des sollicitations, en termes de durée et de fréquence journalière en particulier, est pour l'instant peu maîtrisé [Martin2004], et pourra donc être étudié par le biais du bioréacteur présenté ici ;
- Évolution des propriétés mécaniques de la matrice sous sollicitations physiologiques : le bioréacteur permettra d'accéder à la réponse mécanique de la matrice lors des cycles des chargements. Ceci constitue une des perspectives majeures du bioréacteur, car cette information n'est pas accessible lors d'implantations *in vivo*, sauf utilisation d'un très grand nombre de modèles animaux. Il sera alors possible de vérifier si la formation de néo-tissu est capable de compenser mécaniquement la dégradation de la matrice, ce qui

constitue une des hypothèses fortes de la démarche d'ingénierie tissulaire adoptée ici.

En conclusion, les résultats des études statiques et la mise en place d'un nouveau bioréacteur permettant d'imposer des conditions de culture variées constituent des étapes encourageantes dans la perspective d'optimiser la culture *in vitro* de cellules souches au sein de la matrice de support proposée. Entre autre, ce bioréacteur permettra à terme de caractériser *in vitro* l'évolution du comportement mécanique de la matrice en imposant des sollicitations physiologiques. Néanmoins, si les résultats s'avèrent satisfaisants, il sera bien entendu nécessaire d'envisager une série d'implantations animales avant de pouvoir tirer des conclusions quant à la pertinence clinique de la solution proposée.

V. Bilan et perspectives

Chapitre 5

| | |
|--|-----|
| V.Bilan et perspectives..... | 173 |
| 1.Introduction..... | 174 |
| 2.Bilan concernant la solution proposée..... | 175 |
| 2.1.Confrontation de la solution proposée à l'état de l'art..... | 175 |
| 2.1.1 Ajustabilité..... | 175 |
| 2.1.2 Comportement mécanique..... | 177 |
| 2.1.3 Morphologie..... | 178 |
| 2.2.Limitations actuelles et travaux futurs..... | 179 |
| 2.2.1 Fixation de la matrice de support..... | 179 |
| 2.2.2 Caractérisation mécanique..... | 180 |
| 2.2.3 État de surface et caractère bioactif..... | 181 |
| 3.Outils numériques : bilan et applications..... | 182 |
| 3.1.Bilan et limites des outils présentés..... | 182 |
| 3.1.1 Particularités..... | 182 |
| 3.1.2 Hypothèses et limites..... | 182 |
| 3.1.3 Évaluation des résultats..... | 184 |
| 3.2.Perspective: caractérisation du micro-environnement..... | 185 |
| 3.2.1 Contacts et glissements entre fibres..... | 186 |
| 3.2.2 Direction des déformations locales..... | 187 |
| 3.2.3 Amplitude des déformations locales..... | 188 |
| 3.3.Perspective : modélisation des transports de masse..... | 190 |
| 3.3.1 Intérêt et état de l'art..... | 190 |
| 3.3.2 Code utilisé : particularités et fonctionnement..... | 192 |
| 3.3.3 Préparation de la géométrie de la matrice..... | 192 |
| 3.3.4 Résultats préliminaires et perspectives..... | 193 |
| 4.Conclusion générale..... | 197 |

1. Introduction

Avant de dresser une série de conclusions et de perspectives concernant le présent travail, commençons par rappeler le contexte de recherche dans lequel il s'est inscrit. L'étude qui fait l'objet de ce mémoire a été l'occasion de cristalliser une collaboration entre plusieurs laboratoires de l'université de Lorraine : le LCPM en ce qui concerne la synthèse de biopolymères, le LAEGO pour la porosimétrie à mercure, le LRGP à propos du bioréacteur principalement, le PPIA pour la culture cellulaire, et le LEMTA au sein duquel cette étude a été majoritairement réalisée. La présente étude pose donc les bases de collaborations à venir concernant diverses problématiques de bioingénierie faisant appel à des savoirs issus de différents domaines scientifiques. De plus, des collaborations en cours prêtent à penser que des implantations animales sont à prévoir pour les prochaines années. Des collaborations externes à l'université de Lorraine ont également été initiées à travers la présente étude, notamment avec l'École Centrale Paris en ce qui concerne le code EF utilisé, l'université de Queensland (Australie) pour une partie de la culture cellulaire, ou encore le 3SR LAB de Grenoble en ce qui concerne la tomographie (voir ci-après). Ainsi, ce travail de thèse a été l'occasion de créer une dynamique de recherche prometteuse autour d'une problématique fortement pluridisciplinaire.

Dans ce mémoire, une structure tressée multicouche a été imaginée, fabriquée et caractérisée en vue de constituer une matrice de support pour la reconstruction du LCA conformément aux principes de l'ingénierie tissulaire. Dans une première partie de ce chapitre, nous confronterons la solution proposée à l'état de l'art, puis nous tirerons quelques conclusions préliminaires sur la pertinence clinique d'une telle solution. De plus, la présente étude traite un défi scientifique important qui implique un grand nombre de domaines de recherches : par conséquent, il est inévitable qu'elle présente plusieurs limitations et hypothèses, qu'on tentera de présenter et de discuter, et nous évoquerons quelques développements futurs dont la matrice pourra faire l'objet.

Dans un second temps, nous dresserons un bilan des particularités et des limitations des outils numériques qui ont été proposés. L'utilisation de ces outils a été limitée à la détermination des configurations de matrices qui permettent d'approcher au mieux les contraintes du cahier des charges que nous nous sommes fixés pour la réparation du LCA. Cependant, l'intérêt de ces outils numériques est surtout qu'ils permettent également d'accéder à une série d'informations locales précieuses puisqu'elles touchent à l'environnement des cellules qui serontensemencées au sein de cette matrice, en particulier lors de la culture sous sollicitations cycliques dans notre bioréacteur. Ainsi, nous présenterons quelques une des futures applications qui peuvent être envisagées en perspective de cette thèse compte tenu de la disponibilité de ces informations locales.

Nous présenterons ensuite un dernier type de perspective, qui pourrait être imaginé suite à la

présente étude, et qui concerne la simulation des transports de masse au sein de cette matrice. Nous apporterons quelques éléments préliminaires concernant la possibilité d'utiliser les géométries issues des simulations mécaniques pour simuler la circulation du milieu fluide à l'intérieur de la matrice. Ce dernier aspect permettra d'accéder à des données supplémentaires concernant le micro-environnement auquel les cellules seront exposées.

Enfin, nous tenterons de dresser une conclusion générale de ce travail en situant la démarche qui a été adoptée et les perspectives qu'elle offre par rapport aux grandes directions vers lesquelles la recherche en ingénierie tissulaire semble s'orienter dans les années à venir.

2. Bilan concernant la solution proposée

2.1. Confrontation de la solution proposée à l'état de l'art

Dans le premier chapitre de ce mémoire, nous avons dressé une liste des matériaux et des structures qui ont été proposées dans la littérature, en vue de constituer une matrice de support pour l'ingénierie tissulaire du LCA. Ces différentes propositions, ainsi que leur principales limitations, sont résumées dans le Tableau V 1.

Compte tenu du rappel de cet état de l'art, nous allons présenter ci-dessous les avantages de la matrice qui a été proposée dans la présente étude.

2.1.1 Ajustabilité

Afin de situer notre solution par rapport aux différentes solutions proposées (Tableau V 1), il nous semble intéressant de souligner tout d'abord que le travail présenté ici constitue une première phase d'une stratégie d'*Ingénierie Tissulaire Assistée par Ordinateur (ITAO)* visant les tissus ligamenteux. Cette stratégie nous a permis ici de quantifier l'effet de différents paramètres géométriques de la matrice sur certaines de ses propriétés effectives, sans avoir recours à une démarche expérimentale, ce qui permet de formuler différentes configurations de matrice suivant les critères énoncés dans le cahier des charges.

V. Bilan et perspectives

| Référence | Matériau | Structure | Principales limitations |
|---|------------------------------------|--|--|
| [Altman2002] | Fibres de soie | Ensemble de torons torsadés | <ul style="list-style-type: none"> • Non poreux |
| [Laurencin2005] [Cooper2005] [Lu2005] | Fibres de PLGA | Tresse 3D carrée | <ul style="list-style-type: none"> • Faible diamètre de pores moyen, accessibilité des pores de l'extérieur • Faible plage de déformation élastique • Vitesse de dégradation élevée |
| [Freeman2007] | Fibres de PLLA | Assemblages de tresses et de torons | <ul style="list-style-type: none"> • Non poreux |
| [Liu2008] [Fan2008] | Fibres de soie et mousse de soie | Hybride tricot 2D + mousse de soie enroulé sur lui-même | <ul style="list-style-type: none"> • Faible diamètre de pores moyen, accessibilité des pores • Faible rigidité |
| [Chen2008a] | Fibres de soies et collagène | Tricot 2D dans un gel de collagène | <ul style="list-style-type: none"> • Faibles propriétés mécaniques • 2D |
| [Kimura2008] | PLLA et collagène | Tresse 3D carrée immergée dans un gel de collagène et recouverte d'une membrane de collagène | <ul style="list-style-type: none"> • Faibles propriétés mécaniques |
| [Fan2009] | Fibres de soie et mousse de soie | Hybride tricot 2D + mousse de soie enroulé autour d'une tresse 6 à brins | <ul style="list-style-type: none"> • Faible diamètre de pores moyen, accessibilité des pores • Faible rigidité |
| [Vaquette2010] | PLGA ou soie + microfibres de PLCL | Tricot 2D recouvert de microfibres déposées par électrospinning | <ul style="list-style-type: none"> • 2D • Faible diamètre de pores |
| Présente étude | PLCL | Tresse cylindrique multicouche | <ul style="list-style-type: none"> • Performances biologiques <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> à évaluer |

Tableau V 1: Matrices proposées dans la littérature pour l'ingénierie tissulaire du LCA et limitations associées.

En particulier, la matrice proposée offre de larges perspectives en ce qui concerne son application à d'autres types de tissus ligamenteux ou tendineux. Ce caractère ajustable lui permet également de s'adapter à différents types de protocoles chirurgicaux : il sera en effet possible de présenter des configurations de matrices adaptées en particulier à des reconstructions à simple ou à double faisceau, à condition évidemment de pouvoir en formuler un cahier des charges précis. Il serait également envisageable de choisir la configuration de matrice optimale pour un patient en raison de ses caractéristiques physiologiques propres, de son âge, de son sexe et de ses activités par exemple. Par la suite, cette ajustabilité pourrait être largement accrue si l'on dépasse les hypothèses qui ont été formulées précédemment (II.4.) concernant la composition et la structure de la matrice proposée : nous pourrions en effet envisager que des fibres de différents diamètres, de différentes

compositions et/ou de différents matériaux soient utilisées au sein de la matrice. Par exemple, il est possible d'envisager que les couches situées à l'intérieur de la matrice, qui sont plus sollicitées que les couches extérieures (section III.3.4.), soient constituées de davantage de fibres, ou de fibres de diamètre supérieur. Dans ce sens, de nombreuses améliorations de la matrice sont également envisageables : la matrice étant globalement tubulaire, il serait également possible d'imaginer insérer une seconde structure à l'intérieur de la matrice tressée, qui prendrait tout son sens notamment si elle favorisait la vascularisation de la matrice en raison d'un caractère « bioactif » et/ou de la présence de cellules endothéliales.

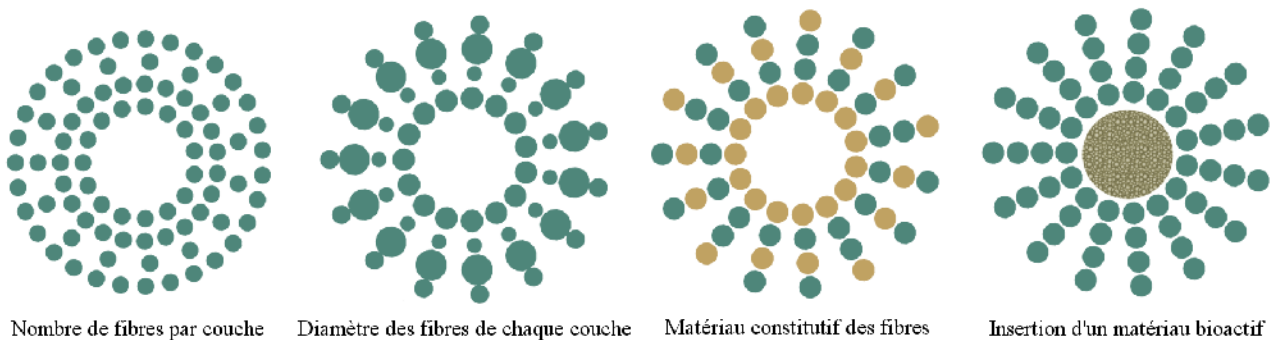


Illustration V 1: Exemples d'améliorations envisageables afin de renforcer le caractère ajustable de la matrice de support proposée.

2.1.2 Comportement mécanique

La matrice présentée dans ce travail utilise le PLCL comme matériau constitutif. Il en résulte qu'elle supporte des déformations plus élevées que des matrices constituées de fibres de PLLA ou de PLGA notamment. Bien que des études de dégradation n'aient pas été réalisées dans le cadre de ce travail de thèse, il est possible de s'attendre également à ce que l'utilisation du PLCL permette de pallier la dégradation trop élevée observée avec des fibres de PLGA. La matrice proposée offre une rigidité de l'ordre de 130 N/mm, ce qui est compatible avec la rigidité du LCA natif, si l'on en croit certaines études [Noyes1976][Jones1995], mais qui peut sembler faible si l'on s'en réfère à d'autres qui rapportent des rigidités supérieures à 200 N/mm [Chandrashekar2006]. Nous sommes confrontés ici à la difficulté de définir un cahier des charges précis dans une démarche d'ingénierie tissulaire *fonctionnelle*. La courbe de réponse de la matrice de support est clairement convexe, avec une *toe region* s'étendant sur environ 0,6% d'après le mode d'identification choisi. Cette plage est inférieure à la longueur de la *toe region* rapportée pour le LCA natif [Karmani2003]. Cependant, nous soulignerons qu'il est à nouveau difficile de connaître la plage qui serait réellement fonctionnelle. De plus, des essais mécaniques complémentaires pourront être envisagés dans le but de déterminer comment évolue cette région lors des sollicitations cycliques : il paraît vraisemblable

en effet que, si certaines des fibres de la matrice les plus sollicitées montrent un début de plastification lors de ces sollicitations, l'étendue de la *toe region* (ainsi que celle de la rigidité de la matrice) va être amenée à évoluer. Nous noterons au passage que, en raison de la plage assez restreinte de la *toe region*, il serait nécessaire dans le cas d'une utilisation clinique de la matrice que le praticien n'impose pas une tension trop importante à la matrice lors de son implantation au risque de supprimer cette région. La limite d'élasticité de la matrice de support proposée avoisine les 130 N : ceci est bien inférieur à la charge maximale supportée par un LCA natif [Noyes1976] [Jones1995][Chandrashekar2006]. Cependant, nous rappelons qu'il est difficile de déterminer le rôle *fonctionnel* de cette valeur, en particulier dans la gamme d'activités que le patient sera amené à exercer durant la période de réhabilitation. C'est la raison pour laquelle aucun critère n'avait été formulé dans le cahier des charges à ce sujet. Enfin, la matrice proposée semble compatible avec les déformations *in situ* de l'ordre de 4% qui ont été rapportées lors de la pratique d'exercices de réhabilitation classiques [Beynon1998a].

Dans cette discussion, il apparaît clairement un déficit d'études traitant des caractéristiques que doit remplir un substitut de LCA pour assumer son rôle fonctionnel. Néanmoins, d'après les critères que nous nous sommes proposés de satisfaire, l'utilisation de la matrice de support proposée ici pour se substituer au LCA semble permettre de recouvrer une fonction physiologique satisfaisante durant la période de réhabilitation, contrairement à de nombreuses matrices rapportées dans la littérature [Kimura2008][Liu2008][Fan2008][Fan2009][Fan2009]. L'hypothèse sur laquelle s'appuie notre démarche consiste à postuler que la formation de néo-tissu va permettre de compenser progressivement la perte de propriétés mécaniques due à la dégradation de la matrice. Cette hypothèse n'a pas été vérifiée dans le cadre de ce travail, mais de récents résultats d'implantation *in vivo* [Kimura2008][Fan2009] permettent de le penser, notamment en ce qui concerne l'évolution des propriétés mécaniques de matrices une fois implantées. Des caractérisations *in vitro* répétées utilisant le bioréacteur présenté en section IV.4.1. constituent naturellement la prochaine étape de notre stratégie de recherche : elles permettront en particulier de tester l'évolution du comportement mécanique de la matrice sous sollicitations cycliques multiaxiales prolongées dans un environnement biochimique contrôlé.

2.1.3 Morphologie

La matrice de support mise au point présente une structure tridimensionnelle offrant un réseau de pores entièrement interconnectés et une distribution des pores clairement hétérogène (contrairement à l'ensemble des matrices poreuses présentées dans le Tableau V 1) avec un gradient de taille de pores de son cœur à sa périphérie. Il paraît vraisemblable que cette caractéristique

permette en partie de pallier la faible colonisation de la matrice par les cellules provenant de l'extérieur observée dans le cas de matrices homogènes [Fan2009]. Cette caractéristique paraît également cruciale en ce qui concerne les transports des nutriments à l'intérieur de la matrice ; aspect qui devient souvent problématique dans le cas de structures homogènes, en raison de l'obstruction des pores extérieurs de la matrice [Sengers2007][Chung2010][Murphy2010]. La taille de pores moyenne de la matrice proposée est globalement supérieure à celle des matrices rapportées dans la littérature. Cette particularité doit également permettre de faciliter les transports de masse et la migration cellulaire à l'intérieur de la matrice [Murphy2010], et elle semble de ce point de vue également adaptée au cahier des charges initialement établi. Les pores situés au cœur de la matrice sont compatibles avec la plage de 200-250 μ m fréquemment citée pour la culture de fibroblastes.

2.2. Limitations actuelles et travaux futurs

Nous venons de constater que, de par son ajustabilité, ses propriétés mécaniques et sa morphologie, la matrice de support proposée paraît contourner de nombreuses limitations liées aux matrices qui ont été proposées dans la littérature pour l'ingénierie tissulaire du LCA. Cependant, de nombreux aspects n'ont pu être traités dans le temps consacré à ce travail de thèse, par conséquent plusieurs hypothèses ont dû être formulées. Nous allons tenter ci-après de dresser un bilan de ces limitations, puis de proposer des voies de développement futures susceptibles d'apporter des éléments de réponse.

2.2.1 Fixation de la matrice de support

Tout d'abord, nous nous sommes proposés de concevoir et de caractériser un biosubstitut de LCA en faisant l'hypothèse forte que, lors de son implantation, les méthodes chirurgicales actuelles permettraient d'assurer sa fixation dans les tunnels osseux tibial et fémoral. Cette hypothèse n'a pas été remise en cause dans ce travail. En d'autres termes, nous avons travaillé comme si les efforts admissibles par la fixation os-matrice étaient supérieurs aux efforts admissibles par la matrice elle-même. Or, cette hypothèse mériterait d'être vérifiée en effectuant des essais de traction sur des ensembles os-matrice-os, la matrice étant fixée dans les tunnels osseux par les moyens connus et détaillés en chapitre 1, expériences qui pourront être envisagées à la suite du présent travail. Néanmoins, nous noterons que les efforts issus de sollicitations physiologiques et estimés en section III. 4.3.2 paraissent nettement inférieurs aux efforts que peuvent supporter les moyens de fixations habituellement utilisés (supérieurs à 600 N selon [Dargel2007]).

Les cellulesensemencées dans la matrice au niveau de ces insertions osseuses devraient

idéalement se diriger à terme vers un phénotype ostéoblastique, contrairement aux cellules situées dans l'espace intra-articulaire. L'orientation des cellules vers ce phénotype sera encouragée par le fait que les stimuli mécaniques au niveau des insertions osseuses seront différents des stimuli mécaniques dans l'espace intra-articulaire. De plus, il est vraisemblable que les facteurs biochimiques provenant de l'extérieur de la matrice favoriseront davantage cette direction cellulaire au niveau des insertions osseuses. Cela dit, ces points méritent d'être vérifiés *in vitro* et/ou *in vivo* : cela passerait alors par une implantation ou une culture de la matrice et de ses insertions osseuses pendant une longue période sous sollicitations cycliques, suivies d'une analyse histologique au niveau des insertions osseuses et de l'espace intra-articulaire [Viateau2011]. Une récente étude de ce type, faisant intervenir de nombreux modèles animaux, a démontré qu'une telle formation osseuse à l'intérieur des tunnels osseux était possible [Kimura2008].

En vue de provoquer une activité cellulaire différente dans les tunnels osseux et dans l'espace intra-articulaire, certains auteurs ont proposés des matrices dont les caractéristiques diffèrent au niveau des insertions, en termes notamment de paramètres de tressage [Laurencin2005] [Cooper2005][Lu2005] ou d'ajout d'une membrane de collagène [Kimura2008]. De telles améliorations pourraient également être envisagées dans le futur pour ce qui concerne notre matrice de support.

2.2.2 *Caractérisation mécanique*

Lors de la définition du cahier des charges pour la conception de la matrice, il a été souligné qu'un ensemble de propriétés jugées comme prioritaires a été retenu parmi l'ensemble des propriétés qui peuvent influencer la réussite clinique de notre démarche. En effet, le cadre de l'*ingénierie tissulaire fonctionnelle* dans lequel s'inscrit ce travail implique que les propriétés qui ont un rôle *fonctionnel* avéré soient considérées en priorité. Dans ce cadre, l'évaluation biomécanique de notre matrice a été limitée à sa réponse sous traction uniaxiale dans un environnement sec. Cependant, même si cette réponse fournit des renseignements sur la capacité de la matrice à restreindre le déplacement relatif entre le tibia et le fémur, elle ne permet notamment pas de conclure quant à sa capacité à supporter des charges répétées dans un environnement physiologique. Dans un premier temps, des essais de fatigue devront être envisagés pour une évaluation mécanique plus aboutie de la matrice. Cette évaluation pourra se faire à l'aide du bioréacteur présenté dans le chapitre précédent, et qui permet d'imposer des sollicitations cycliques. De plus, ces essais conduits dans le bioréacteur se feront dans un milieu de culture à 37°C, dans des conditions proches de l'environnement réel du LCA. Or, l'effet de la température et de la présence d'un environnement fluide sur la réponse mécanique de la matrice n'a pas été pris en compte dans ce travail. Il est

possible que le comportement mécanique des fibres varie en présence du milieu de culture, et que la loi de comportement qui a été choisie pour le décrire s'en trouve altérée. L'effet de la stérilisation des fibres à l'alcool devra être pris en compte de la même façon.

Les rôles *fonctionnels* des propriétés viscoélastiques du LCA ont, en particulier, été considérés dans cette étude comme secondaires face au rôle fondamental de la rigidité du LCA. Les propriétés viscoélastiques de la matrice (fluage, relaxation, influence du taux de déformation) n'ont donc pas été caractérisées ; il serait néanmoins intéressant de les confronter aux propriétés viscoélastiques du ligament décrites dans la littérature [Pioletti1997][Pioletti1999][Pioletti2000][Provenzano2002a][DeVita2006][Pena2008][Kahn2008][Ciarletta2008]. En effet, les propriétés viscoélastiques de notre matrice, qui possède notamment des temps de relaxation relativement longs (Annexe 1 : Comportement mécanique des fibres de PLCL), pourraient poser problème notamment dans le cas de surcharges répétées. Nous rappellerons cependant que, durant la période de réhabilitation à laquelle nous nous intéressons, les activités du patient impliquent que ce genre de sollicitations soient limitées.

2.2.3 État de surface et caractère bioactif

Dans une précédente section (I.8.1.), nous avons énuméré les nombreux avantages qu'offrait l'ajout au sein de la matrice de différents facteurs comme la fibronectine [Laurencin2005][Cooper2005][Lu2005][Puk2005][Benhardt2009], le RGD [Hersel2003][Liu2008a][Freeman2009] ou le facteur de croissance TGF- β [Kimura2008]. Ces facteurs peuvent être déposés à la surface de la matrice, ou incorporés dans le matériau dans le but d'être délivrés progressivement au fur et à mesure de leur dégradation, ou en réponse à un chargement [Vunjak-Novakovic2004][Ma2004][Petrigliano2006][Fisher2007][Kimura2008]. De même, à l'échelle cellulaire, il est vraisemblable que l'état de surface de la matrice ait un rôle à jouer sur leur activité biologique. Cependant, ces aspects n'ont pas été abordés dans le cadre de cette étude, et s'inscrivent donc clairement comme une de ses perspectives les plus prometteuses. L'encapsulation de facteurs biochimiques dans les fibres de PLCL paraît peu compatible avec le procédé d'extrusion à chaud présenté précédemment (II.3.1.). En revanche, il paraît tout à fait envisageable d'enrober la matrice avec différents facteurs de manière à changer son état de surface, à diminuer son hydrophobicité et/ou à délivrer progressivement des substances biochimiques après implantation. Ce traitement pourrait en particulier varier entre les zones de la matrice insérées dans les tunnels osseux et les zones qui seront situées dans l'espace intra-articulaire. De plus, et comme nous l'avons évoqué plus haut, il serait également possible d'envisager de tresser les différentes couches autour d'un cœur composé d'un matériau bioactif, de manière à encourager la vascularisation du néo-tissu.

3. Outils numériques : bilan et applications

3.1. Bilan et limites des outils présentés

3.1.1 Particularités

Les outils numériques présentés dans le chapitre 3 constituent les premiers éléments d'une démarche novatrice d'ITAO appliquée à la reconstruction du LCA. Si ce type de démarche a été largement suivie dans le cas de l'os et du cartilage, la présente étude constitue sa première application au cas d'une matrice dédiée à ce type de tissu.

Les outils développés ici permettent, grâce notamment au caractère prédictible de la géométrie de la structure utilisée, de modéliser la distribution spatiale et la taille des pores à l'intérieur de la matrice [Laurent2011] ainsi que sa réponse à différents types de sollicitations comme de la traction-torsion combinées [Laurent2012]. Ce second aspect est obtenu à partir d'un code EF spécifique, qui présente le grand avantage de modéliser la matrice à l'échelle de la fibre en considérant les interactions de contact-frottement entre les fibres. Deux types d'informations peuvent être issues de ces outils : d'une part, ils permettent de prédire certaines propriétés effectives de la matrice en fonction de différents paramètres du procédé permettant sa fabrication ; de l'autre, ils délivrent des informations concernant l'environnement local à l'échelle des fibres. Ce premier point a été considéré en vue de proposer une structure adaptée au cahier des charges que nous nous sommes initialement fixé. Comme nous allons le voir ci-après, le second point s'inscrit comme une forte perspective du travail présenté ici, car il délivre une base d'informations importante pour la compréhension et l'interprétation des phénomènes biologiques qui seront observés, en particulier lors de la culture dynamique des cellulesensemencées dans la matrice par le biais du bioréacteur.

3.1.2 Hypothèses et limites

Une série d'hypothèses ont été formulées lors des modélisations présentées en chapitre 3 ; elles en constituent également les limites principales. Ces hypothèses vont être brièvement discutées ci-dessous.

- Lors de la caractérisation morphologique de la matrice, les pores ont été considérés comme des sphères, ce qui ne prend pas en compte la forme des pores. Or, cette forme peut avoir une influence sur l'activité cellulaire, car il a été notamment montré qu'une matrice fortement anisotrope pouvait provoquer l'infiltration tissulaire [Silva2006]. Bien qu'ayant

donné des résultats satisfaisants concernant la prédiction de la morphologie de la matrice, la considération d'une forme de pore plus complexe pourrait être envisagée.

- Des données de pas de tressage obtenues de manière empirique (Annexe 2) ont été utilisées pour décrire la géométrie des matrices, en raison de la complexité d'un traitement analytique du problème. Ce point pourrait être amélioré selon deux directions principalement. D'une part, un plan d'expériences plus vaste pourrait être envisagé afin de comprendre davantage les interactions qui existent entre le diamètre des fibres de la matrice, le paramètre h du tressage et le pas de tressage qui en résulte pour chaque couche de la matrice. Un paramètre lié au coefficient de frottement des fibres devrait être également pris en compte dans une telle étude. Nous soulignerons également qu'il n'a pas été jugé pertinent d'établir un tel plan d'expériences étant donné que le dispositif de tressage est un prototype, destiné uniquement à la fabrication de quelques échantillons, qui devra par la suite être remplacé par un matériel plus automatisé. Alternativement à cette méthode empirique, une approche de simulation différente pourrait être envisagée en imposant à un groupe de fibres la cinématique exacte du procédé de tressage pour le calcul de la configuration initiale [Pickett2009]. Cette approche n'a pas été jugée nécessaire dans un premier temps, mais pourrait être envisagée par la suite s'il s'avérait que l'utilisation d'une loi empirique n'était pas satisfaisante.
- Le code de calcul utilisé considère un équilibre mécanique à chaque pas de calcul, sans information sur l'historique du chargement ; en d'autres termes, il n'est pas compatible avec la modélisation de phénomènes viscoélastiques se traduisant notamment selon les conditions de chargement par du fluage ou de la relaxation de la matrice. Des développements considérables devront être apportés au code en question si la modélisation de tels phénomènes s'avérait nécessaire, développements qui ne sont pas envisagés pour l'instant. Nous noterons cependant qu'une dépendance vis-à-vis de la vitesse d'allongement pourrait être prise en compte en considérant que les paramètres descriptifs de la loi de comportement utilisée peuvent dépendre du taux de déformation. On pourrait introduire notamment une « contrainte additionnelle » traduisant l'effet du taux de déformation, ce qui a déjà été proposé dans le cas des propriétés viscoélastiques du ligament [Pioletti1999].
- La réponse non-linéaire des fibres de PLCL a été modélisée à l'aide d'une loi de comportement élastoplastique, en raison du point précédent, qui permet de retrouver la réponse en traction uniaxiale de différents types de matrices avec une précision satisfaisante. Cependant, lors de la simulation d'un chargement cyclique par exemple, les résultats de simulation peuvent montrer des déformations permanentes qui n'auraient pas lieu lors d'expérimentations, en raison de la recouvrance du matériau qui ne peut être modélisée avec le code de calcul utilisé actuellement.

- Le coefficient de frottement utilisé lors de ces simulations a été fixé de manière arbitraire en raison de la difficulté d'acquérir des données expérimentales et du maigre état de l'art à ce sujet [Sinoimeri2009].

3.1.3 Évaluation des résultats

La validation des résultats issus de la modélisation numérique en termes de caractérisations morphologique et mécanique a été réalisée par comparaison avec des données expérimentales. Ces comparaisons ont été limitées à un petit jeu de paramètres et à quelques critères de comparaison, et limitent par conséquent les conclusions finales qui peuvent être dressées quant à la précision des résultats numériques obtenus.

En particulier, les géométries virtuelles issues de l'analyse de la cinématique du procédé de tressage et du calcul mécanique de la configuration initiale ont été comparées aux géométries réelles des matrices uniquement en termes de diamètre extérieur et de répartition des fibres à l'intérieur des sections des matrices, et pour un seul jeu de paramètres du procédé. Le pas de tressage résultant d'une démarche empirique (Annexe 2) n'a pas été confronté au pas de tressage réel des matrices. Néanmoins, une démarche plus complète faisant intervenir une technique d'imagerie tridimensionnelle pourrait être envisagée par la suite. En effet, pour illustrer cette perspective, des échantillons de matrices ont été « imagées » à partir d'un tomographe à rayons X (Laboratoire Sols-Solides-Structures-Risques (3SR LAB), Grenoble), où un dispositif permettant d'imager des structures en cours de sollicitations mécaniques a été développé. Les structures fibreuses des matrices ont été reconstruites à partir du volume de niveaux de gris en utilisant un algorithme dédié aux matériaux fibreux [Latil2011].

Brièvement, nous pouvons préciser qu'un seuillage standard a été utilisé de manière à extraire la phase correspondant au matériau constitutif des fibres, puis les lignes moyennes des fibres ont été reconstituées à partir des centres de masse des sections de fibres, dans chaque plan orthogonal à l'axe des matrices. Les géométries ont ensuite été reconstruites à partir de ces lignes moyennes, en considérant un diamètre constant (Illustration V 2.a). Cet algorithme a été appliqué à partir du dispositif disponible au 3SR LAB pour différents efforts de traction-compression imposés en conservant le maintien des matrices, permettant ainsi d'obtenir la variation de la géométrie de matrice en cours de déformation (Illustration V 2.b). Les géométries issues de cet algorithme sont facilement compatibles avec les outils numériques qui ont été développés dans ce travail de thèse, comme nous pouvons l'observer pour ce qui concerne la caractérisation morphologique (Illustration V 2.c). Cette expérience préliminaire offre des perspectives évidentes de validation supplémentaire des outils numériques utilisés. En effet, il serait possible d'envisager dans un avenir proche de

comparer les géométries de matrices obtenues pour différents efforts appliqués à partir des simulations mécaniques et des données tomographiques. Cette démarche, appliquée à différents jeux de paramètres de la matrice, pourra constituer une validation solide des éléments de simulation développés dans le présent travail.

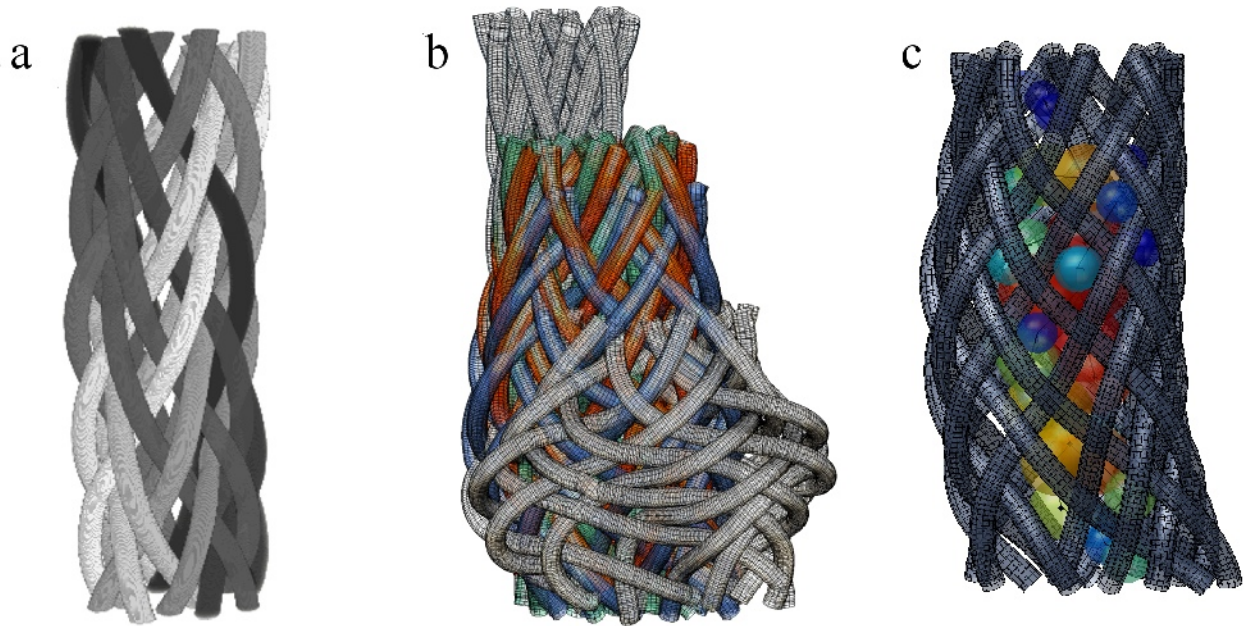


Illustration V 2: Géométries issues d'une acquisition en tomographie à rayons X. (a) Application de l'algorithme de reconstruction dédié aux matériaux fibreux à un échantillon de matrice. (b) Superposition de cinq acquisitions pour divers états de déformation en traction-compression (c) Application de l'algorithme de recherche des pores à une géométrie issue de la tomographie.

De plus, la validation des caractéristiques morphologiques et mécaniques de la matrice a été réalisée sur un petit nombre d'échantillons et de jeux de paramètres. Pour pouvoir dresser des conclusions supplémentaires sur la validité des résultats de ces simulations, il serait possible d'entreprendre un plan d'expériences plus vaste, faisant intervenir davantage d'échantillons et de paramètres : cette approche expérimentale n'a pas été jugée prioritaire dans le temps qui était consacré à la présente étude.

3.2. Perspective: caractérisation du micro-environnement

Des études récentes ont montré que l'activité biologique de cellulesensemencées sur une matrice de support dépendait de l'amplitude [Wang2005][Chiquet2009][Tetsunaga2009] et de la direction [Lee2005][Wang2005] des déformations du substrat. De plus, il est raisonnable de penser que l'environnement local des cellules est différent selon qu'elles adhèrent entièrement sur une seule

fibre ou sur plusieurs fibres à la fois, et suivant qu'elles se trouvent ou non dans une région où les fibres glissent les unes sur les autres lors de sollicitations mécaniques. Or, ces différentes caractéristiques de l'environnement cellulaire peuvent être évaluées directement à partir des résultats du code de calcul détaillé en chapitre 3. Dans cette section, nous allons donc brièvement énoncer quelques applications futures qui peuvent être envisagées en nous aidant des outils numériques développés dans ce travail.

3.2.1 Contacts et glissements entre fibres

Dans le chapitre précédent nous avons montré que, lors de la culture statique de cellules souches sur la matrice de support, il apparaissait des « ponts » cellulaires entre les fibres même pour une cinétique de culture courte. Il paraît vraisemblable que les déformations locales « ressenties » par les cellules qui produisent ces « ponts » seront différentes de celles ressenties par des cellules en adhésion sur une fibre unique lors de la culture dynamique en bioréacteur. Cet aspect est rarement traité dans les articles visant à caractériser les stimuli locaux qui résultent de sollicitations extérieures, ce qui correspond donc globalement à une sous-évaluation des déformations présentes à l'échelle cellulaire [Stops2008]. La proportion de ces cellules est dépendante du ratio de la taille des cellules et de la taille des pores de la matrice [Stops2010]: il a été montré, dans le cas d'une matrice osseuse, que 76% des cellules étaient attachées sur différentes surfaces de la matrice. En s'appuyant sur des algorithmes récents [Stops2010], il pourrait être intéressant de générer des éléments constitués de paires de nœuds (situés à une distance correspondant à la taille moyenne des cellules considérées), puis de calculer leur variation de longueur au cours de la déformation pour mieux cerner cet aspect local. Ainsi, cette approche pourrait générer rapidement une information supplémentaire concernant les stimuli mécaniques réellement ressentis à l'échelle cellulaire. On peut penser également que, si le déplacement relatif entre fibres devenait trop important sous sollicitations, les cellules ne parviendraient pas à réaliser ces « ponts » entre fibres. Il serait intéressant d'observer alors la viabilité et l'activité cellulaires des cellules situées, à l'issue de l'ensemencement, dans des régions de la matrice où les fibres seront amenées à glisser les unes sur les autres, aspect qui n'a pas été traité dans l'état de l'art actuel.

Or, ces régions peuvent être précisément discriminées à partir des résultats des simulations, en considérant notamment l'évolution de l'emplacement des points matériels qui composent les éléments de contacts générés lors des simulations. À titre d'illustration, nous avons représenté dans une matrice comportant deux couches l'ensemble des polygones du maillage surfacique auxquels les extrémités des éléments de contact appartiennent dans la configuration initiale (Illustration V 3). Il pourrait donc être envisageable par la suite d'étudier ces régions de la matrice où les fibres sont en

glissement lors de sollicitations cycliques, et d'y examiner le comportement biologique des cellules dans ces régions précises.

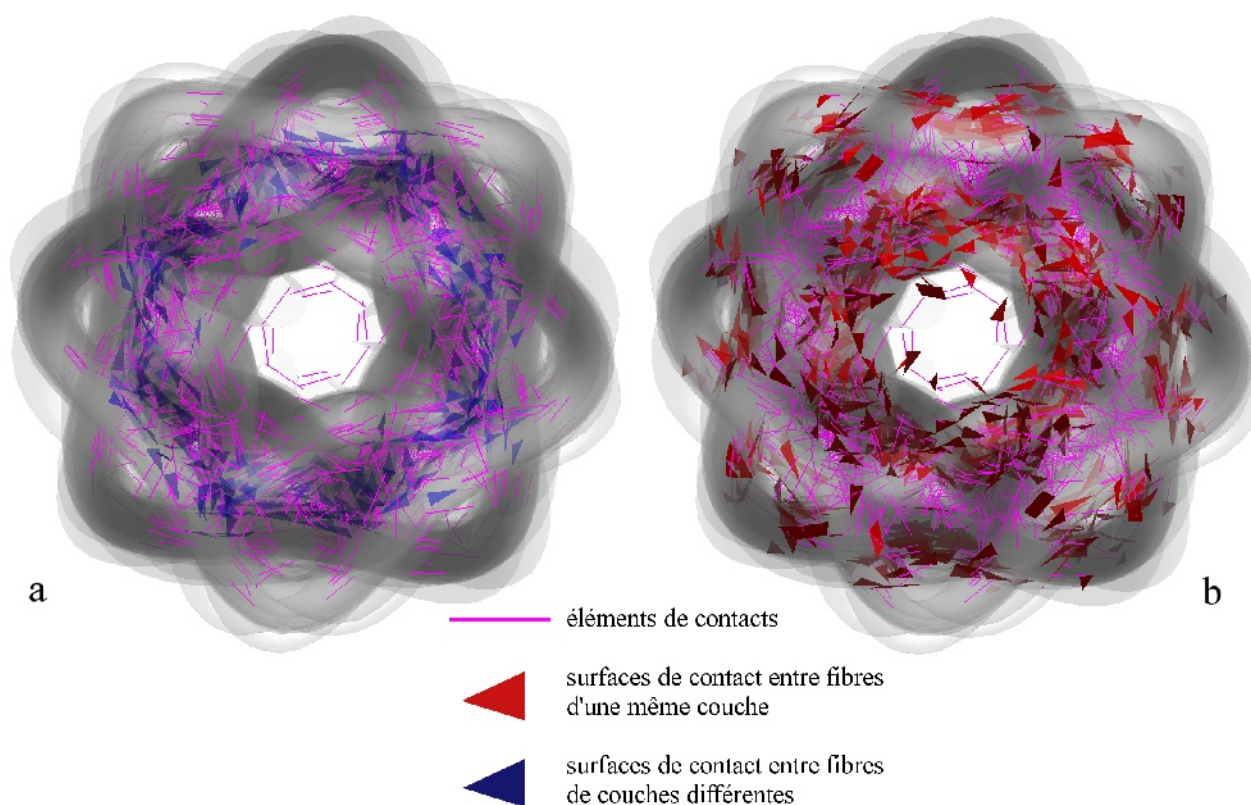


Illustration V 3: Traitement des contacts entre fibres. Il est possible à partir des résultats des simulations de discriminer les polygones du maillage auxquels les extrémités des éléments de contact appartiennent, pour les contacts entre (a) les fibres de couches différentes ou (b) les fibres d'une même couche.

3.2.2 Direction des déformations locales

On peut observer, à partir des acquisitions en microscopie confocale présentées au chapitre précédent, que les cellules ont tendance à choisir une direction privilégiée par rapport à la direction des fibres. Ce phénomène est bien connu des spécialistes de la mécanotransduction. Des éléments de modélisation nouveaux visant à prédire la direction cellulaire en fonction de la courbure du substrat ont été apportés par [Sanz-Herrera2009a] ; ils permettent de proposer une interprétation de ce phénomène d'orientation. Par ailleurs, lors de sollicitations cycliques, il a également été montré que la direction des déformations à l'échelle cellulaire avait une nette influence sur la direction dans laquelle les cellules s'orientaient [Lee2005][Wang2005]. Il serait donc intéressant d'observer si les cellules ont tendance à s'orienter de façon privilégiée en fonction de la courbure ou de l'état de

déformation de leur substrat lorsque des sollicitations cycliques seront imposées à la matrice.

Les résultats des simulations présentées précédemment permettent d'obtenir en cours de déformation la géométrie des matrices ainsi que le tenseur des déformations de Green-Lagrange en chaque point d'un maillage surfacique des fibres. À partir de la connaissance précise de ces tenseurs, il est possible d'exprimer les directions principales de déformation ainsi que les valeurs propres correspondantes. Il serait donc intéressant, en perspective du présent travail, de tenter de comparer l'orientation du repère principal des déformations avec la direction moyenne des cellules. Nous noterons également que, afin de pouvoir observer en temps réel les cellules et la matrice de support en cours de sollicitations, une micro-machine de traction compatible avec le matériel d'imagerie confocale disponible à la plateforme PTIBC-IBISA est en cours d'utilisation.

3.2.3 Amplitude des déformations locales

Comme nous l'avons décrit précédemment, le code de calcul utilisé permet d'obtenir en tout point du maillage surfacique une valeur de la déformation octaédrique, qui est considérée comme représentative de la distorsion à laquelle la cellule est soumise [Lacroix2006]. La connaissance de ces champs de déformations locaux peut donner lieu à deux grands types d'applications directes :

- Ces informations pourraient constituer un outil prometteur en ce qui concerne l'interprétation des résultats des cultures dynamiques en bioréacteur. En effet, il serait possible de lier l'activité biologique d'une région particulière de la matrice aux stimuli locaux correspondant à cette région. Cela semble ouvrir des perspectives intéressantes au sujet de la compréhension des mécanismes biologiques qui régissent l'activité cellulaire.
- À partir de données de la littérature concernant l'effet de différents environnements mécaniques sur la prolifération [Webb2006], la sécrétion de la matrice extracellulaire [Altman2002a][Chiquet2003] ou la différenciation des cellules souches [Altman2002a], il serait possible d'en déduire les sollicitations extérieures à imposer à l'échelle de la matrice pour obtenir localement les stimuli souhaitables pour la formation d'un tissu ligamenteux, et ainsi espérer optimiser les conditions de culture en bioréacteur.

Comme nous l'avons évoqué précédemment, l'une des missions du bioréacteur est d'imposer aux matrices de support des sollicitations semblables aux sollicitations physiologiques qui résultent d'exercices de réhabilitation classiques, tout en rendant compte de l'évolution du comportement mécanique de la matrice. Or, grâce à nos outils, nous pourrions établir une correspondance entre ces sollicitations macroscopiques imposées et les stimuli mécaniques à l'échelle cellulaire.

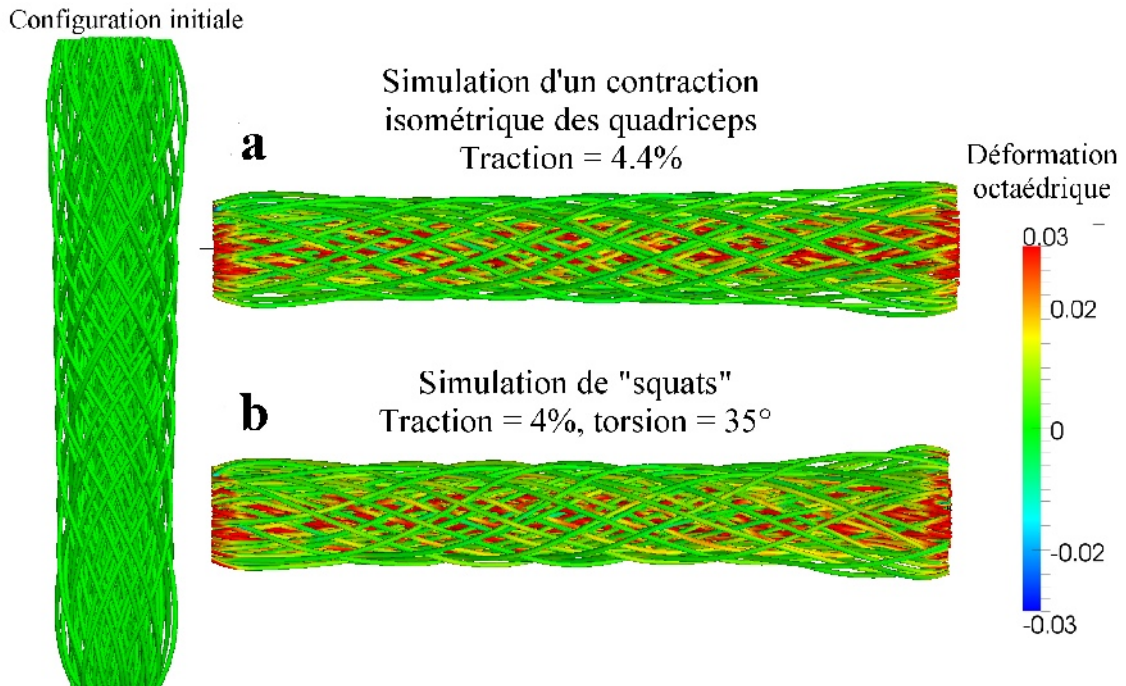


Illustration V 4: Simulation de deux exercices de réhabilitation classiques impliquant des sollicitations importantes à l'échelle du LCA (section I.3.3.).

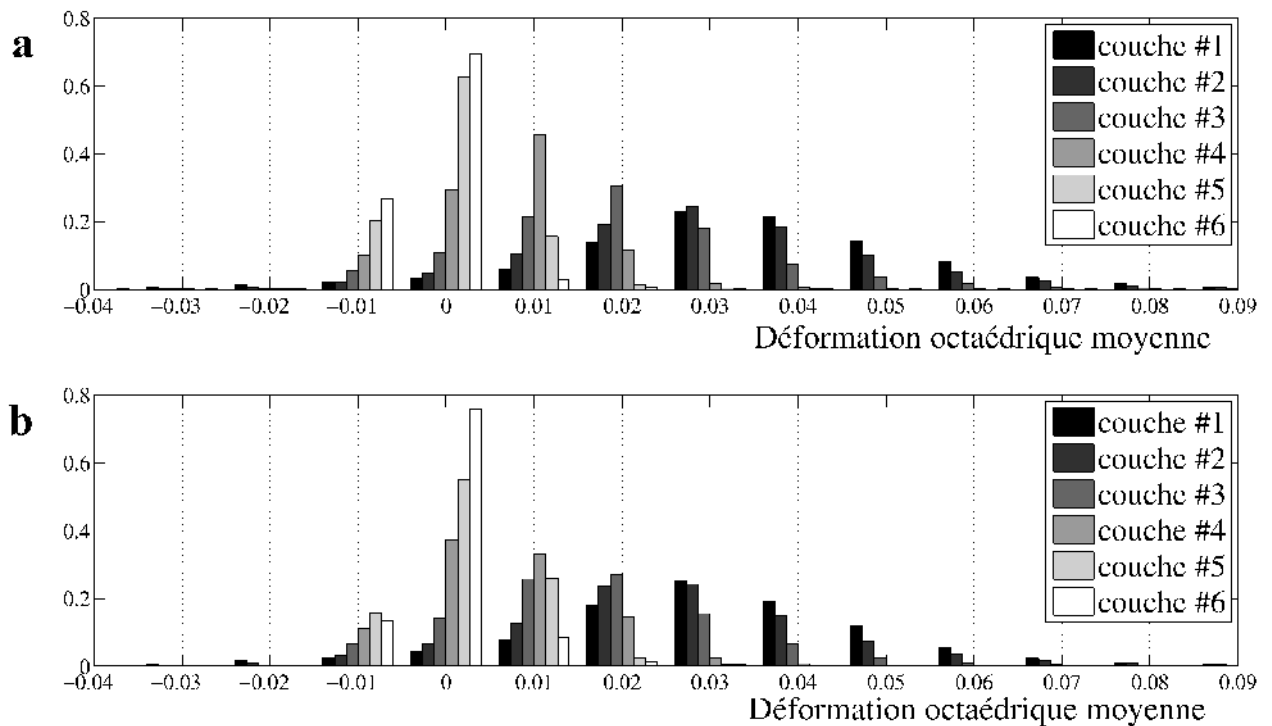


Illustration V 5: Distribution des déformations octaédriques lors des exercices 1 (a) et 2 (b) dans chaque couche de la matrice. Les couches sont numérotées du centre à la périphérie de la matrice.

À titre d'exemple, les déformations octaédriques dues aux deux exercices simulés en section III.4.3. (squats avec cordes élastiques et contraction isométrique des quadriceps) ont été représentées ci-dessus (Illustration V 5). Il est ensuite possible d'exploiter les résultats de ces simulations en considérant la distribution des déformations octaédriques pour chacun de ces exercices dans les différentes couches de la matrice (Illustration V 5).

Sur cet exemple, nous pouvons observer que les déformations ne sont pas homogènes dans les différentes couches de la matrice, ce qui pourrait induire des stimuli -et par voie de conséquence des réponses cellulaires- différentes en fonction des régions où adhèrent les cellules. En effet, les couches les plus au centre de la matrice sont soumises à des déformations moyennes plus importantes que les couches périphériques. Cela est évidemment dû au fait que les couches périphériques participent progressivement à supporter la charge imposée à la matrice, comme nous l'avons observé précédemment (section III.3.4.). Nous remarquerons également, d'après ces résultats, qu'une faible torsion comme celle qui est imposée lors de la simulation de « squats », ne semble pas modifier la distribution des déformations dans la matrice. Il est possible de penser qu'à ce titre, la torsion imposée *via* le bioréacteur n'aura pas d'effet sur l'activité cellulaire pour de faibles rotations, sauf si la circulation du milieu de culture au sein de la matrice s'en trouve modifiée.

Nous pouvons observer que ces valeurs semblent inférieures aux stimuli nécessaires à la formation d'un tissu conjonctif, si l'on en croit le modèle de mécanorégulation présenté précédemment (Illustration I 15). Néanmoins, nous venons de souligner que ces déformations de surface étaient inférieures aux déformations « ressenties » par les cellules formant des « ponts » entre plusieurs fibres. De plus, nous rappellerons que nous avons négligé ici la composante des stimuli issue de la circulation du milieu fluide dans la matrice : ce dernier point va précisément faire l'objet de la section suivante.

3.3. Perspective : modélisation des transports de masse

3.3.1 Intérêt et état de l'art

Nous avons vu précédemment que l'activité cellulaire était dépendante de son environnement mécanique, caractérisé dans de nombreux modèles mécanobiologiques par une combinaison de la déformation du substrat sur lesquelles les cellules adhèrent et des contraintes de cisaillement dues au flux [Prendergast1997]. Dans la présente étude, les stimuli mécaniques générés par la circulation de milieu de culture ont été négligés, en considérant que les sollicitations macroscopiques auront lieu à des vitesses suffisamment lentes pour que les contraintes de cisaillement dues à la circulation

du milieu de culture soient négligeables face aux stimuli mécaniques transmis directement par la matrice. Néanmoins ces contraintes de cisaillement dues à la contraction radiale de la structure lors de son allongement sont présentes, et peuvent avoir un effet non négligeable sur les cellules, en particulier si les vitesses de sollicitation deviennent importantes. En outre, ces stimuli pourraient être utilisés en complément des stimuli dus aux sollicitations macroscopiques de structure, afin d'orienter la formation de tissu. Or, l'estimation de ces contraintes de cisaillement locales dans des matrices à l'architecture fort complexe est une tâche difficile, si ce n'est impossible [Maes2009][Chan2010][Lesman2010].

À ce sujet, des approches de mécanique des fluides numérique (plus communément appelées CFD pour *Computer Fluid Dynamics*) ont été utilisées pour étudier les flux dans des matrices tridimensionnelles, à partir d'une description de leur géométrie et de conditions aux limites sur l'environnement fluide [Porter2005][Hutmacher2008][Sandino2008][Milan2009][Jones2009][Stops2010a][Voronov2010][Cinbiz2010][Melchels2011][Sandino2011]. Tandis que des approches analytiques se limitent à fournir des valeurs moyennes de ces contraintes de cisaillement, et sont loin de refléter la réelle distribution de ces contraintes dans la matrice [Boschetti2006], la modélisation des flux locaux à l'aide des méthodes de CFD permet de recueillir des informations locales précises [Maes2009]. Ces approches ont été utilisées pour évaluer l'effet de différents paramètres de la matrice ou de différentes conditions de culture sur la distribution et/ou l'amplitude des contraintes de cisaillement dues au flux [Boschetti2006][Jones2009][Melchels2011]. Ces informations locales permettent alors d'apporter des éléments supplémentaires pour l'interprétation des résultats de la culture dynamique des matrices et pour l'optimisation des conditions de culture macroscopiques idéales conduisant localement à un environnement fluide souhaité [Hutmacher2008]. De plus, ces approches numériques permettent d'accéder aux concentrations locales de divers facteurs biochimiques, en simulant la diffusion et/ou l'advection de différents traceurs au sein d'une géométrie. Ces informations locales offrent des perspectives intéressantes en ce qui concerne l'interprétation d'observations biologiques ou l'optimisation des conditions de culture.

Les géométries issues des outils numériques présentés dans ce mémoire sont adaptées à leur implantation dans des codes de CFD classiques. Nous allons présenter ci-après, dans un but essentiellement illustratif, des travaux préliminaires que nous avons menés afin d'importer ces géométries et, à terme, de modéliser la circulation du fluide dans des matrices sollicitées dynamiquement.

3.3.2 Code utilisé : particularités et fonctionnement

Le code CFD utilisé dans le cadre de cette étude préliminaire est un code en libre accès appelé *Gerris* et initialement développé pour résoudre les équations aux dérivées partielles qui régissent le mouvement d'un fluide (Euler, Stokes, Navier-Stokes) au sein de géométries complexes [Popinet2003]. Le code source à la base de ce solveur est entièrement accessible et modifiable, et existe pour des applications bidimensionnelles et tridimensionnelles. Concernant son application à la problématique posée, *Gerris* possède les particularités de mailler automatiquement des géométries complexes, et propose un raffinement adaptatif du maillage du milieu fluide en fonction de différentes caractéristiques du flux. Un nombre illimité de traceurs peuvent être également intégrés au calcul de manière à simuler la diffusion et/ou l'advection de différents facteurs dans le milieu fluide. Enfin, une interface permettant la visualisation des résultats des calculs est disponible dans la suite logicielle proposée.

La description de l'ensemble des paramètres de simulation est effectuée dans un script unique qui contient notamment :

- la définition du maillage (éventuellement adaptatif) du domaine fluide ;
- les propriétés rhéologiques du fluide ;
- les conditions aux limites sur la valeur et/ou les dérivées de chaque grandeur physique définie ;
- la définition de la géométrie solide maillée au préalable ;
- la nature et la gestion des paramètres de sortie ;
- la définition des traceurs et de leurs propriétés.

3.3.3 Préparation de la géométrie de la matrice

Un algorithme a été d'abord réalisé afin de préparer les géométries issues des outils numériques présentés précédemment à leur implantation dans le code. Dans le cadre de ces outils numériques, les géométries sont définies à travers un objet *Matlab* comprenant (1) une matrice *Nœuds* contenant les coordonnées des nœuds de la géométrie (2) une matrice *Polygones* contenant les numéros des lignes de la matrice *Nœuds* où se situent les n points qui constituent les polygones. Pour une implantation dans le code *Gerris*, cette description de la géométrie a dû être écrite à travers un format *.gts* qui comprend (1) les coordonnées des nœuds de la géométrie (2) les numéros des doublons de nœuds qui définissent les arrêtes de chaque polygone (3) les arrêtes qui définissent chaque polygone. Une attention particulière a été apportée à la définition des normales à chaque

polygone, qui dépend de l'ordre dans lequel sont écrits les éléments (nœuds ou segments) descriptifs de chaque polygone.

De plus, une simulation tridimensionnelle des écoulements à travers une matrice comprenant plusieurs dizaines de fibres implique nécessairement un coût numérique important. Dans un premier temps, seule une portion des géométries des matrices a été remaillée et traduite en fichier *.gts* de manière à limiter la taille du domaine solide. Les grandeurs utilisées dans le code Gerris étant adimensionnalisées, la géométrie a également été transformée pour être comprise dans un cube de côté 1 ; le facteur d'échelle utilisé a été stocké pour pouvoir interpréter quantitativement les résultats de simulation.

Les outils de post-traitement disponibles avec ce code de calcul ne permettent pas de déterminer directement les contraintes de cisaillement en surface du milieu solide. En revanche, il est possible d'extraire en une liste de points les variables traitées par le code de calcul, c'est-à-dire les trois composantes de la vitesse du fluide, la pression du fluide, et la liste de traceurs qui ont été considérés. Par conséquent, il est possible de calculer la contrainte de cisaillement due au fluide à partir du gradient du champ de vitesse ; la vitesse du fluide a donc été prélevée en chaque nœud du maillage de la géométrie initiale afin de calculer cette contrainte.

Enfin, les objets numériques issus de la description purement géométrique de la tresse (III.2.1.) ou du calcul de la configuration initiale par la méthode des éléments finis (III.3.3.) peuvent présenter de faibles interpénétrations, qui ne sont pas tolérées par le code CFD utilisé. Ces zones d'interpénétrations ont été supprimées par le biais d'un algorithme visant à diminuer localement le rayon des fibres aux endroits où ces interpénétrations sont détectées.

3.3.4 Résultats préliminaires et perspectives

Pour illustrer les résultats qui peuvent être issus de ce type de simulation, une portion de matrice de 6 couches a été importée dans le code de calcul, et un flux dans la direction transverse de la matrice a été simulé. Le profil des vitesses du fluide ainsi que les contraintes de cisaillement à la surface de la matrice calculés à partir des résultats des simulations sont représentés Illustration V 6.

Il est également possible de simuler l'advection d'un traceur à travers la matrice (Illustration V 7), traceur qui peut correspondre à un des composants du milieu de culture en particulier. Ces simulations offrent des perspectives intéressantes en ce qui concerne la caractérisation de l'environnement biochimique local au sein de la matrice.

Dans les résultats de simulation présentés ci-dessus (Illustration V 6 et Illustration V 7), la géométrie de la matrice est statique, et les conditions aux limites sur la circulation fluide ont été

déterminées de manière arbitraire ; les informations locales correspondantes ne représentent donc pas la circulation du milieu fluide au sein de la matrice lors d'une sollicitation cyclique. Or, il est possible d'envisager avec *Gerris* de simuler la déformation du milieu solide (simplifiée par un simple « facteur d'échelle ») au sein du milieu fluide : nous pourrions donc envisager d'imposer une déformation longitudinale ainsi qu'une déformation transverse déterminée à partir du calcul du coefficient de Poisson apparent (section III.3.3.).

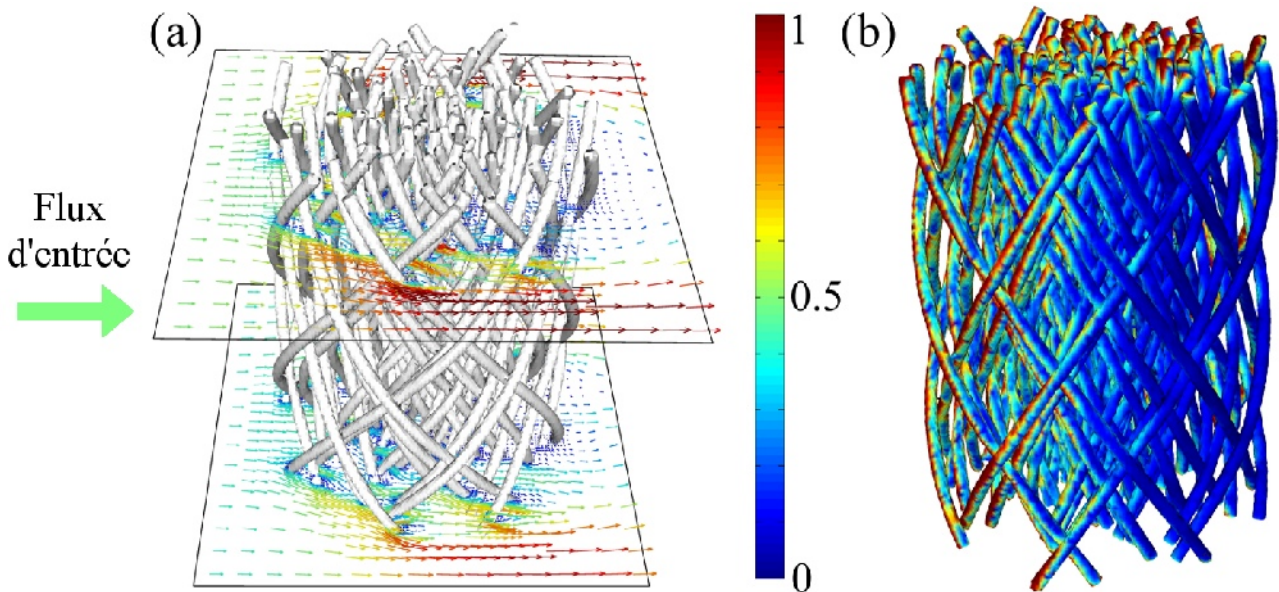


Illustration V 6: Modélisation d'une circulation de milieu de culture dans une matrice de 6 couches (statique), pour une circulation initiale dans le plan transverse de la matrice. (a) Vitesse du fluide dans la matrice (normalisée) pour une vitesse d'entrée de 0,5 (b) Contraintes de cisaillement (normalisées) induites localement par la circulation du milieu fluide.

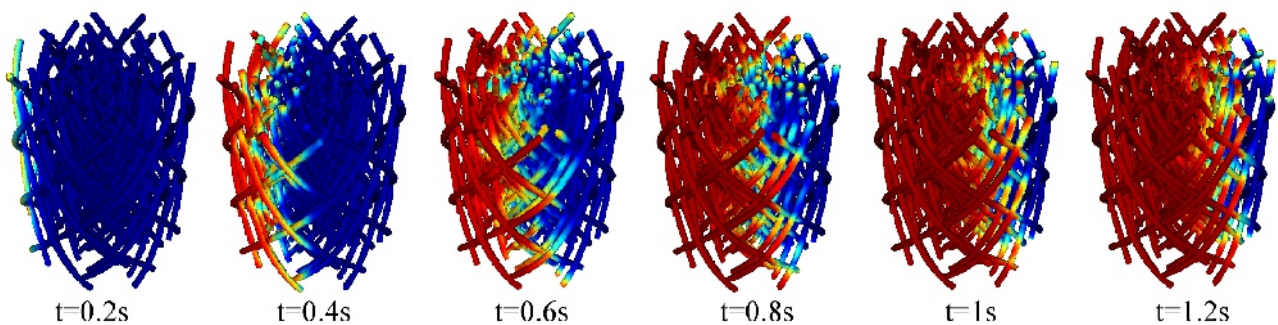


Illustration V 7: Simulation de l'advection d'un traceur à travers une matrice de 6 couches.

Cette perspective permettrait d'obtenir des informations concernant les flux réellement présents à l'intérieur de la matrice lors de culture dynamique. Néanmoins, ceci exige que de grosses

capacités de calcul soient mobilisées, et un travail de parallélisation mené sur des machines puissantes devrait donc être envisagé dans ce cas.

Enfin, pour déterminer les réelles conditions aux limites sur la circulation fluide, il serait possible de partir de résultats de simulations visant à déterminer la réelle circulation de milieu de culture à l'intérieur des chambres du bioréacteur lors des sollicitations cycliques, comme cela est illustré ci-dessous (Illustration V 8). Éventuellement, ces chambres pourraient être amenées à évoluer de manière à optimiser la circulation du milieu de culture en périphérie de la matrice.

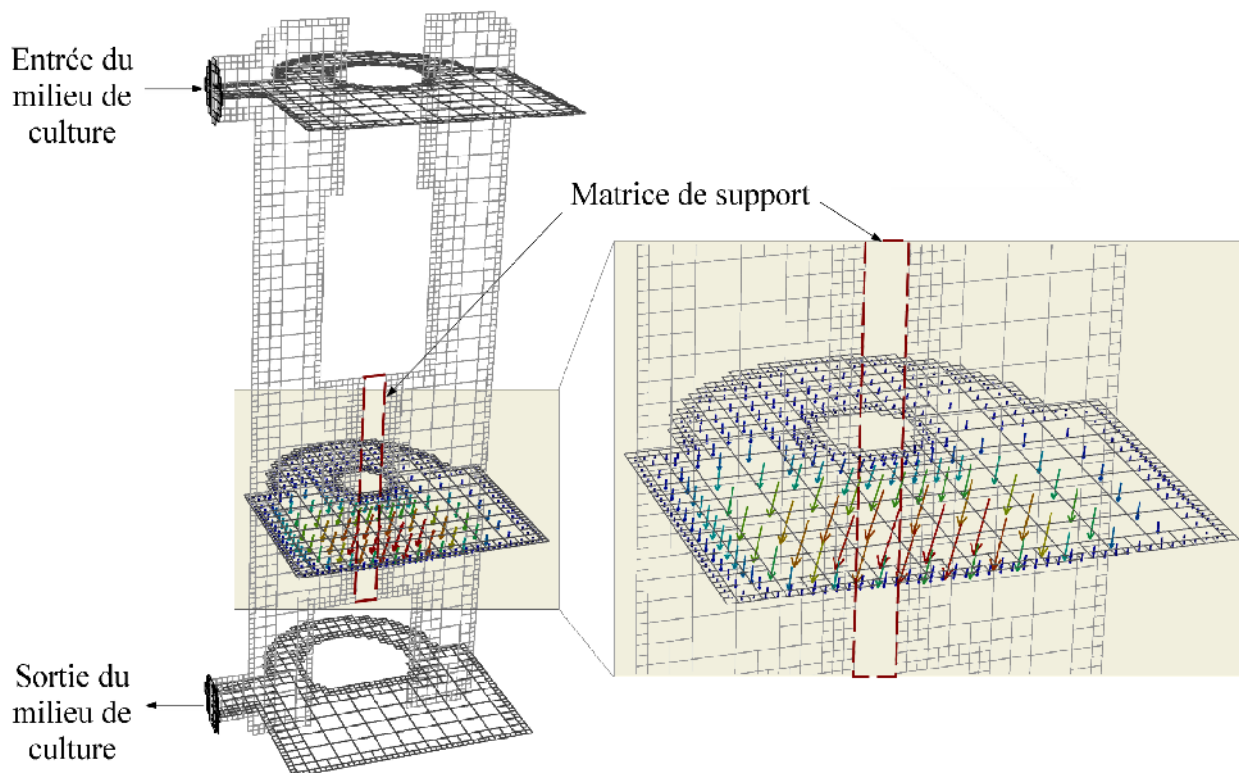


Illustration V 8: Base d'une modélisation de la circulation de milieu de culture à l'intérieur d'une chambre du bioréacteur conduisant à la détermination des conditions aux limites à appliquer au fluide au voisinage de la matrice de support.

En résumé, la simulation de la circulation du milieu de culture au sein de la matrice offre de larges perspectives. Même si ces quelques résultats préliminaires sont encourageants, il nous semble que ce futur travail pourrait constituer un défi technique exigeant néanmoins des capacités de calcul conséquentes.

V. Bilan et perspectives

4. Conclusion générale

Depuis l'essor de la problématique de l'ingénierie tissulaire dans les années 1990, la majorité des travaux effectués par les équipes de recherche a consisté à concevoir des dispositifs permettant de fabriquer des matrices, de les évaluer, de concevoir des bioréacteurs spécifiques à chaque application, et de mettre en place des protocoles biologiques qui permettent de multiplier et d'ensemencer les cellules au sein de matrices de support, ainsi que d'encourager et de diriger la formation de néo-tissu. De grandes avancées ont été soulignées dans le domaine de l'ingénierie tissulaire de l'os ou du cartilage en particulier, concentrant une bonne partie des efforts de recherche compte tenu des fortes problématiques cliniques associées. En revanche, aucun consensus n'a été réellement établi en ingénierie tissulaire du ligament, notamment en ce qui concerne la liste des critères à satisfaire pour amener une solution cliniquement pertinente, exploitant des matrices et bioréacteurs spécialement adaptés.

La présente étude a permis de contribuer à ce défi scientifique, en particulier en présentant pour la première fois une approche d'ingénierie tissulaire assistée par ordinateur au cas du ligament. Une matrice de support novatrice et ajustable a été présentée, et semble en accord avec une application pour la réparation du LCA selon les critères qui ont été retenus dans cette étude. De plus, les dispositifs novateurs nécessaires à sa fabrication et à sa culture dynamique ont également été développés. Ces premiers résultats conduisent à penser que des biosubstituts adaptés au LCA pourront prochainement émaner de cette démarche, à supposer que des caractérisations *in vitro* et *in vivo* puissent venir valider ces premières étapes encourageantes. De plus, grâce à la large ajustabilité de la matrice qui a été proposée, il est possible de penser qu'elle est susceptible de trouver des applications pour d'autres types de tissus conjonctifs. Nous soulignerons également tout particulièrement que la présente étude a été l'occasion de faire naître une dynamique impliquant plusieurs entités de recherche aux échelles locales et nationales, dynamique qui présage l'essor de nouvelles problématiques pluridisciplinaires pour les prochaines années.

Lors d'un *workshop* tenu en 2006 et rassemblant la plupart des précurseurs de l'ingénierie tissulaire telle qu'on la connaît aujourd'hui [Ingber2006a], une liste des futurs domaines d'investigation en ingénierie tissulaire fonctionnelle a été suggérée et offre une synthèse intéressante des différentes avancées attendues dans la décennie à venir. Cette liste comprend les douze aspects suivants :

1. Déterminer les sollicitations *in vivo* imposées aux tissus natifs durant les activités de la vie

- quotidienne ;
2. Déterminer les coefficients de sécurité et les propriétés de rupture des tissus natifs pour une large gamme de ces activités ;
 3. Déterminer les relations entre les fonctions microscopiques et macroscopiques des tissus natifs ;
 4. Déterminer les signaux de mécanotransduction qui gouvernent la capacité des tissus à se réguler et à maintenir leurs propriétés (*homéostasie*) ;
 5. Développer des modèles numériques précis qui intègrent une description précise de l'anatomie des tissus à différents niveaux hiérarchiques et les phénomènes multi-physiques liés à leur fonctionnement ;
 6. Développer des moyens de protection *in vivo* des matrices issues de la démarche d'ingénierie tissulaire ;
 7. Déterminer les plages de déformation *in vitro* et *in vivo* au sein de cette matrice ;
 8. Développer des moyens d'encourager et d'améliorer l'intégration du biosubstitut au sein du site hôte ;
 9. Identifier les substances bioactives solubles qui peuvent stimuler l'activité biologique ;
 10. Déterminer leurs interactions avec les différents facteurs biomécaniques et biophysiques ;
 11. Développer des standards cliniques permettant de déterminer si une solution est sans danger et efficace ;
 12. Établir, pour le patient, des programmes de réhabilitation adaptés.

Cette liste, appliquée au cas de la réparation du LCA, constitue une base pertinente pour situer le cadre dans lequel s'est inscrite la présente étude, et les directions qui pourraient être empruntées dans les prochaines années, afin de se diriger vers une solution cliniquement pertinente. Une étude bibliographique approfondie a permis de répondre au moins partiellement aux trois premiers points de cette liste. Néanmoins, des données plus abondantes concernant les sollicitations physiologiques imposées au LCA, et en particulier aux deux faisceaux qui le composent, permettraient de dresser un cahier des charges plus précis concernant les critères prioritaires à respecter en vue de proposer une solution pertinente. La connaissance des mécanismes de mécanotransduction constitue le quatrième point de cette liste, et une étude bibliographique a permis de synthétiser les aspects qui s'avèraient prioritaires dans notre cas. Cependant, ces mécanismes sont loin d'être maîtrisés et des

efforts devront encore être faits dans cette direction. Nous noterons que la présente étude, à travers les informations sur le micro-environnement cellulaire qu'elle permet d'obtenir, s'inscrit clairement dans cette direction. Notre travail s'oriente également dans le sens du cinquième point de la liste, qui concerne la mise en place de nouveaux outils numériques multi-échelles, ainsi que du septième point, qui vise à déterminer les stimuli mécaniques *in vitro* et *in vivo* dans la matrice de support. Les autres points, qui concernent les moyens biochimiques et cliniques qui permettront d'encourager et d'évaluer la formation d'un néo-tissu, définissent assez clairement les futures directions à emprunter afin de faire passer l'ingénierie tissulaire du ligament du stade de recherche au stade de nouvelle solution clinique au service des patients.

Bibliographie

Abramowitch2004: Abramowitch SD, Woo SL-Y, **2004**. An improved method to analyze the stress relaxation of ligaments following a finite ramp time based on the quasi-linear viscoelastic theory, *Journal of Biomechanical Engineering* 126, p. 92-97.

Adebisi2011: Adebisi AA, Taslim ME, Crawford KD, **2011**. The use of computational fluid dynamic models for the optimization of cell seeding processes, *Biomaterials* 32, p. 8753-8770.

Ahn2010: Ahn G, Park JH, Kang T, **2010**. Effect of Pore Architecture on Oxygen Diffusion in 3D Scaffolds for Tissue Engineering, *Journal of Biomechanical Engineering* 132, p. 104506-1-104506-5.

Almeida2010: Almeida HdA, da Silva Bártolo PJ, **2010**. Virtual topological optimisation of scaffolds for rapid prototyping, *Medical Engineering & Physics* 32, p. 775-782.

Altman2002: Altman GH, Horan RL, Lu HH, Moreau J, Martin I, Richmond JC, Kaplan DL, **2002**. Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligament, *Biomaterials* 23, p. 4131-4141.

Altman2002a: Altman GH, Horan RL, Martin I, Farhadi J, Stark PRH, Volloch V, Richmond JC, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL, **2002**. Cell differentiation by mechanical stress, *The FASEB Journal* 16, p. 270-272.

Altman2002b: Altman GH, Lu HH, Horan RL, Calabro T, Ryder D, Kaplan DL, **2002**. Advanced bioreactor with controlled application of multi-dimensional strain for tissue engineering, *Journal of Biomechanical Engineering* 124, p. 742-749.

Amiri2011: Amiri S, V. Cooke TD, Wyss UP, **2011**. A multiple-bundle model to characterize the mechanical behavior of the cruciate ligaments, *The knee* 18, p. 34-41.

Amis1991: Amis AA, Dawkins GPC, **1991**. Functional Anatomy of the Anterior Cruciate Ligament, *The Journal of Bone and Joint Surgery* 73, p. 260-267.

Andersen1997: Andersen HN, Dyhre-Poulsen P, **1997**. The anterior cruciate ligament does play a role in controlling axial rotation in the knee, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 5, p. 145-149.

Anderson1997: Anderson JM, Shive MS, **1997**. Biodegradation and biocompatibility of PLA and PLGA microspheres, *Advanced Drug Delivery Reviews* 28, p. 5-24.

Arnoczky1983: Arnoczky SP, **1983**. Anatomy of the Anterior Cruciate Ligament, *Clinical Orthopaedics and Related Research* 172, p. 19-25.

Ayranci2008: Ayranci C, Carey J, **2008**. 2D braided composites: A review for stiffness critical applications, *Composite Structures* 85, p. 43-58.

Ayranci2010: Ayranci C, Carey JP, **2010**. Predicting the longitudinal elastic modulus of braided tubular composites using a curved unit-cell geometry, *Composites: part B* 41, p. 229-235.

Azangwe2002: Azangwe G, Mathias KJ, Marshall D, **2002**. The effect of torsion on the appearance of the rupture surface of the ACL of rabbits, *The knee* 9, p. 31-39.

Bibliographie

- Baas2010: Baas E, Kuiper JH, Yang Y, Wood MA, El Haj AJ, **2010**. In vitro bone growth responds to local mechanical strain in three-dimensional polymer scaffolds, *Journal of Biomechanics* 43, p. 733-739.
- Bach1997: Bach JM, Hull ML, Patterson HA, **1997**. Direct measurement of strain in the posterolateral bundle of the anterior cruciate ligament, *Journal of Biomechanics* 30(3), p. 281-283.
- Bakker2001: Bakker AD, Soejima K, Klein-Nulend J, Burger EH, **2001**. The production of nitric oxide and prostaglandin E2 by primary bone cells is shear stress dependent, *Journal of Biomechanics* 34, p. 671-677.
- Barnes2007: Barnes CP, Sell SA, Boland ED, Simpson DG, Bowlin GL, **2007**. Nanofiber technology: Designing the next generation of tissue engineering scaffolds, *Advanced Drug Delivery Reviews* 59, p. 1413-1433.
- Becker2009: Becker ST, Bolte H, Krapf O, Seitz H, Douglas T, Sivananthan S, Wiltfang J, Sherry E, Warnke PH, **2009**. Endocultivation: 3D printed customized porous scaffolds for heterotopic bone induction, *Oral Oncology* 45, p. 181-188.
- Benhardt2009: Benhardt HA, Cosgriff-Hernandez EM, **2009**. The Role of Mechanical Loading in Ligament Tissue Engineering, *Tissue Engineering part B* 15(4), p. 467-475.
- Berns1992: Berns GS, Hull ML, Patterson HA, **1992**. Strain in the Anteromedial Bundle of the Anterior Cruciate Ligament Under Combination Loading, *Journal of Orthopaedic Research* 10, p. 167-176.
- Beynon1998: Beynon BD, Amis AA, **1998**. In vitro testing protocols for the cruciate ligaments and ligament reconstructions, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 6, p. 70-76.
- Beynon1998a: Beynon BD, Fleming BC, **1998**. Anterior cruciate ligament strain in-vivo: A review of previous work, *Journal of Biomechanics* 31, p. 519-525.
- Bicer2010: Bicer EK, Lustig S, Servien E, Selmi TAS, Neyret P, **2010**. Current knowledge in the anatomy of the human anterior cruciate ligament, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 18, p. 1075-1084.
- Boschetti2006: Boschetti F, Raimondi MT, Migliavacca F, Dubini G, **2006**. Prediction of the micro-fluid dynamic environment imposed to three-dimensional engineered cell systems in bioreactors, *Journal of Biomechanics* 39, p. 418-425.
- Butler1983: Butler DL, Stouffer DC, **1983**. Tension-Torsion Characteristics of the Canine Anterior Cruciate Ligament - Part II: Experimental Observations, *Journal of Biomechanical Engineering* 105, p. 160-165.
- Butler1989: Butler DL, **1989**. Anterior Cruciate Ligament: Its Normal Response and Replacement, *Journal of Orthopaedic Research* 7, p. 910-921.
- Butler2000: Butler DL, Goldstein SA, Guilak F, **2000**. Functional tissue engineering: the role of biomechanics, *Journal of Biomechanical Engineering* 122, p. 570-575.
- Butler2009: Butler DL, Hunter SA, Chokalingam K, Cordray MJ, Shearn J, Juncosa-Melvin N, Nirmalanandhan S, Jain A, **2009**. Using Functional Tissue Engineering and Bioreactors to Mechanically Stimulate Tissue-Engineered Constructs, *Tissue Engineering part A* 15(4), p. 741-749.
- Byrne2007: Byrne DP, Lacroix D, Planell JA, Kelly DJ, Prendergast PJ, **2007**. Simulation of tissue differentiation in a scaffold as a function of porosity, Young's modulus and dissolution rate: Application of mechanobiological models in

Bibliographie

tissue engineering, *Biomaterials* 28, p. 5544-5554.

Chan2010: Chan KS, Liang W, Francis WL, Nicoletta DP, **2010**. A multiscale modeling approach to scaffold design and property prediction, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 3, p. 584-593.

Chandrashekar2006: Chandrashekar N, Mansouri H, Slauterbeck J, Hashemi J, **2006**. Sex-based differences in the tensile properties of the human anterior cruciate ligament, *Journal of biomechanics* 39, p. 2943-2950.

Chen2001: Chen G, Ushida T, Tateishi T, **2001**. Development of biodegradable porous scaffolds for tissue engineering, *Materials Science and Engineering C* 17, p. 63-69.

Chen2003: Chen C-C, Chueh J-Y, Tseng H, Huanc H-M, Lee S-Y, **2003**. Preparation and characterization of biodegradable PLA polymeric blends, *Biomaterials* 24, p. 1167-1173.

Chen2006: Chen VJ, Smith LA, Ma PX, **2006**. Bone regeneration on computer-designed nano-fibrous scaffolds, *Biomaterials* 27, p. 3973-3979.

Chen2008: Chen CS, **2008**. Mechanotransduction: a field pulling together?, *Journal of Cell Science* 121, p. 3285-3292.

Chen2008a: Chen X, Qi Y-Y, Wang L-L, Yin Z, Yin G-L, Zou X-H, Ouyang H-W, **2008**. Ligament regeneration using a knitted silk scaffold combined with collagen matrix, *Biomaterials* 29, p. 3683-3692.

Chen2010: Chen Y, Zhou S, Cadman J, Li Q, **2010**. Design of Cellular Porous Biomaterials for Wall Shear Stress Criterion, *Biotechnology and Bioengineering* 107(4), p. 737-746.

Chen2011a: Chen Y, Zhou S, Li Q, **2011**. Microstructure design of biodegradable scaffold and its effect on tissue regeneration, *Biomaterials* 32, p. 5003-5014.

Cheung2007: Cheung H-Y, Lau K-T, Lu T-P, Hui D, **2007**. A critical review on polymer-based bio-engineered materials for scaffold development, *Composites part B: engineering* 38, p. 291-300.

Chevallier1998: Chevallier JM, **1998**. Anatomie, tome 2: l'appareil locomoteur, Flammarion Médecine-Sciences.

Chiquet2003: Chiquet M, Renedo AS, Huber F, Flück M, **2003**. How do fibroblasts translate mechanical signals into changes in extracellular matrix production?, *Matrix biology* 22, p. 73-80.

Chiquet2009: Chiquet M, Gelman L, Lutz R, Maier S, **2009**. From mechanotransduction to extracellular matrix gene expression in fibroblasts, *Biochimica et biophysica acta* 1793, p. 911-920.

Christel2005: Christel P, Franceschi J-P, Sbihi A, Colombet P, Djian P, Bellier G, **2005**. Anatomic Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: The French Experience, *Operative Techniques in Orthopaedics* 15(2), p. 103-110.

Chung2010: Chung CA, Ho S-Y, **2010**. Analysis of collagen and glucose modulated cell growth within tissue engineered scaffolds, *Annals of Biomedical Engineering* 38(4), p. 1655-1663.

Ciarletta2008: Ciarletta P, Dario P, Micera S, **2008**. Pseudo-hyperelastic model of tendon hysteresis from adaptive recruitment of collagen type I fibrils, *Biomaterials* 29(6), p. 764-770.

Cinbiz2010: Cinbiz MN, Tigli RS, Beskardes IG, Gumusderelioglu M, Colak U, **2010**. Computational fluid dynamics

Bibliographie

modeling of momentum transport in rotating wall perfused bioreactor for cartilage tissue engineering, *Journal of Biotechnology* 150, p. 389-395.

Cooper2005: Cooper JA, Lu HH, Ko FK, Freeman JW, Laurencin CT, **2005**. Fiber-based tissue-engineered scaffold for ligament replacement: design considerations and in vitro evaluation, *Biomaterials* 26, p. 1523-1532.

Cowin2000: Cowin SC, **2000**. How Is a Tissue Built?, *Journal of Biomechanical Engineering* 122, p. 553-569.

Daamen2005: Daamen WF, Nillesen STM, Hafmans T, Veerkamp JH, Van Luyn MJA, Van Kuppevelt TH, **2005**. Tissue response of defined collagen–elastin scaffolds in young and adult rats with special attention to calcification, *Biomaterials* 26, p. 81-92.

Dargel2007: Dargel J, Gotter M, Mader K, Pennig D, Koebke J, Schmidt-Wiethoff R, **2007**. Biomechanics of the anterior cruciate ligament and implications for surgical reconstruction, *Strategies in Trauma and Limb Reconstruction* 2, p. 1-12.

DeVita2006: De Vita R, Slaughter WS, **2006**. A structural constitutive model for the strain rate-dependant behavior of anterior cruciate ligaments, *International Journal of Solids and Structures* 43, p. 1561-1570.

Diamond2000: Diamond S, **2000**. Mercury porosimetry: An inappropriate method for the measurement of pore size distributions in cement-based materials, *Cement and Concrete Research* 30, p. 1517-1525.

Discher2005: Discher DE, Janmey P, Wang Y-L, **2005**. Tissue cells feel and respond to the stiffness of their substrate, *Materials and biology* 310, p. 1139-1143.

Doroski2007: Doroski DM, Brink KS, Temenoff JS, **2007**. Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament, *Biomaterials* 28, p. 187-202.

Durville2005: Durville D, **2005**. Numerical simulation of entangled materials mechanical properties, *Journal of materials science* 40, p. 5941-5948.

Durville2007: Durville D, **2007**. Une approche pour la simulation numérique des milieux enchevêtrés et des structures tissées, *18ème congrès français de mécanique*.

Durville2009: Durville D, **2009**. Finite element simulation of textile materials at the fiber scale, *International SAMPE Symposium and Exhibition*.

Durville2009a: Durville D, **2010**. Simulation of the mechanical behaviour of woven fabrics at the scale of fibers, *International Journal of Material Forming* 3, p. 1241-1251.

Durville2012: Durville D, **2012**. Contact-friction modeling within elastic beam assemblies: an application to knot tightening, *Computational Mechanics*, p. .

Duthon2006: Duthon VB, Barea C, Abrassart S, Fasel JH, Fritschy D, Ménétrey J, **2006**. Anatomy of the anterior cruciate ligament, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 14, p. 204-213.

Elomaa2011: Elomaa L, Teixeira S, Hakala R, Korhonen H, Grijpma DW, Seppälä JV, **2011**. Preparation of poly(ϵ -caprolactone)-based tissue engineering scaffolds by stereolithography, *Acta Biomaterialia* 7, p. 3850-3856.

Bibliographie

- Eshraghi2010: Eshraghi S, Das S, **2010**. Mechanical and microstructural properties of polycaprolactone scaffolds with one-dimensional, two-dimensional, and three-dimensional orthogonally oriented porous architectures produced by selective laser sintering, *Acta Biomaterialia* 6, p. 2467-2476.
- Fan2008: Fan H, Liu H, Wong EJW, Toh SL, Goh JCH, **2008**. In vivo study of anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold, *Biomaterials* 29, p. 3324-3337.
- Fan2009: Fan H, Liu H, Toh SL, Goh JCH, **2009**. Anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold in large animal model, *Biomaterials* 30, p. 4967-4977.
- Fedorovich2011: Fedorovich NE, Alblas J, Hennink WE, Oner FC, Dhert WJA, **2011**. Organ printing: the future of bone regeneration, *Trends in biotechnology* 29(12), p. 601-606.
- Fierz2008: Fierz FC, Beckmann F, Huser M, Irsen SH, Leukers B, Witte F, Degistirici O, Andronache A, Thie M, Müller B, **2008**. The morphology of anisotropic 3D-printed hydroxyapatite scaffolds, *Biomaterials* 29, p. 3799-3806.
- Fisher2007: Fisher JP, Mikos AG, Bronzino JD, Tissue engineering, 2007
- Fleming2001: Fleming BC, Renstrom PA, Beynon BD, Engstrom B, Peura GD, Badger GJ, Johnson RJ, **2001**. The effect of weightbearing and external loading on anterior cruciate ligament strain, *Journal of Biomechanics* 34, p. 163-170.
- Frank1997: Frank CB, Jackson DW, **1997**. The science of reconstruction of anterior cruciate ligament, *The journal of bone and joint surgery* 79, p. 1556-1576.
- Freeman2007: Freeman JW, Woods MD, Laurencin CT, **2007**. Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid-twist scaffold design, *Journal of Biomechanics* 40, p. 2029-2036.
- Freeman2009: Freeman JW, **2009**. Tissue engineered devices for ligament repair, replacement and regeneration, *African Journal of Biotechnology* 25, p. 7182-7189.
- Fujie1996: Fujie H, Livesay GA, Woo SL-Y, Kashiwaguchi S, Blomstrom G, **1996**. The Use of a Universal Force-Moment Sensor to Determine In-Situ Forces in Ligaments: A New methodology, *Journal of Biomechanical Engineering* 117, p. 1-7.
- Gabriel2004: Gabriel MT, Wong EIS, Woo SL-Y, Yagi M, Debski RE, **2004**. Distribution of in situ forces in the anterior cruciate ligament in response to rotatory loads, *Journal of Orthopedic Research* 22, p. 85-89.
- Gao2010: Gao B, Zheng NN, **2010**. Alterations in three-dimensional joint kinematics of anterior cruciate ligament-deficient and -reconstructed knees during walking, *Clinical Biomechanics* 25, p. 22-229.
- Garbelotti2007: Garbelotti SA, Pelozo O, Caldana RP, Ramalho A, Smith RL, **2007**. Experimental evaluation of 3-dimensional kinematic behavior of the cruciate ligaments, *Clinics* 62(5), p. 619-626.
- Ge2005: Ge Z, Goh JCH, Lee EH, **2005**. Selection of Cell Source for Ligament Tissue Engineering, *Cell Transplantation* 14, p. 573-583.
- Grinsven2010: van Grinsven S, van Cingel REH, Holla CJM, van Loon CJM, **2010**. Evidence-based rehabilitation following anterior cruciate ligament reconstruction, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 18, p. 1128-1144.

Bibliographie

Good1976: Good ES, Noyes FR, **1976**. Cruciate Ligament Prosthesis: Strength, Creep, and Fatigue Properties, *The Journal of Bone and Joint Surgery* 58, p. 1083-1088.

Hersel2003: Hersel U, Dahmen C, Kessler H, **2003**. RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond, *Biomaterials* 24, p. 4385-4415.

Hiljanen-Vainio1995: Hiljanen-Vainio M, Karjalainen T, Seppala J, **1995**. Biodegradable lactone copolymers. I. Characterization and mechanical behavior of ϵ -caprolactone and lactide copolymers, *Journal of applied polymer science* 59, p. 1281-1288.

Hollister2002: Hollister SJ, Maddox RD, Taboas JM, **2002**. Optimal design and fabrication of scaffolds to mimic tissue properties and satisfy biological constraints, *Biomaterials* 23, p. 4095-4103.

Hollister2005: Hollister SJ, **2005**. Porous scaffold design for tissue engineering, *Nature Materials* 4(7), p. 518-524.

Hollister2007: Hollister SJ, Lin CY, **2007**. Computational design of tissue engineering scaffolds, *Computed methods in applied mechanics and engineering* 196, p. 2991-2998.

Hollister2009: Hollister SJ, **2009**. Scaffold design and manufacturing: From concept to clinic, *Advanced Materials* 21(32-33), p. 3330-3342.

Horan2006: Horan RL, Collette AL, Lee C, Antle K, Chen J, Altman GH, **2006**. Yarn design for functional tissue engineering, *Journal of Biomechanics* 39, p. 2232-2240.

Hosseini2009: Hosseini A, Gill TJ, Li G, **2009**. In vivo anterior cruciate ligament elongation in response to axial tibial loads, *Journal of Orthopaedic Science* 14, p. 298-306.

Hutmacher2004: Hutmacher DW, Sittinger M, Risbud MV, **2004**. Scaffold-based tissue engineering: rationale for computer-aided design and solid free-form fabrication systems, *Trends in biotechnology* 22(7), p. 354-362.

Hutmacher2008: Hutmacher DW, Singh H, **2008**. Computational fluid dynamics for improved bioreactor design and 3D culture, *Trends in biotechnology* 26, p. 166-172.

Ingber2006: Ingber DE, **2006**. Cellular mechanotransduction: putting all the pieces together again, *The FASEB Journal* 20, p. 811-827.

Ingber2006a: Ingber DE, Mow VC, Butler D, Niklason L, Huard J, Mao J, Yannas I, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G, **2006**. Tissue engineering and developmental biology: going biomimetic, *Tissue Engineering* 12(12), p. 3265-3283.

Isaksson2006: Isaksson H, van Donkelaar CC, Huiskes R, Ito K, **2006**. Corroboration of Mechanoregulatory Algorithms for Tissue Differentiation during Fracture Healing: Comparison with In Vivo Results, *Journal of Orthopaedic Research* 24(5), p. 898-907.

Isaksson2006a: Isaksson H, Wilson W, van Donkelaar CC, Huiskes R, Ito K, **2006**. Comparison of biophysical stimuli for mechano-regulation of tissue differentiation during fracture healing, *Journal of Biomechanics* 39(8), p. 1507-1516.

Jaecques2004: Jaecques SVN, Van Oosterwyck H, Muraru L, Van Cleynenbreugel T, De Smet E, Wevers M, Naert I, Sloten JV, **2004**. Individualised, micro CT-based finite element modelling as a tool for biomechanical analysis related to tissue engineering of bone, *Biomaterials* 25, p. 1683-1696.

Bibliographie

- Jeong2004: Jeong SI, Kim B-S, Kang SW, Kwon JH, Lee YM, Kim SH, **2004**. In vivo biocompatibility and degradation behavior of elastic poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) scaffolds, *Biomaterials* 25, p. 5939-5946.
- Jeong2004a: Jeong SI, Kim B-S, Lee YM, Ihn KJ, Kim SH, Kim YH, **2004**. Morphology of Elastic Poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) Copolymers and in Vitro and in Vivo Degradation Behavior of Their Scaffolds, *Biomacromolecules* 5, p. 1303-1309.
- Jeong2008: Jeong SI, Lee YM, **2008**. Tissue engineering using a cyclic strain bioreactor and gelatin/plcl scaffolds, *Macromolecular research* 16, p. 567-569.
- Jiankang2007: Jiankang H, Dichen L, Yaxiong L, Bo Y, Bingheng L, Qin L, **2007**. Fabrication and characterization of chitosan-gelatin porous scaffolds with predefined internal microstructures, *Polymer* 48, p. 4578-4588.
- Jones1995: Jones RS, Nawana NS, Percy MJ, Learmonth DJA, Bickerstaff DR, Costi JJ, Paterson RS, **1995**. Mechanical properties of the human anterior cruciate ligament, *Clinical Biomechanics* 10, p. 339-344.
- Jones2007: Jones JR, Poologasundarampillai G, Atwood RC, Bernard D, Lee PD, **2007**. Non-destructive quantitative 3D analysis for the optimisation of tissue scaffolds, *Biomaterials* 28, p. 1404-1413.
- Jones2009: Jones AC, Arns CH, Hutmacher DW, Milthorpe BK, Sheppard AP, Knackstedt MA, **2009**. The correlation of pore morphology, interconnectivity and physical properties of 3D ceramic scaffolds with bone ingrowth, *Biomaterials* 30, p. 1440-1451.
- Kahn2008: Kahn CJ-F, Rahouadj R, Wang X, **2008**. Thermodynamical Approaches Modeling of tendons and Ligaments' Mechanical Behavior, *Journal of Biomechanics* 41 S1, p. S364.
- Kahn2009: Kahn CJF, **2009**. Ingénierie tissulaire des ligaments: conception d'un bioréacteur et étude des propriétés mécaniques, *Phd Thesis*, INPL.
- Kanamori2000: Kanamori A, Sakane M, Zeminski J, Rudy TW, Woo SL-Y, **2000**. In situ force in the medial and lateral structures of intact and ACL-deficient knees, *Journal of Orthopaedic Science* 5, p. 567-571.
- Kang2010: Kang H, Lin C-Y, Hollister SJ, **2010**. Topology optimization of three dimensional tissue engineering scaffold architectures for prescribed bulk modulus and diffusivity, *Structural and Multidisciplinary optimization* 42(4), p. 633-644.
- Karmani2003: Karmani S, Ember T, **2003**. The anterior cruciate ligament -I, *Current Orthopaedics* 17, p. 369-377.
- Karmani2003a: Karmani S, Ember T, **2003**. The anterior cruciate ligament -II, *Current Orthopaedics* 18, p. 49-57.
- Kato2010: Kato Y, Hoshino Y, Ingham SJM, Fu FH, **2010**. Anatomic double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction, *Journal of orthopaedic science* 15, p. 269-276.
- Katouda2011: Katouda M, Soejima S, Kanazawa T, Tabuchi K, Yamaki K, Nagata K, **2011**. Relationship between thickness of the anteromedial bundle and thickness of the posterolateral bundle in the normal ACL, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* in press, p. .
- Kaya2010: Kaya A, Karadag D, Guçlu B, Uçar F, Benli IT, **2010**. Evaluation of the two bundles of the anterior cruciate ligament with 1.5 tesla magnetic resonance imaging, *Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica* 44(1), p. 54-62.

Bibliographie

- Keira1996: Keira M, Yasuda K, Kaneda K, Yamamoto N, Hayashi K, **1996**. Mechanical Properties of the Anterior Cruciate Ligament Chronically Relaxed by Elevation of the Tibial Insertion, *Journal of Orthopaedic Research* 14, p. 157-166.
- Kennedy1976: Kennedy JC, Hawkins RJ, Willis RB, Danylchuk KD, **1976**. Tension Studies of Human Knee Ligaments, *The Journal of Bone and Joint Surgery* 58, p. 350-355.
- Khoda2011: Khoda AKMB, Ozbolat IT, Koc B, **2011**. Engineered Tissue Scaffolds With Variational Porous Architecture, *Journal of Biomechanical Engineering* 133, p. 011001-1-011001-12.
- Kimura2008: Kimura Y, Hokugo A, Takamoto T, Tabata Y, Kurosawa H, **2008**. Regeneration of Anterior Cruciate Ligament by Biodegradable Scaffold Combined with Local Controlled Release of Basic Fibroblast Growth Factor and Collagen Wrapping, *Tissue Engineering part C* 14(1), p. 47-57.
- Korobeinikov2000: Korobeinikov SN, **2000**. Strictly conjugate stress and strain tensors, *Journal of Applied Mechanics and Technical Physics* 41(3), p. 513-518.
- Kwon2005: Kwon IK, Kidoaki S, Matsuda T, **2005**. Electrospun nano-to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters: structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential, *Biomaterials* 26, p. 3929-3939.
- Lacroix2002: Lacroix D, Prendergast PJ, Li G, Marsh D, **2002**. Biomechanical model to simulate tissue differentiation and bone regeneration: Application to fracture healing, *Medical and Biological Engineering and computing* 40(1), p. 14-21.
- Lacroix2002a: Lacroix D, Prendergast PJ, **2002**. A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing- analysis of gap size and loading, *Journal of Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 35(9), p. 1163-1171.
- Lacroix2006: Lacroix D, Chateau A, Ginebra M-P, Planell JA, **2006**. Micro-finite element models of bone tissue-engineering scaffolds, *Biomaterials* 27, p. 5326-5334.
- Lacroix2009: Lacroix D, Planell JA, Prendergast PJ, **2009**. Computer-aided design and finite-element modelling of biomaterial scaffolds for bone tissue engineering, *Philosophical Transactions of the Royal Society A* 367, p. 1993-2009.
- Langelier1999: Langelier E, Rancourt D, Bouchard S, Lors C, Stevens P-P, Germain L, Auger FA, **1999**. Cyclic Traction Machine for Long-Term Culture of Fibroblast-Populated Collagen Gels, *Annals of Biomedical Engineering* 27, p. 67-72.
- Langer1993: Langer R, Vacanti JP, **1993**. Tissue Engineering, *Science* 260(5110), p. 920-926.
- Latil2011: Latil P, Orgéas L, Geindreau C, Dumont PJJ, Rolland du Roscoat S, **2011**. Towards the 3D in situ characterisation of deformation micro-mechanisms within a compressed bundle of fibres, *Composites Science and Technology* 71, p. 480-488.
- Lattermann2005: Lattermann C, Zelle BA, Ferretti M, Chhabra A, Fu FH, **2005**. Anatomic Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction, *Techniques in Orthopaedics* 20(4), p. 414-420.
- Laurencin2005: Laurencin CT, Freeman JW, **2005**. Ligament tissue engineering: An evolutionary materials science approach, *Biomaterials* 26, p. 7530-7536.

Bibliographie

- Laurent2011: Laurent CP, Ganghoffer J-F, Babin J, Six J-L, Wang X, Rahouadj R, **2011**. Morphological Characterization of a Novel Scaffold for Anterior Cruciate Ligament Tissue Engineering, *Journal of biomechanical engineering* 133, p. 065001-1-9.
- Laurent2012: Laurent CP, Durville D, Mainard D, Ganghoffer J-F, Rahouadj R, **2012**. A multilayer braided scaffold for Anterior Cruciate Ligament: Mechanical modeling at the fiber scale, *Journal of Mechanical Behaviour of Biomedical Materials* 12, p. 184-196.
- Leclerc2006: Leclerc E, Corlu A, Griscom L, Baudoin R, Legallais C, **2006**. Guidance of liver and kidney organotypic cultures inside rectangular silicone microchannels, *Biomaterials* 27, p. 4109-4119.
- Lee2005: Lee CH, Shin HJ, Cho IH, Kang Y-M, Kim IA, Park K-D, Shin J-W, **2005**. Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast, *Biomaterials* 26, p. 1261-1270.
- Lee2008: Lee SJ, Kang H-W, Park JK, Rhie J-W, Hahn SK, Cho D-W, **2008**. Application of microstereolithography in the development of three-dimensional cartilage regeneration scaffolds, *Biomedical Microdevices* 10, p. 233-241.
- Lee2010: Lee K-W, Wang S, Dadsetan M, Yaszemski MJ, Lu L, **2010**. Enhanced Cell Ingrowth and Proliferation through Three-Dimensional Nanocomposite Scaffolds with Controlled Pore Structures, *Biomacromolecules* 11, p. 682-689.
- Leon1999: Leon Y Leon, CA, **1999**. New perspectives in mercury porosimetry, *Advances in Colloid and Interface Science* 76-77, p. 341-372.
- Leong2003: Leong KF, Cheah CM, Chua CK, **2003**. Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, *Biomaterials* 24, p. 2363-2378.
- Leong2008: Leong KF, Chua CK, Sudarmadji N, Yeong WY, **2008**. Engineering functionally graded tissue engineering scaffolds, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 1, p. 140-152.
- Lesman2010: Lesman A, Blinder Y, Levenberg S, **2010**. Modeling of Flow-Induced Shear Stress Applied on 3D Cellular Scaffolds: Implications for Vascular Tissue Engineering, *Biotechnology and Bioengineering* 105(3), p. 645-654.
- Lewis1989: Lewis JL, Lew WD, Hill JA, Hanley P, Ohland K, Kirstukas S, Hunter RE, **1989**. Knee Joint Motion and Ligament Forces Before and After ACL Reconstruction, *Journal of Biomechanical Engineering* 111, p. 97-106.
- Li2005: Li G, DeFrate LE, Rubash HE, Gill TJ, **2005**. In vivo kinematics of the ACL during weight-bearing knee flexion, *Journal of Orthopaedic Research* 23, p. 340-344.
- Li2006: Li G, Papannagari R, DeFrate LE, Yoo JD, Park SE, Gill TJ, **2006**. Comparison of the ACL and ACL graft forces before and after ACL reconstruction, *Acta Orthopaedica* 77, p. 267-274.
- Li2011: Li J, Zhang L, Lv S, Li S, Wang N, Zhang Z, **2011**. Fabrication of individual scaffolds based on a patient-specific alveolar bone defect model, *Journal of Biotechnology* 151, p. 87-93.
- Liao2008: Liao S, Chan CK, Ramakrishna S, **2008**. Stem cells and biomimetic materials strategies for tissue engineering, *Materials Science and Engineering C* 28, p. 1189-1202.

Bibliographie

- Lin2004: Lin CY, Kikuchi N, Hollister SJ, **2004**. A novel method for biomaterial scaffold internal architecture design to match bone elasticity with desired porosity, *Journal of Biomechanics* 37, p. 623-636.
- Liu2008: Liu H, Fan H, Wang Y, Lok Toh S, Goh JCH, **2008**. The interaction between a combined knitted silk scaffold and microporous silk sponge with human mesenchymal stem cells for ligament tissue engineering, *Biomaterials* 29, p. 662-674.
- Liu2008a: Liu Y, Ramanath HS, Wang D-A, **2008**. Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies, *Trends in biotechnology* 26, p. 201-209.
- Lo2000: Lo C-M, Wang H-B, Dembo M, Wang Y-L, **2000**. Cell Movement Is Guided by the Rigidity of the Substrate, *Biophysical Journal* 79, p. 144-152.
- Lomov2007: Lomov SV, Ivanov DS, Verpoest I, Zako M, Kurashiki T, Nakai H, Hirosawa S, **2007**. Meso-FE modelling of textile composites: Road map, data flow and algorithms, *Composites Science and Technology* 67, p. 1870-1891.
- Lopez-Rodriguez2006: Lopez-Rodriguez N, Lopez-Arraiza A, Meaurio E, Sarasua JR, **2006**. Crystallization, morphology, and mechanical behavior of polylactide/poly(ϵ -caprolactone) blends, *Polymer engineering and science* 46, p. 1299-1308.
- Lu2005: Lu HH, Cooper JA, Manuel S, Freeman JW, Attawia MA, Ko FK, Laurencin CT, **2005**. Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: in vitro optimization studies, *Biomaterials* 26, p. 4805-4816.
- Lu2008: Lu XL, Cai W, Gao ZY, **2008**. Shape-Memory Behaviors of Biodegradable poly(L-lactide-co- ϵ -caprolactone) copolymers, *Journal of Applied Polymer Science* 108, p. 1109-1115.
- Lyons2004: Lyons J, Pastore CM, **2004**. Effect of Braid Structure on Yarn Cross-Sectional Shape, *Fibers and Polymers* 5, p. 182-186.
- Ma2004: Ma PX, **2004**. Scaffolds for tissue fabrication, *Materials Today* 7, p. 30-40.
- Maes2009: Maes F, Van Ransbeeck P, Van Oosterwyck H, Verdonck P, **2009**. Modeling Fluid Flow Through Irregular Scaffolds for Perfusion Bioreactors, *Biotechnology and Bioengineering* 103(3), p. 621-630.
- Marchaland2000: Marchaland JP, Versier G, Romanet JP, **2000**. Traitement chirurgical des lésions du ligament croisé antérieur du genou par plastie mixte autologue, *Science & Sports* 15, p. 10-7.
- Markolf1990: Markolf KL, Gorek JF, Kabo JM, Shapiro MS, **1990**. Direct measurement of resultant forces in the anterior cruciate ligament. An in vitro study performed with a new experimental technique, *The Journal of Bone and Joint Surgery* 72, p. 557-567.
- Martin2004: Martin I, Wendt D, Heberer M, **2004**. The role of bioreactors in tissue engineering, *Trends in biotechnology* 22(2), p. 80-86.
- McGarry2005: McGarry JG, Klein-Nulend J, Mullender MG, Prendergast PJ, **2005**. A comparison of strain and fluid shear stress in stimulating bone cell responses: a computational and experimental study, *The FASEB Journal* 19(3), p. 482-484.

Bibliographie

- Meek2009: Meek MF, Jansen K, **2009**. Two years after in vivo implantation of poly(DL-lactide-ε-caprolactone) nerve guides - Has the material finally resorbed, *Journal of Biomedical Materials Research - Part A* 89, p. 734-738.
- Melchels2010: Melchels FPW, Bertoldi K, Gabrielli R, Velders AH, Feijen J, Grijpma DW, **2010**. Mathematically defined tissue engineering scaffold architectures prepared by stereolithography, *Biomaterials* 31, p. 6909-6916.
- Melchels2010b: Melchels FPW, Barradas AMC, van Blitterswijk CA, de Boer J, Feijen J, Grijpma DW, **2010**. Effects of the architecture of tissue engineering scaffolds on cell seeding and culturing, *Acta Biomaterialia* 6, p. 4208-4217.
- Melchels2011: Melchels FPW, Tonnarelli B, Olivares AL, Martin I, Lacroix D, Feijen J, Wendt DJ, Grijpma DW, **2011**. The influence of the scaffold design on the distribution of adhering cells after perfusion cell seeding, *Biomaterials* 32, p. 2878-2884.
- Miao2008: Miao Y, Zhou E, Wang Y, Cheeseman BA, **2008**. Mechanics of textile composites: Micro-geometry, *Composites Science and Technology* 68, p. 1671-1678.
- Milan2009: Milan J-L, Planell JA, Lacroix D, **2009**. Computational modelling of the mechanical environment of osteogenesis within a polylactic acid–calcium phosphate glass scaffold, *Biomaterials* 30, p. 4219-4226.
- Milan2010: Milan J-L, Planell JA, Lacroix D, **2010**. Simulation of bone tissue formation within a porous scaffold under dynamic compression, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 9, p. 583-596.
- Mommersteeg1997: Mommersteeg TJA, Huiskes R, Blankevoort L, M. Kooloos JG, Kauer JMG, **1997**. An inverse dynamics modeling approach to determine the restraining function of human knee ligament bundles, *Journal of Biomechanics* 30, p. 139-146.
- Moraiti2010: Moraiti CO, Stergiou N, Vasiliadis HS, Mosis E, Georgoulis A, **2010**. Anterior cruciate ligament reconstruction results in alterations in gait variability, *Gait & Posture* 32, p. 169-175.
- Moroni2005: Moroni L, De Wijn JR, Van Blitterswijk CA, **2005**. 3D fiber-deposited scaffolds for tissue engineering: Influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties, *Biomaterials* 27, p. 974-985.
- Murphy2010: Murphy CM, Haugh MG, O'Brien FJ, **2010**. The effect of mean pore size on cell attachment, proliferation and migration in collagen-glycosaminoglycan scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* 31(3), p. 461-466.
- Nair2007: Nair LS, Laurencin CT, **2007**. Biodegradable polymers as biomaterials, *Progress in polymer science* 32, p. 762-798.
- Nirmalanandhan2008: Nirmalanandhan VS, Rao M, Shearn JT, Juncosa-Melvin N, Gooch C, Butler DL, **2008**. Effect of scaffold material, construct length and mechanical stimulation on the in vitro stiffness of the engineered tendon construct, *Journal of biomechanics* 41, p. 822-828.
- Noyes1974: Noyes FR, Delucas JL, Torvik PJ, **1974**. Biomechanics of Anterior Cruciate Ligament Failure: An Analysis of Strain-Rate Sensitivity and Mechanisms of Failure in Primates, *The Journal of Bone and Joint Surgery* 56, p. 236-253.
- Noyes1976: Noyes FR, Grood ES, **1976**. The Strength of the Anterior Cruciate Ligament in Humans and Rhesus Monkeys, *The Journal of Bone and Joint Surgery* 58, p. 1074-1082.

Bibliographie

- Noyes1984: Noyes FR, Butler DL, Grood ES, Zernicke RF, Hefzy MS, **1984**. Biomechanical Analysis of Human Ligament Grafts used in Knee-Ligament Repairs and Reconstructions, *The Journal of Bone and joint Surgery* 66, p. 344-352.
- Noyes1989: Noyes FR, Mooar LA, Moorman CT, McGiniss GH, **1989**. Partial tears of the anterior cruciate ligament, *Journal of bone and joint surgery* 71, p. 825-833.
- Oh2007: Oh SH, Park IK, Kim JM, Lee JH, **2007**. In vitro and in vivo characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by a centrifugation method, *Biomaterials* 28, p. 1664-1671.
- Olivares2009: Olivares AL, Marsal E, Planell JA, Lacroix D, **2009**. Finite element study of scaffold architecture design and culture conditions for tissue engineering, *Biomaterials* 30, p. 6142-6149.
- Omeroglu2006: Omeroglu S, **2006**. The Effect of Braiding Parameters on the Mechanical Properties of Braided Ropes, *Fibres and Textiles in Eastern Europe* 14, p. 53-57.
- Owen2010: Owen SC, Shoichet MS, **2010**. Design of three-dimensional biomimetic scaffolds, *Journal of Biomedical Materials Research A* 94(4), p. 1321-1331.
- Park2009: Park S, GeunHyung K, Yong CJ, YoungHo K, WanDoo K, **2009**. 3D polycaprolactone scaffolds with controlled pore structure using a rapid prototyping system, *Journal of Materials Science* 20, p. 229-234.
- Pena2008: Penã E, Penã JA, Doblare M, **2008**. On modelling nonlinear viscoelastic effects in ligaments, *Journal of Biomechanics* 41, p. 2659-2666.
- Petrigliano2006: Petrigliano FA, McAllister DR, Wu BM, **2006**. Tissue engineering for anterior cruciate ligament reconstruction: a review of current strategies, *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 22, p. 441-451.
- Pickett2009: Pickett AK, Sirtautas J, Erber A, **2009**. Braiding Simulation and Prediction of Mechanical Properties, *Applied composite materials* 1, p. 1-20.
- Pioletti1997: Pioletti DP, **1997**. Viscoelastic properties of soft tissues: Application to Knee Ligaments and Tendons, *PhD Thesis*, EPFL.
- Pioletti1999: Pioletti DP, Rakotomanana LR, Leyvraz P-F, **1999**. Strain rate effect on the mechanical behavior of the anterior cruciate ligament–bone complex, *Medical Engineering & Physics* 21, p. 95-100.
- Pioletti2000: Pioletti DP, Rakotomanana LR, **2000**. On the independence of time and strain effects in the stress relaxation of ligaments and tendons, *Journal of Biomechanics* 33, p. 1729-1732.
- Plaweski2011: Plaweski S, Grimaldi M, Courvoisier A, Wimsey S, **2011**. Intraoperative comparisons of knee kinematics of double-bundle versus single-bundle anterior cruciate ligament reconstruction, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, p. .
- Poellinger209: Poellinger A, Scheffler S, Hamm B, Asbach P, **2009**. Magnetic resonance imaging of double-bundle anterior cruciate ligament reconstruction, *Skeletal Radiology* 38, p. 309-315.
- Popinet2003: Popinet S, **2003**. Gerris: a tree-based adaptive solver for the incompressible Euler equations in complex

Bibliographie

geometries, *Journal of Computational Physics* 190(2), p. 572-600.

Porter2005: Porter B, Zael R, Stockman H, Guldberg R, Fyhrie D, **2005**. 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor, *Journal of Biomechanics* 38, p. 543-549.

Potluri2003: Potluri P, Rawal A, Rivaldi M, Porat I, **2003**. Geometrical modelling and control of a triaxial braiding machine for producing 3D preforms, *Composites part A: applied science and manufacturing* 34, p. 481-492.

Prendergast1997: Prendergast PJ, Huiskes R, Soballe K, **1997**. Biophysical stimuli on cells during tissue differentiation at implant interfaces, *Journal of Biomechanics* 30(6), p. 539-548.

Prendergast2007: Prendergast PJ, **2007**. Computational modelling of cell and tissue mechanoresponsiveness, *Gravitational and Space* 20(2), p. 43-50.

Provenzano2002: Provenzano PP, Heisey D, Hayashi K, Lakes R, Vanderby R, **2002**. Subfailure damage in ligament: a structural and cellular evaluation, *Journal of Applied Physiology* 92, p. 362-371.

Provenzano2002a: Provenzano PP, Lakes RS, Corr DT, Vanderby Jr R, **2002**. Application of nonlinear viscoelastic models to describe ligament behavior, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 1, p. 45-57.

Puk2005: Puk CK, Miller DJ, Gamradt S, Wu BM, McAllister DR, **2005**. The effects of short-term stimulation on fibroblast spreading in an in vitro 3D system, *Journal of biomedical materials research part A* 76(4), p. 665-673.

Raeber2008: Raeber GP, Lutolf MP, Hubbell JA, **2008**. Part II- Fibroblasts preferentially migrate in the direction of principal strain, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 7, p. 215-225.

Rainer2011: Rainer A, Giannitelli SM, Accoto D, De Porcellinis S, Guglielmelli E, Trombetta M, **2011**. Load-Adaptative Scaffold Architecturing: a Bioinspired Approach to the Design of Porous Additively Manufactured Scaffolds with Optimized Mechanical Properties, *Annals of Biomedical Engineering* , p. 1-10.

Rapaport2006: Rapaport A, Nishri B, Cibulski G, Method and apparatus for making intraluminal implants and construction particularly useful in such method and apparatus, 2006

Richardson1975: Richardson JL, **1975**. Multi-layer braided tubular membrane reinforcement, US patent n°3891556.

Rodrigues2011: Rodrigues CAV, Fernandes TG, Margarida Diogo M, Lobato da Silva C, Cabral JMS, **2011**. Stem cell cultivation in bioreactors, *Biotechnology Advances* 29, p. 815-829.

Saito2010: Saito E, Kang H, Taboas JM, Diggs A, Flanagan CL, Hollister SJ, **2010**. Experimental and computational characterization of designed and fabricated 50-50 PLGA porous scaffolds for human trabecular bone applications, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 21, p. 2371-2383.

Sandino2008: Sandino C, Planell JA, Lacroix D, **2008**. A finite element study of mechanical stimuli in scaffolds for bone tissue engineering, *Journal of Biomechanics* 41, p. 1005-1014.

Sandino2011: Sandino C, Lacroix D, **2011**. A dynamical study of the mechanical stimuli and tissue differentiation within a CaP scaffold based on micro-CT finite element models, *Biomechanics and Modeling in Mechanobiology* 10(4), p. 565-576.

Bibliographie

- Sanz-Herrera2009: Sanz-Herrera JA, Garcia-Aznar JM, Doblaré M, **2009**. On scaffold designing for bone regeneration: A computational multiscale approach, *Acta Biomaterialia* 5, p. 219-229.
- Sanz-Herrera2009a: Sanz-Herrera JA, Moreo P, Garcia-Aznar JM, Doblaré M, **2009**. On the effect of substrate curvature on cell mechanics, *Biomaterials* 30(34), p. 6674-6686.
- Sanz-Herrera2010: Sanz-Herrera JA, Doblaré M, Garcia-Aznar JM, **2010**. Scaffold microarchitecture determines internal bone directional growth structure: A numerical study, *Journal of Biomechanics* 43, p. 2480-2486.
- Sekiguchi2001: Sekiguchi H, Han J, Ryu J, Han C, **2001**. The characterization of mechanical properties of a rabbit femur-anterior cruciate ligament: tibia complex during cyclic loading, *JSME International Journal* 44, p. 276-281.
- Sengers2007: Sengers BG, Taylor M, Please CP, Oreffo ROC, **2007**. Computational modelling of cell spreading and tissue regeneration in porous scaffolds, *Biomaterials* 28, p. 1926-1940.
- Shen2007: Shen W, Jordan S, Fu F, **2007**. Review article- Anatomic double bundle anterior cruciate ligament reconstruction, *Journal of Orthopaedic Surgery* 15, p. 216-221.
- Silva2006: Silva MMCG, Cyster LA, Barry JJA, Yang XB, Oreffo ROC, Grant DM, Scotchfor CA, Howdle SM, Shakesheff KM, Rose FRAJ, **2006**. The effect of anisotropic architecture on cell and tissue infiltration into tissue engineering scaffolds, *Biomaterials* 27, p. 5909-5917.
- Simoes2009: Simoes CL, Viana JC, Cunha AM, **2009**. Mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone) and poly(lactic acid) blends, *Journal of applied polymer science* 112, p. 345-352.
- Sinoimeri2009: Sinoimeri A, **2009**. Friction in textile fibers and its role in fiber processing, *Wear* 267, p. 1619-1624.
- Smith1966: Smith JW, **1966**. The elastic properties of the anterior cruciate ligament of the rabbit, *Journal of Anatomy* 88, p. 369-380.
- Smith2009: Smith PA, Lubowitz JH, **2009**. No-Tunnel Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Retroconstruction: The All-Inside x 2 Technique, *Operative Techniques in Sports Medecine* 17(1), p. 62-68.
- Stops2008: Stops AJF, MacMahon LA, O'Mahoney D, Prendergast P, McHugh PE, **2008**. A Finite Element Prediction of Strain on Cells in a Highly Porous Collagen-Glycosaminoglycan Scaffold, *Journal of Biomechanical Engineering* 130, p. 061001-1-061001-11.
- Stops2010: Stops AJF, Harrison NM, Haugh MG, O'Brien FJ, McHugh PE, **2010**. Local and regional mechanical characterisation of a collagen-glycosaminoglycan scaffold using high-resolution finite element analysis, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* 3, p. 292-302.
- Stops2010a: Stops AJF, Heraty KB, Browne M, O'Brien FJ, McHugh PE, **2010**. A prediction of cell differentiation and proliferation within a collagen-glycosaminoglycan scaffold subjected to mechanical strain and perfusive fluid flow, *Journal of Biomechanics* 43, p. 618-626.
- Sudarmadji2011: Sudarmadji N, Tan JY, Leong KF, Chua CK, YLoh YT, **2011**. Investigation of the mechanical properties and porosity relationships in selective laser-sintered polyhedral for functionally graded scaffolds, *Acta Biomaterialia* 7, p. 530-537.

Bibliographie

Sun2004: Sun X, Sun C, **2004**. Mechanical properties of three-dimensional braided composites, *Composite Structures* 65, p. 485-492.

Sun2005: Sun W, Starly B, Nam J, Darling A, **2005**. Bio-CAD modeling and its applications in computer-aided tissue engineering, *Computer-aided Design* 37, p. 1097-1114.

Takai1993: Takai S, Woo SL-Y, Livesay GA, Adams DJ, Fu FH, **1993**. Determination of the In Situ Loads on the Human Anterior Cruciate Ligament, *Journal of Orthopaedic Surgery* 11, p. 686-695.

Tetsunaga2009: Tetsunaga T, Furumatsu T, Abe N, Nishida K, Naruse K, Ozaki T, **2009**. Mechanical stretch stimulates integrin α V β 3-mediated collagen expression in human anterior cruciate ligament cells, *Journal of biomechanics* 42, p. 2097-2103.

Toutoungi2000: Toutoungi DE, Lu TW, Leardini A, Catani F, O'Connor JJ, **2000**. Cruciate ligament forces in the human knee during rehabilitation exercises, *Clinical Biomechanics* 15, p. 176-187.

Tritz2010: Tritz J, Rahouadj R, de Isla N, Charif N, Pinzano A, Mainard D, Bensoussan D, Netter P, Stoltz J-F, Benkirane-Jessel N, Huselstein C, **2010**. Designing a three-dimensional alginate hydrogel by spraying method for cartilage tissue engineering, *Soft Matter* 6, p. 5165-5174.

Tsang2004: Tsang VL, Bhatia SN, **2004**. Three-dimensional tissue fabrication, *Advanced Drug Delivery Reviews* 56, p. 1635-1647.

Unwin2010: Unwin A, **2010**. What's new in anterior cruciate ligament surgery?, *Orthopaedics and trauma* 24(2), p. 100-106.

Vaquette2010: Vaquette C, Kahn C, Frochot C, Nouvel C, Six J-L, De Isla N, Luo L-H, Cooper-White J, Rahouadj R, Wang X, **2010**. Aligned poly(L-lactic-co- ϵ -caprolactone) electrospun microfibers and knitted structure: A novel composite scaffold for ligament tissue engineering, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* 94(4), p. 1270-1282.

Viateau2011: Viateau V, Zhou J, Guérard S, Manassero M, Thourot M, Anagnostou F, Mitton D, Brulez B, Migonney V, **2011**. Ligart: ligament synthétique « bioactif » et « biointégrable » permettant la réhabilitation rapide du patient: greffage chimique, évaluations biologiques in vivo, expérimentation animale, étude préclinique, *IRBM* 32, p. 118-122.

Vieira2009: Vieira AC, Guedes RM, Marques AT, **2009**. Development of ligament tissue biodegradable devices: A review, *Journal of biomechanics* 42, p. 2421-2430.

Vilay2009: Vilay V, Mariatti M, Zulkifli Ahmad, Pasomsouk K, Mitsugu Todo, **2009**. Characterization of the Mechanical and Thermal Properties and Morphological Behavior of Biodegradable Poly(L-lactide)/Poly(ϵ -caprolactone) and Poly(L-lactide)/Poly(butylene succinate-co-L-lactate) Polymeric Blends, *Journal of Applied Polymer Science* 114, p. 1784-1792.

Voronov2010: Voronov R, VanGordon S, Sikavitsas VI, Papavassiliou DV, **2010**. Computational modeling off flow-induced shear stresses within 3D salt-leached porous scaffolds imaged via micro-CT, *Journal of Biomechanics* 43, p. 1279-1286.

Vunjak-Novakovic2004: Vunjak-Novakovic G, Altman G, Horan K, Kaplan DL, **2004**. Tissue Engineering of Ligaments, *Annual Review of Biomedical Engineering* 6, p. 131-156.

Bibliographie

- Wang1995: Wang Y-Q, Wang ASD, **1995**. Microstructure-property relationships in three-dimensional braided fiber composites, *Composite science and technology* 53, p. 213-222.
- Wang2001: Wang Y, Sun X, **2001**. Digital-element simulation of textile processes, *Composites Science and Technology* 61, p. 311-319.
- Wang2005: Wang JH-C, Yang G, Li Z, **2005**. Controlling Cell Responses to Cyclic Mechanical Stretching, *Annals of Biomedical Engineering* 33, p. 337-342.
- Wascher1993: Wascher DC, Markolf KL, Shapiro MPS, Finerman GAM, **1993**. Direct in Vitro Measurement of Forces in the Cruciate Ligaments, part I: The effect of multiplane loading in the intact knee, *The Journal of Bone and Joint Surgery* 75, p. 377-386.
- Watanabe2000: Watanabe H, Fujie H, Mabuchi K, Tsukamoto Y, Itoman M, **2000**. Force distribution within the human anterior cruciate ligament: biomechanical measurement using a robotic system, *Kitasato Medicine* 30, p. 88-95.
- Webb2006: Webb K, Hitchcock RW, Smeal RM, Li W, Gray SD, Tresco PA, **2006**. Cyclic strain increases fibroblast proliferation, matrix accumulation, and elastic modulus of fibroblast-seeded polyurethane constructs, *Journal of Biomechanics* 39, p. 1136-1144.
- Woo1999: Woo SL-Y, Debski RE, Withrow JD, Janaushek MA, **1999**. Biomechanics of Knee Ligaments, *The american journal of sports medicine* 27(4), p. 533-543.
- Woo2006: Woo SL-Y, Abramowitch SD, Kilger R, Liang R, **2006**. Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair, *Journal of Biomechanics* 39, p. 1-20.
- Wren2003: Wren TAL, Lindsey DP, Beaupré GS, Carter DR, **2003**. Effects of Creep and Cyclic Loading on the Mechanical Properties and Failure of Human Achilles Tendons, *Annals of Biomedical Engineering* 31, p. 710-717.
- Yasuda2009: Yasuda K, Kitamura N, Kondo E, Hayashi R, Inoue M, **2009**. One-stage anatomic double-bundle anterior and posterior cruciate ligament reconstruction using the autogenous hamstring tendons, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 17, p. 800-805.
- Yasuda2010: Yasuda K, Tanabe Y, Kondo E, Kitamura N, Tohyama H, **2010**. Anatomic Double-Bundle Anterior Cruciate Ligament Reconstruction, *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery* 26, p. S21-S34.
- Yeong2004: Yeong W-Y, Chua C-K, Leong K-F, Chandrasekaran M, **2004**. Rapid prototyping in tissue engineering: challenges and potential, *Trends in biotechnology* 22(12), p. 643-652.
- Zantop2006: Zantop T, Petersen W, Sekiya JK, Musahl V, Fu FH, **2006**. Anterior cruciate ligament anatomy and function relating to anatomical reconstruction, *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy* 14, p. 982-992.
- Zantop2007: Zantop T, Schumacher T, Diermann N, Schanz S, Raschke MJ, Petersen W, **2007**. Anterolateral rotational knee instability: role of posterolateral structures, *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery* 127, p. 743-752.
- Zhang1999: Zhang Q, Beale D, Broughton RM, **1999**. Analysis of circular braiding process, part 1: Theoretical investigation of kinematics of the circular braiding process, *Journal of Manufacturing Science and Engineering, Transactions of the ASME* 121, p. 345-350.

Bibliographie

Zhang1999a: Zhang Q, Beale D, Broughton RM, Adanur S, **1999**. Analysis of circular braiding process, part 2: Mechanics analysis of the circular braiding process and experiment, *Journal of Manufacturing Science and Engineering, Transactions of the ASME* 121, p. 351-357.

Annexes

| | |
|--|-----|
| Annexes..... | 219 |
| Annexe 1 : Comportement mécanique des fibres de PLCL..... | 220 |
| Annexe 2 : Détermination empirique du pas de tressage..... | 225 |
| Annexe 3 : Protocole de mise en culture dans le bioréacteur..... | 229 |

Annexe 1 : Comportement mécanique des fibres de PLCL

Effet de la vitesse d'allongement sur le comportement des fibres de PLCL

Des essais de traction ont été réalisés sur des fibres de PLCL (N=12) à quatre vitesses d'allongement : les résultats des modules d'élasticité correspondant sont rapportés dans le Tableau 1. Les réponses typiques en traction pour les trois copolymères sont représentées ci-dessous (Illustration 1). Nous constatons que la vitesse d'allongement présente un effet significatif sur les réponses obtenues : le module d'élasticité augmente en effet notablement avec la vitesse d'allongement. Dans le cas du P(LL70/CL30) à une vitesse de 0,01 mm/s, aucune donnée n'a été rapportée du fait du trop faible effort résultant. Nous pouvons observer (Illustration 1) que la déformation à rupture du P(LL97/CL3) diminue fortement lorsque la vitesse d'allongement augmente.

| | P(LL97/CL3) | P(LL85/CL15) | P(LL70/CL30) |
|-----------|----------------|---------------|--------------|
| 0,01 mm/s | 680,1 ± 31,3 | 273,3 ± 14,4 | - |
| 0,1 mm/s | 1006,2 ± 116,8 | 762,6 ± 23,7 | 96,2 ± 12,6 |
| 1 mm/s | 1091,2 ± 143,2 | 984,9 ± 27,1 | 394,2 ± 5,2 |
| 5 mm/s | 1179,6 ± 91,9 | 1008,5 ± 24,3 | 532,2 ± 19,6 |

Tableau 1: Effet de la vitesse d'allongement sur le module d'élasticité en MPa des fibres de P(LL70/CL30), de P(LL85/CL15 et de P(LL97/CL3).

Post-cristallisation des fibres de PLCL

L'effet de post-cristallisation rapporté dans la littérature a été étudié en effectuant des essais de traction (N=12) à 1 mm/s sur les fibres de PLCL (N=12) et après les avoir laissé reposer à température ambiante. Les résultats de cette étude sont donnés Tableau 2 : on observe en effet que le module d'élasticité des fibres augmente avec le temps de vieillissement, ce qui peut être attribué à cet effet de post-cristallisation. Nous pouvons observer que cet effet est d'autant plus prononcé que la proportion de PCL dans le copolymère est importante : ceci peut s'expliquer par le fait que la cristallinité du PLCL est d'autant plus faible que la proportion de PCL dans le copolymère est importante, et ces polymères sont donc plus sujets à cristalliser. À titre illustratif, les réponses typiques des fibres de P(LL70/CL30) en fonction du temps de vieillissement à température ambiante ont été représenté Illustration 2.

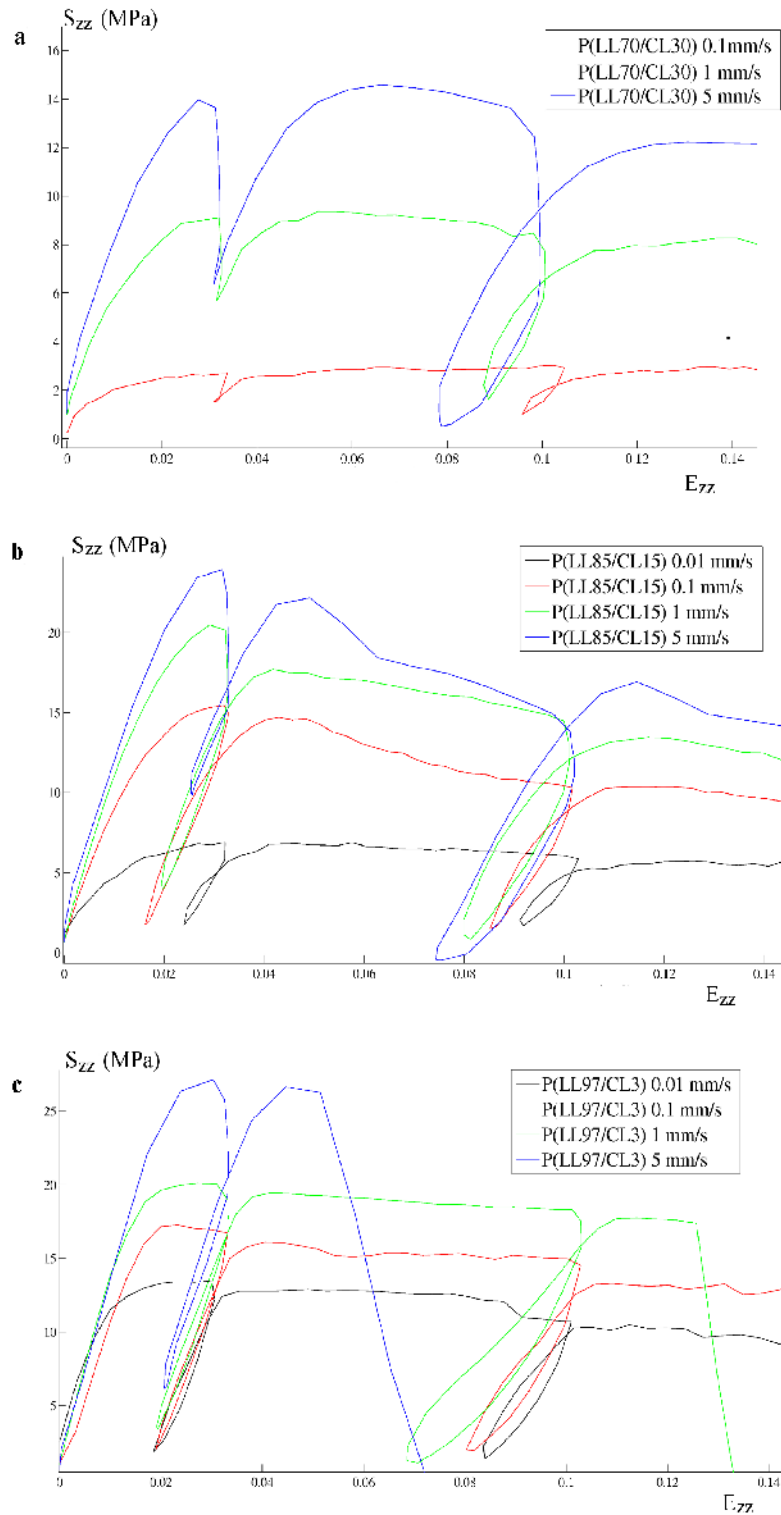


Illustration 1: Effet de la vitesse d'allongement sur la réponse en traction des fibres de (a) P(LL70/CL30) (b) P(LL85/CL15) (c) P(LL97/CL3).

| | P(LL97/CL3) | P(LL85/CL15) | P(LL70/CL30) |
|-----------|----------------|---------------|--------------|
| Semaine 1 | 1091,2 ± 104,8 | 984,9 ± 7,5 | 394,2 ± 5,2 |
| Semaine 2 | 1149,9 ± 100,3 | 1013,1 ± 34,6 | 496,6 ± 2,1 |
| Semaine 3 | 1172,6 ± 53,4 | 1140,3 ± 46,3 | 508,9 ± 15,5 |
| Semaine 8 | 1284,1 ± 24,4 | 1256,3 ± 26,8 | 544,4 ± 26,4 |

Tableau 2: Effet du temps de vieillissement à température ambiante sur le module d'élasticité en MPa des fibres de PLCL.

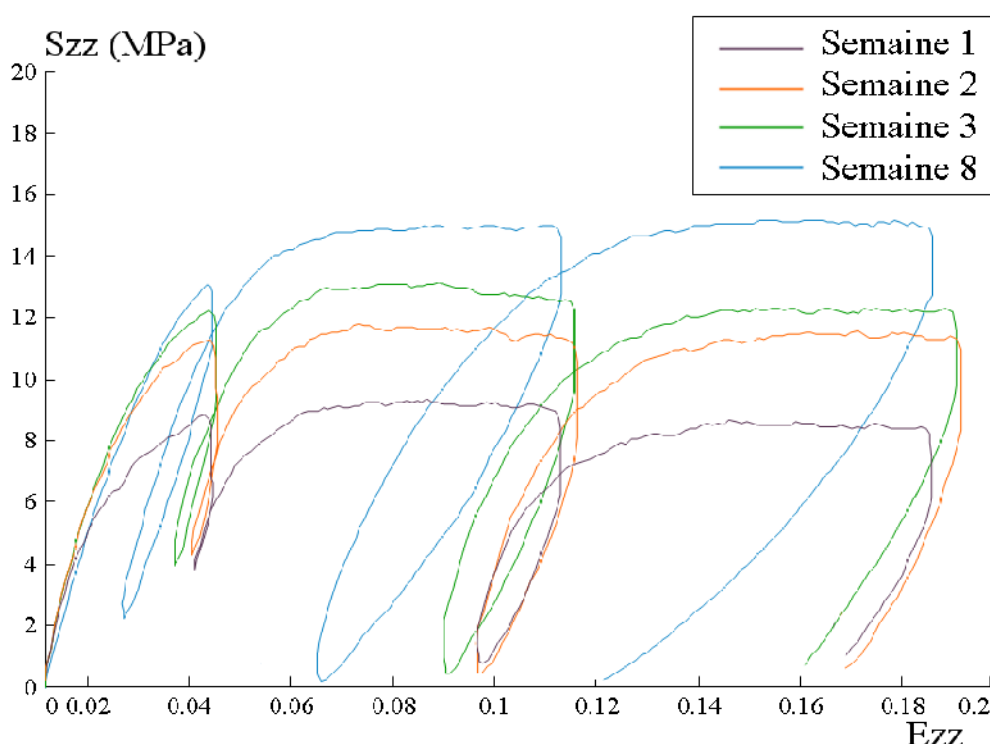


Illustration 2: Effet du temps de vieillissement à température ambiante pour le P(LL70/CL30).

Dans un second temps, des fibres de P(LL85/CL15) ont été conservées au congélateur à -18°C immédiatement après leur extrusion. Des essais de traction ont été réalisés ($N=12$) deux et cinq semaines après l'extrusion, et les réponses typiques des fibres ont été représentées Illustration 3. Aucun effet significatif n'a été décelé entre les fibres testées deux et cinq semaines après extrusion ; il en a été conclu que la conservation à -18°C annulait l'effet de post-cristallisation des fibres de PLCL.

Au passage, nous noterons que, lors de ces caractérisations, plusieurs relaxations ont été

réalisées, à la vitesse d'allongement utilisée pour le reste de l'essai. Nous pouvons alors clairement des effets d'hystérésis dus à la relaxation des fibres de PLCL.

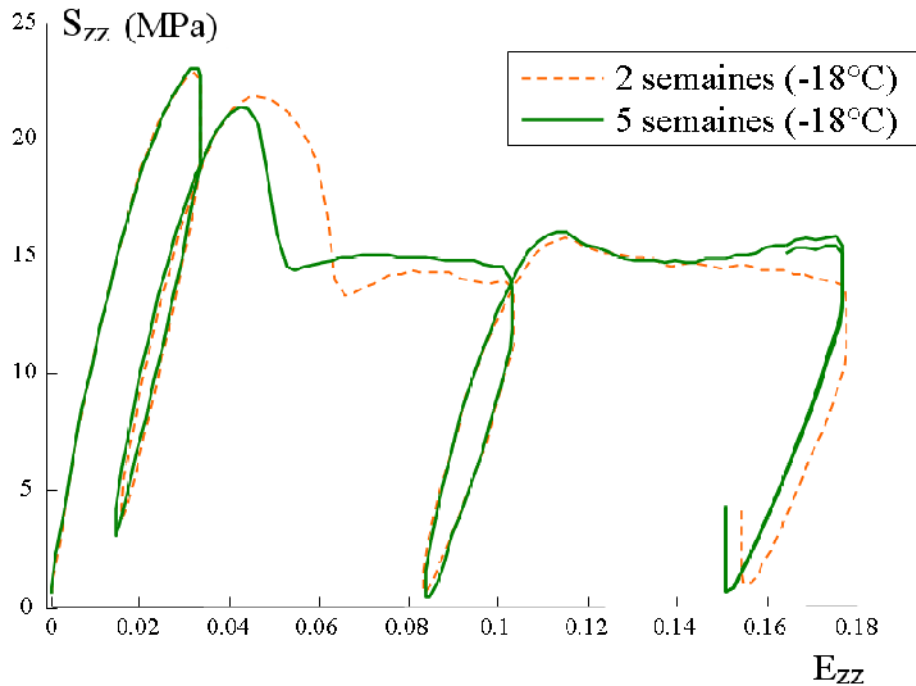


Illustration 3: Réponse typique des fibres de P(LL85/CL15) conservées à -18°C deux et cinq semaines.

Relaxation des fibres de PLCL

Des essais de relaxation de contraintes ont été effectués avec des fibres ($N=6$) de P(LL85/CL15) d'une longueur initiale (entre les mors) de 30 mm. Des allongements de 0,5 et 0,6 mm ont été imposés (soit 1,6 et 2%) et maintenus pendant 300 s, et l'évolution des contraintes a été enregistrée. Une courbe de relaxation typique des fibres de P(LL85/CL15) a été représentée Illustration 4. Nous pouvons observer que les contraintes sont relaxées de 52% pendant les 10 premières secondes, de 71% après une minute et de 85% après 300 s. Les phénomènes de relaxation de contrainte dans les fibres de PLCL sont donc prononcés.

Néanmoins, nous rappellerons qu'il est difficile, à partir de ces résultats obtenus sur une seule fibre, de dresser des conclusions sur le comportement en relaxation de la matrice tressée. En effet, il est probable que les interactions entre les différentes fibres de la structure aient un effet significatif sur les propriétés viscoélastiques de l'ensemble.

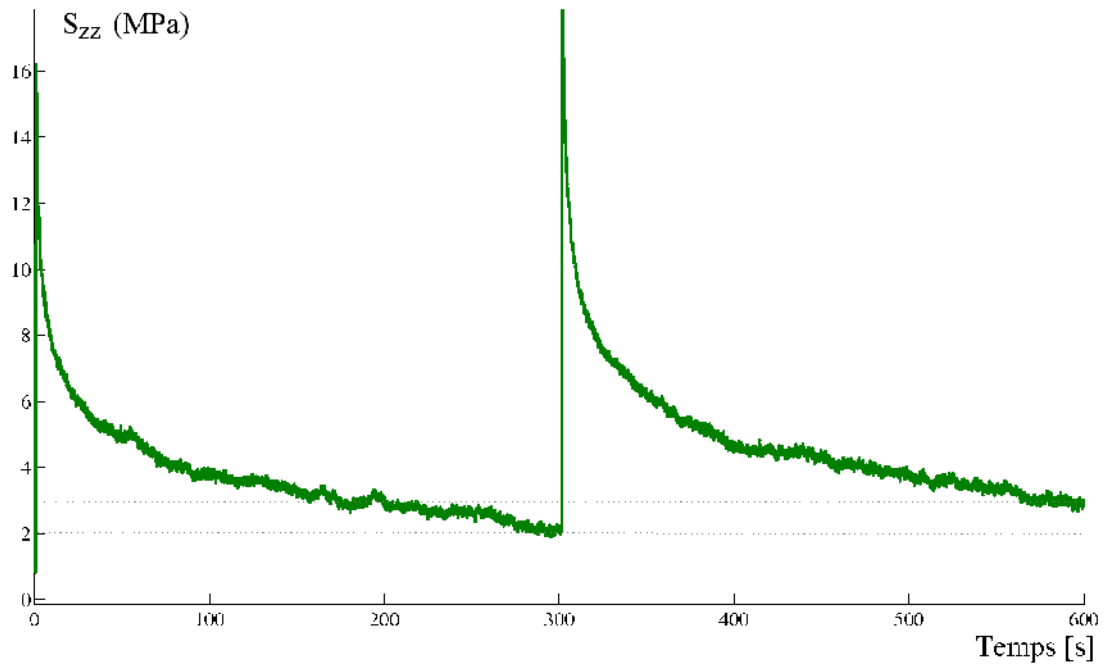


Illustration 4: Évolution au cours du temps de la contrainte dans des fibres de P(LL85/CL15) pour des déformations totales imposées de 1.6 et 2%.

Annexe 2 : Détermination empirique du pas de tressage

Le pas de tressage P est défini comme la distance axiale correspondant à un tour complet d'une fibre au sein de la tresse (Illustration 5).

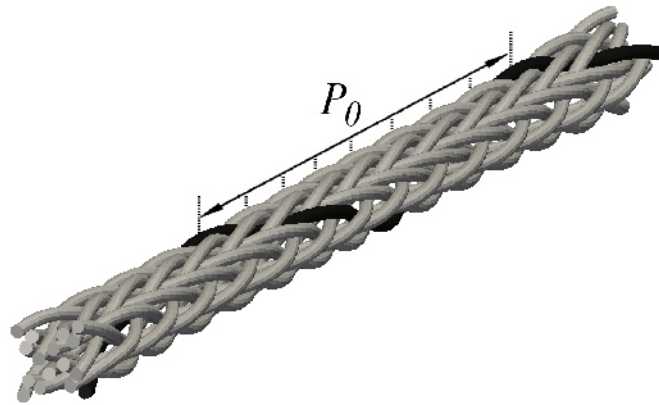


Illustration 5: Définition du pas de tressage P_0 .

Le pas est clairement corrélé à l'angle de tressage α qui peut être modifié en faisant varier la hauteur h séparant les deux plateaux du dispositif de tressage (Illustration 6). Nous appellerons P_0 le pas de tressage de la première couche, qui dépend du paramètre h et du diamètre de fibre d_{fibre} , et qui est relié à l'angle α' réel qu'effectuent les fibres à l'intérieur de la tresse. La relation qui lie α à α'

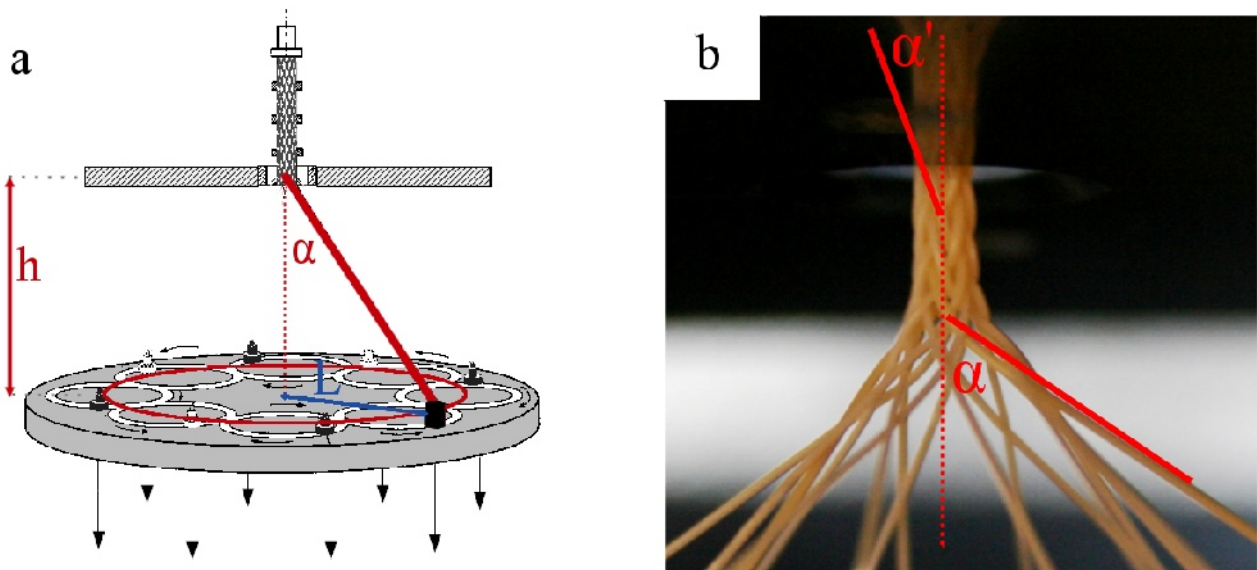


Illustration 6: Définition de l'angle de tressage α (a) sur le dispositif de tressage et (b) sur la tresse en cours de fabrication.

n'est pas triviale, et elle fait notamment intervenir le coefficient de frottement entre les fibres [Zhang1999], coefficient qu'il est difficile d'estimer.

Nous appellerons P_i le pas de tressage de la couche i pour $i > 1$, les couches étant numérotées du centre à la périphérie de la tresse. Lorsque le nombre de couches augmente, les fibres doivent s'enrouler sur un diamètre croissant à partir du même angle α , et P_i est donc en général supérieur à P_0 .

Pour estimer le pas P_0 en fonction des paramètres h et d_{fibre} , nous avons opté pour une démarche expérimentale. Des fibres de nylon de différents diamètres (180, 220, 260 et 300 μm) ont été choisies en raison de leur diamètre connu et homogène. Le pas de tressage a été déterminé en mesurant manuellement ($N=4$) la distance qui sépare huit cycles de la tresse (Illustration 5) : une démarche plus précise faisant intervenir une technique d'imagerie n'a en effet pas été jugée nécessaire. L'évolution de P_0 en fonction de h et pour plusieurs diamètres de fibres d_{fibre} est représenté Illustration 7.

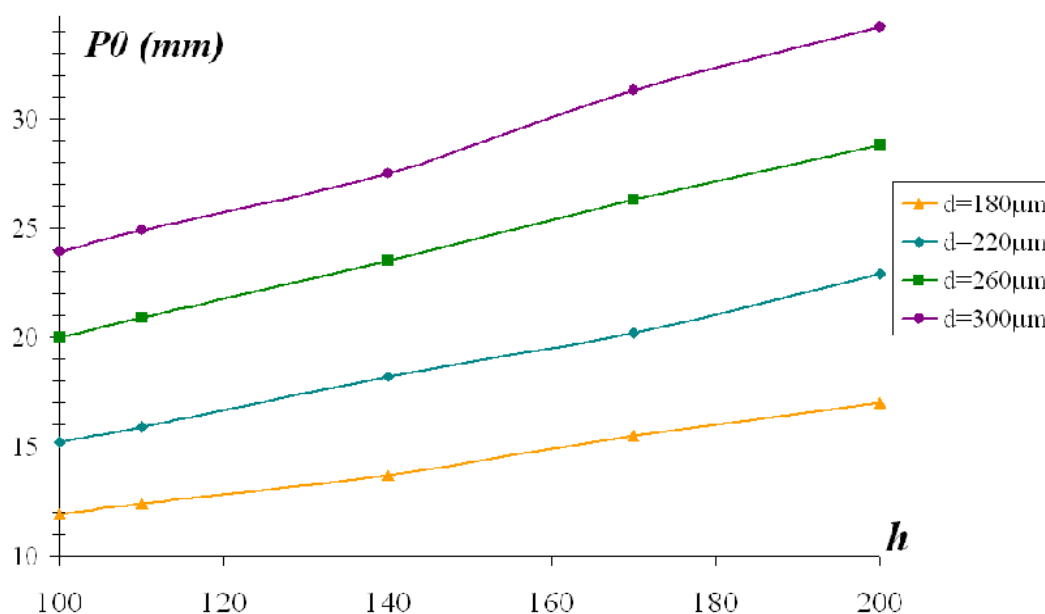


Illustration 7: Variation du pas P_0 en fonction de la hauteur h séparant les deux plateaux du dispositif de tressage et pour différents diamètres de fibres.

L'évolution de P_0 en fonction de h et d_{fibre} montre une tendance linéaire en h pour d_{fibre} fixé et en d_{fibre} pour h fixé. Une interaction entre les deux paramètres est également observée : la pente de P_0 (h) varie en fonction de d_{fibre} . La fonction $P_0(h, d_{\text{fibre}})$ a donc été approchée par une fonction linéaire à deux paramètres avec une interaction :

$$P_0(h, d_{\text{fibre}}) = C_1 + C_2 d_{\text{fibre}} + C_3 h + C_4 h d_{\text{fibre}} \quad (7)$$

Les quatre coefficients C_1 , C_2 , C_3 et C_4 ont été déterminés en calculant la surface des moindres carrés représentée Illustration 9. On obtient $C_1 = -4,44$ mm, $C_2 = 58,90 \cdot 10^{-3}$, $C_3 = -0,02$ et $C_4 = 0,42 \cdot 10^{-3}$ mm⁻¹, et le coefficient de détermination R^2 de cette régression vaut 0,99.

Dans un deuxième temps, une seconde démarche expérimentale a été entreprise de manière à déterminer la manière dont évolue $P_i - P_0$ en fonction de la couche i . Il a été observé que la fonction $P_i - P_0$ ne dépendait pas significativement du paramètre h , mais uniquement du paramètre d_{fibre} . Pour les quatre différents diamètres de fibres, des tresses multicouche ont été fabriquées en mesurant à quatre reprises la quantité $P_i - P_0$ avant le tressage de chaque nouvelle couche, pour h fixé. Les résultats de ces expériences sont représentés Illustration 8.

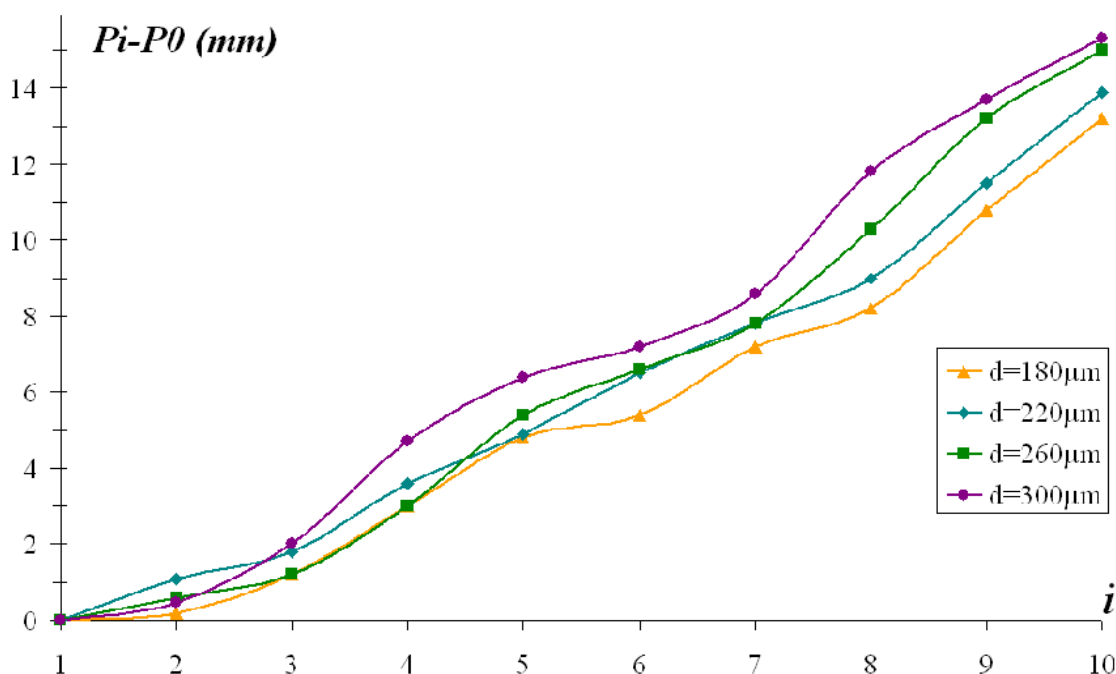


Illustration 8: Variation du pas $P_i - P_0$ en fonction du nombre de couches pour différents diamètres de fibres et pour h fixé.

L'évolution de $P_i - P_0$ en fonction du nombre de couches et de d_{fibre} a été modélisée sous la forme d'une fonction similaire à la précédente, en ajoutant un terme quadratique en fonction du nombre de couches i :

$$P_i - P_0(h, d_{\text{fibre}}) = C_5 + C_6 i + C_7 i^2 + C_8 d_{\text{fibre}} + C_9 d_{\text{fibre}} i \quad (8)$$

Les cinq coefficients C_5 , C_6 , C_7 , C_8 et C_9 ont été déterminés en calculant la surface des moindres carrés représentée Illustration 9. On obtient $C_5 = -0,43$ mm, $C_6 = 0,14$ mm, $C_7 = 0,07$ mm, $C_8 = -2,84 \cdot 10^{-3}$ et $C_9 = 2,85 \cdot 10^{-3}$, et le coefficient de détermination R^2 de cette régression vaut 0,99.

Au final, nous pouvons donc formuler le pas de tressage de la couche i sous la forme suivante :

$$P_i = [(C_1 + C_5) (C_2 + C_8) C_3 C_4 C_6 C_7 C_9]^T [1 d_{\text{fibre}} h (h d_{\text{fibre}}) i i^2 (d_{\text{fibre}} i)] \quad (9)$$

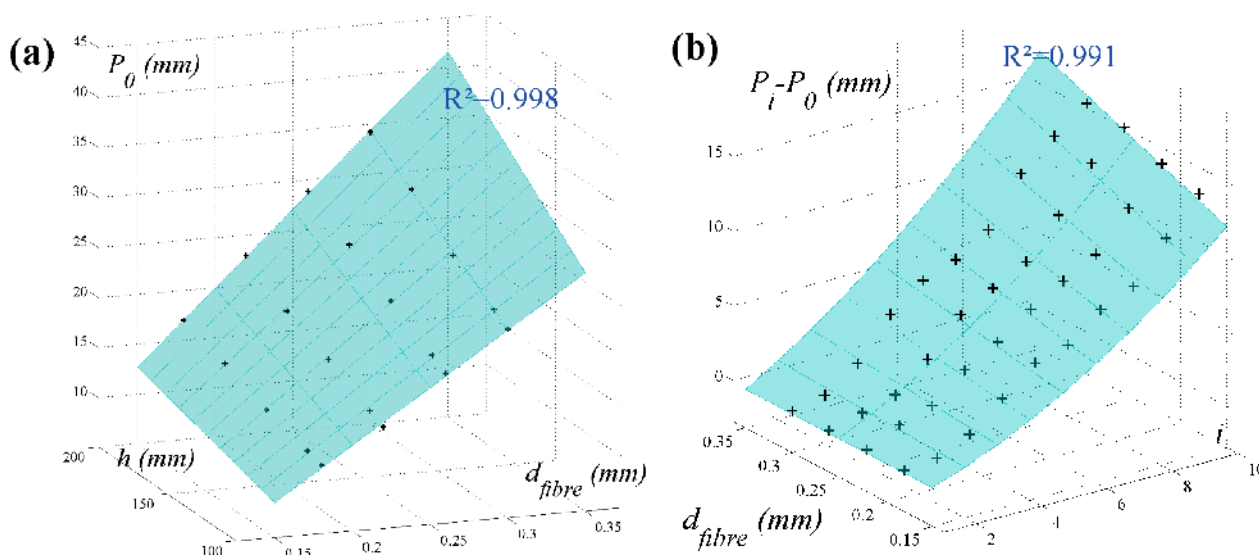


Illustration 9: Surfaces des moindres carrés utilisées pour modéliser (a) le pas de tressage initial P_0 de la première couche (b) l'évolution du pas de tressage en fonction du nombre de couches.

Cette loi empirique est utilisée pour prédire le pas de tressage de chaque couche de la matrice de support. Elle pourrait être soumise par la suite à des améliorations en prenant en compte davantage de paramètres selon un plan d'expériences plus important, et en particulier en considérant un paramètre supplémentaire représentant le coefficient de frottement des fibres utilisées. Cependant, nous rappellerons que sa validité se limite au prototype de tresseuse développé dans le cadre de ce travail, qui sera amené par la suite à être remplacé par un matériel automatisé pour permettre la fabrication d'une plus grande quantité d'échantillons.

Annexe 3 : Protocole de mise en culture dans le bioréacteur

Sterilisation

Autoclavage

- Chambres 9
- Axes 3
- Vis de fixation des mors 10 et 15
- Mors haut 11 et mors bas 16
- Joint 18 et fenêtre de la chambre 19
- Vis de fixation de la fenêtre de la chambre 17
- Pré-tensionneurs 5 et vis de fixation 4 et 8
- Tubulures jaune 21 et transparente 22
- Raccords en Y 23
- Erlenmeyers 25
- Pipettes 26 et bouchons 27
- Raccords 13 et bouchons 14
- 2 Pincés pour le montage de la matrice dans les mors 10 et 15
- Clé 6 pans inox pour le serrage des vis de fixation des mors 10 et 15

Alcool + Uvs (30 minutes immersion dans l'alcool + 30 minutes UVs)

- Matrice de support 12
- Capuchons d'étanchéité 7
- Élastiques 6

Ensemencement

Sous la hotte

- Monter les axes 1 dans les chambres 9
- Placer les capuchons d'étanchéité 7 et les élastiques 6
- Monter la matrice de support 12 dans les mors haut et bas 11 et 16 avec les pincés, et serrez les vis de fixation 10 et 15 avec la clé 6 pans
- Tendre légèrement la matrice (par exemple par le simple poids de l'axe 1), puis montez le pré-tensionneur 5 avec les vis 4 et 8.
- Placer les raccords 13 avec un film de téflon, puis placer les bouchons 14
- Déposer une suspension de cellules sur la matrice
- Placer le joint 18 et la fenêtre 19 et serrer les vis 17

- Placer la chambre 30 minutes à l'incubateur pour permettre l'adhésion cellulaire
En parallèle: allumer la régulation en température de la chambre

Alimentation des chambres

Sous la hotte

- Remplir chaque erlenmeyer de 500 mL de milieu complet, complété avec de l'ascorbate-2-phosphate à 100 µg/mL, et de l'HEPES à 25 mM.
- Monter les bouchons 27 sur les erlenmeyers 25
- Monter les quatre pipettes 26
- Mettre des filtres 22 µm sur deux des quatre pipettes 26 pour les arrivées 28 et 29 (deux filtres par erlenmeyer)
- Placer les pinces 24 sur chaque tubulure 22
- Enlever les bouchons 14 et brancher les tubulures 22

Montage des chambres

- Déplacer les chambres et les erlenmeyers dans l'enceinte de la chambre
- Placer les brides 2 et les vis 1 sur les arbres 3
- Placer les chambres sur le bioréacteur, puis remonter et serrer les brides 2
- Retirer les pré-tensionneurs 5
- Placer les tubes 21 sous les cassettes de la pompe 20
- Brancher les trois arrivées de gaz 29 sur les filtres des trois erlenmeyers 25
- Remplir les chambres en fermant les pinces du circuit retour et en mettant la pompe en fonctionnement
- Ouvrir le circuit retour et descendre les erlenmeyers pour remplir les tubulures du circuit retour

Nomenclature

1. Vis de fixation de la bride 2
2. Bride
3. Axe de la chambre 9
4. Vis de fixation du pré-tensionneur 5 sur l'arbre 3
5. Pré-tensionneur
6. Elastique de maintien du joint d'étanchéité 7
7. Joint d'étanchéité
8. Vis de fixation du pré-tensionneur 5 sur la chambre 9
9. Chambre
10. Vis de fixation de la matrice 12 dans le mors haut 11
11. Mors haut
12. Matrice de support

13. Raccord d'alimentation de la chambre 9
14. Bouchon pour le raccord 13
15. Vis de fixation de la matrice 12 dans le mors haut 16
16. Mors bas
17. Vis de fixation du joint 18 et de la fenêtre 19 sur la chambre 9
18. Joint d'étanchéité entre la fenêtre 19 et la chambre 9
19. Fenêtre de la chambre 9
20. Pompe péristaltique
21. Tubulures de type I pour le passage sous les cassettes de la pompe 20
22. Tubulures de type II pour tout le reste de l'alimentation
23. Raccords en Y
24. Pincés coupe-circuit
25. Erlenmeyers
26. Pipettes
27. Bouchons des erlenmeyers 25
28. Filtre 22 μm pour l'échappement des gaz vers l'extérieur
29. Alimentation en gaz *via* un filtre 22 μm

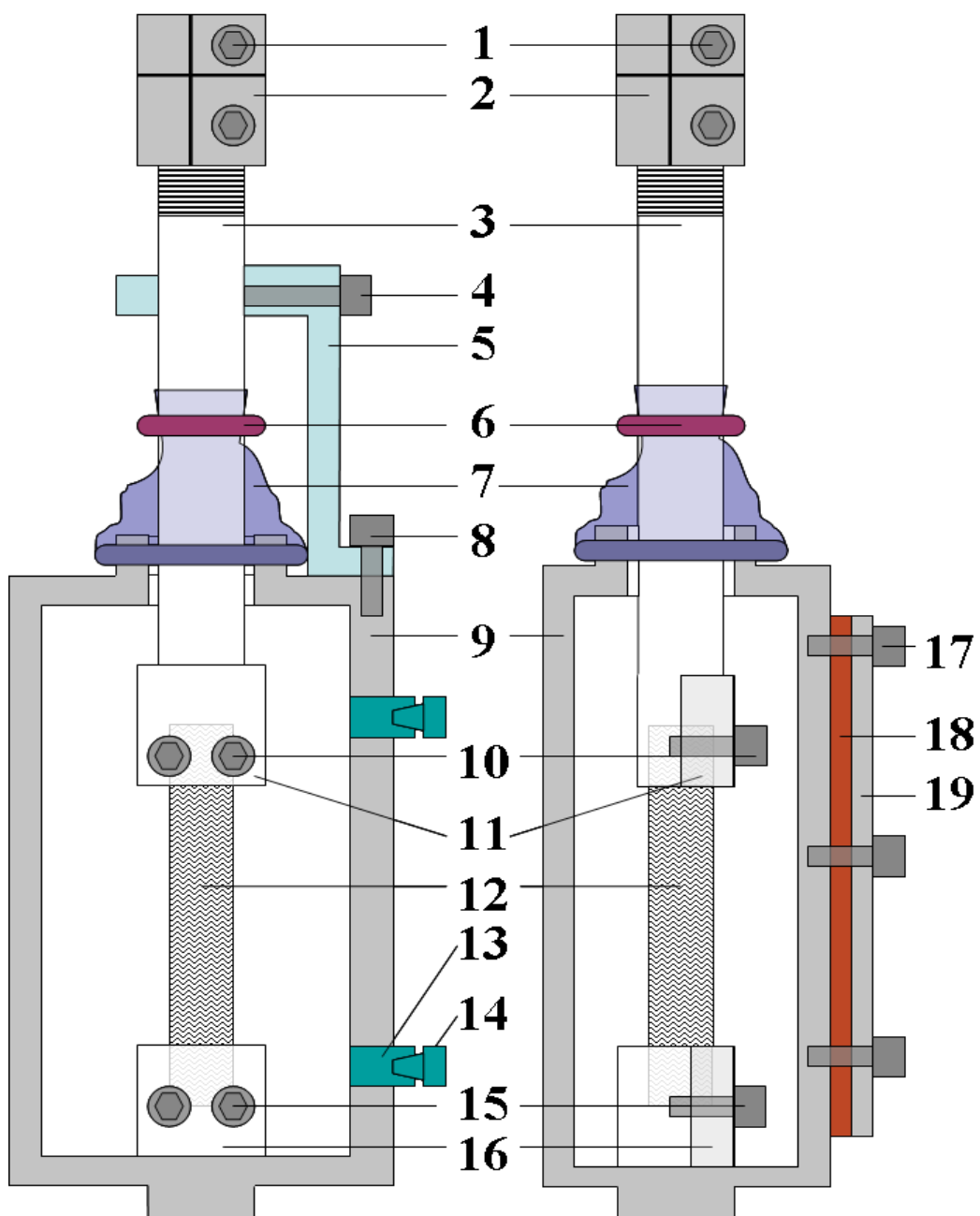


Illustration 10: Schéma des chambres du bioréacteur.

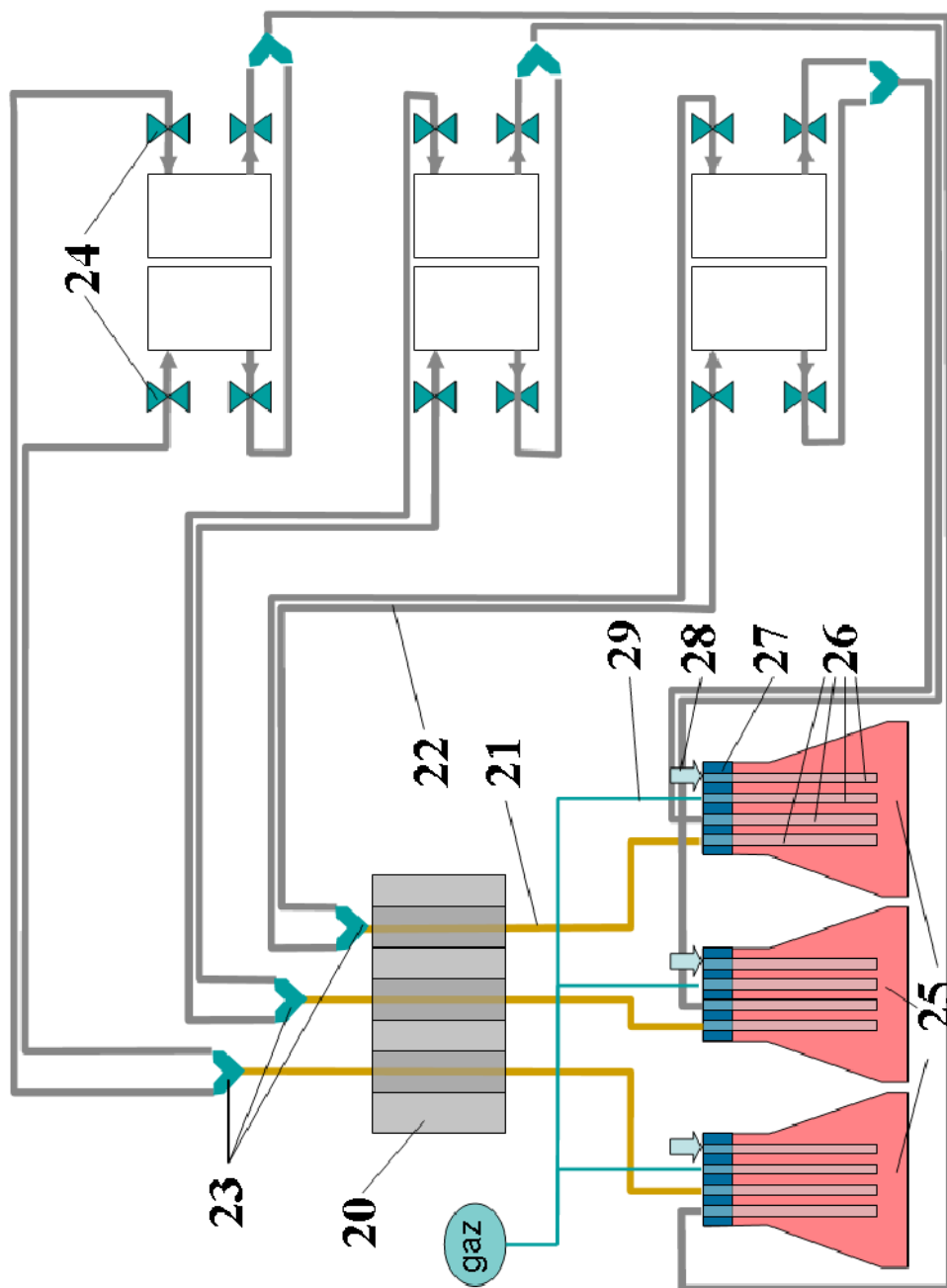


Illustration 11: Schéma hydraulique de l'alimentation des chambres du bioréacteur.

LABORATOIRE DE BIOMECHANIQUE EN ORTHOPEDIE

EPFL/ST/BI/L_BO
Station n° 19
CH-1015 Lausanne
Suisse

Téléphone : +41 21 693 33 41
Fax : +41 21 693 36 63
E-mail : dominique.pioletti@epfl.ch
Site web : www.epfl.ch



ÉCOLE POLYTECHNIQUE
FÉDÉRALE DE LAUSANNE

Université de Lorraine
Service des Doctorants
Campus Univ. Victor Grignard
B.P. 239
54506 Vandoeuvre-lès-Nancy
cedex
France

Lausanne, le 6 juillet 2012

Rapport de thèse

Candidat: Cédric LAURENT

Titre: Vers un nouveau biosubstitut pour l'ingénierie tissulaire du ligament croisé antérieur.

Rapporteur: Prof. Dominique P. PIOLETTI

Commentaires généraux

La thèse présente, avec une progression linéaire et logique, les étapes pour le développement d'un substitut artificiel de remplacement d'un ligament croisé antérieur. En partant d'une revue de la littérature très exhaustive, un cahier des charges est proposé pour définir les propriétés que devraient avoir ce substitut. La mise en œuvre expérimentale pour la fabrication du substitut en se basant principalement sur des techniques de tissage est ensuite proposée. Cette technique débouche sur la nécessité de pouvoir modéliser et ainsi anticiper les propriétés du futur substitut afin d'optimiser au mieux les propriétés recherchées, en particulier mécaniques. Finalement, une fois ces propriétés définies, des tests *in vitro* de biocompatibilité sont effectués et permettent de vérifier le bon comportement biologique du substitut. En parallèle, le développement d'un bioréacteur est décrit, celui-ci pouvant permettre dans le futur de créer des substituts incorporant des cellules. La thèse est clôturée par un chapitre apportant une vue globale sur les travaux effectués ainsi que des perspectives pour des travaux futures.

Commentaires particuliers

Le chapitre 1 fournit des informations sur le contexte de l'étude ainsi que sur l'état de l'art des différents domaines pertinent à l'ingénierie tissulaire du ligament croisé antérieur. Ce chapitre donne une vue extensive de l'état de l'art par rapport aux aspects anatomique, physiologique, chirurgical, d'ingénierie tissulaire. Une vue plus partielle est apportée aux aspects biomécaniques, la revue focusant plutôt sur des aspects élastiques. Ce premier chapitre se termine naturellement sur une proposition de cahier des charges pour le développement d'un substitut de LCA. Ce premier chapitre est très bien écrit et donne une vue tout à fait pertinente de l'état de l'art. Il s'agit d'un travail de très grande qualité qui peut servir de source d'information à d'autres chercheurs voulant se lancer dans ce domaine de recherche.

Le chapitre 2, en se basant sur le cahier des charges présenté au chapitre 1, propose la réalisation d'un substitut se basant sur des techniques de tissage. Au préalable, le développement d'une extrudeuse permettant de contrôler le diamètre de fibre est présenté. Des tests mécaniques sur les fibres obtenues en fonction de différents

polymères sont effectués. Ces tests permettent de choisir le polymère le plus approprié en fonction de ses propriétés mécaniques. Le tressage des fibres est décrit permettant finalement d'obtenir la matrice recherchée. La technique présentée (extrusion et tressage) permet de varier différentes propriétés mécaniques de la matrice ce qui est évidemment un grand avantage. Une critique sur ce chapitre réside dans le fait qu'il est parfois difficile d'identifier les contributions personnelles du candidat par rapport à ce qui est déjà existant dans le laboratoire. La technique est néanmoins très prometteuse.

Le chapitre 3 est consacré aux développements de modèles permettant d'anticiper les comportements mécaniques de la matrice en fonction de différents paramètres géométriques et matériels constituant la matrice. Ces développements sont justifiés par le fait que la mise en œuvre expérimentale des matrices est coûteuse, il est donc plus rentable d'effectuer les optimisations par approches numériques. Ce chapitre représente le cœur de la thèse car les développements proposés sont clairement originaux et intéressants. Le candidat a montré une attention particulière à la validation de chaque parties du modèle ce qui est tout à fait à son honneur. Les modèles obtenus, bien que ne considérant aucun aspect dynamique, permettent d'anticiper les effets des différents processus suivis dans la fabrication des matrices ce qui est un résultat remarquable. En particulier, l'obtention du tableau III.4 est un élément clef de cette thèse.

Le chapitre 4 propose d'évaluer les aspects de biocompatibilité des matrices produites. Cette étude est relativement basique par rapport à ce qui se fait en général, mais permet néanmoins de vérifier la non-toxicité à court terme de la matrice. Il est clair que les aspects de dégradations peuvent influencer grandement les résultats également au niveau biocompatibilité. Le problème de stérilisation est étudié de manière relativement superficielle, bien que cet aspect soit clef en ingénierie tissulaire. Le candidat mentionne cet aspect dans son mémoire, en particulier par rapport aux pertes de propriétés mécaniques. La stérilisation aux rayons gamma, une pratique courante dans le domaine des biomatériaux, va certainement diminuer fortement les propriétés mécaniques de la matrice, par conséquent il est probable que le cahier des charges devrait spécifier des propriétés mécaniques supérieures avant stérilisation aux propriétés visées. La présentation du bioréacteur est un peu troublante car il est difficile d'évaluer son importance dans le travail fourni. Il me semble que cette partie devrait plutôt être dans les perspectives, même si des résultats ont déjà été obtenus.

Le chapitre 5 fait un bilan et propose des perspectives futures à ce travail. Bien qu'en général les remarques et propositions sont pertinentes, ce chapitre souffre d'une dispersion de la discussion. En effet, ce chapitre manque de mise en relief des parties importantes par rapports aux autres résultats. En particulier, la conclusion générale est vraiment trop générale puisqu'elle concerne l'ingénierie tissulaire fonctionnelle et pas vraiment les parties qui ont été développées dans cette thèse.

Opinion personnel

Cette thèse présente différents aspects de l'ingénierie tissulaire fonctionnelle (biomécanique, biomatériaux et biocompatibilité) ce qui est déjà une réussite en soit tant les domaines sont différents. Les aspects de biocompatibilités sont, comme déjà mentionné, un peu moins développés que les 2 autres parties. La modélisation de la matrice fibreuse est remarquable et représente la partie centrale de la thèse. Il s'agit d'un travail de très haut niveau. La réalisation de la matrice est également une réussite de cette thèse qui montre que les concepts théoriques développés se traduisent par une application concrète. La qualité de la rédaction ainsi que celle des illustrations est excellente.

Décision

Après lecture attentive de ce rapport de thèse, je suis tout à fait favorable à la soutenance de cette thèse en l'état actuel du rapport.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'D. Pioletti', written in a cursive style.

Prof. Dominique P. Pioletti

RAPPORT sur le mémoire présenté par
Cédric LAURENT

En vue d'obtenir le grade de Docteur
de l'Université de Lorraine

Spécialité : Mécanique et Energétique

Le mémoire de thèse de Cédric Laurent s'intitule « Vers un nouveau biosubstitut pour l'ingénierie tissulaire du ligament croisé antérieur ». Cette recherche a été conduite au Laboratoire d'Energétique et de Mécanique Théorique et Appliquée, sous la direction de Jean-François Ganghoffer et Rachid Rahouadj.

Le contexte de cette recherche est la réparation de la rupture des ligaments croisés du genou. L'ingénierie tissulaire est une voie qui suscite de l'intérêt pour remplacer un ligament lésé. Cette recherche sur l'ingénierie tissulaire du ligament focalise sur la conception, la fabrication, la caractérisation et la modélisation d'une matrice pour la réparation du ligament croisé antérieur. Cédric Laurent a notamment mis au point un procédé d'extrusion pour fabriquer les fils constitutifs de la matrice, puis mis en œuvre une approche d'ingénierie tissulaire assistée par ordinateur, avant d'aborder la réponse biologique de la matrice.

Pour décrire le travail effectué, le mémoire est organisé en 5 chapitres. Le premier permet de synthétiser l'état de l'art. Le second présente la fabrication de la matrice, proposée dans cette thèse, pour répondre au cahier des charges établi à partir de la synthèse bibliographique. Le troisième décrit les outils numériques spécifiques utilisés pour optimiser la configuration de la matrice souhaitée. Le quatrième expose les résultats préliminaires concernant la caractérisation biologique de la matrice. Enfin, le dernier chapitre est une synthèse sur les recherches menées dans cette thèse.

Plus particulièrement, le premier chapitre décrit, avec de très bonnes illustrations, notamment l'anatomie et la fonction du ligament croisé antérieur. La synthèse des travaux antérieurs est complète et s'appuie sur de très nombreuses références bibliographiques. Juste un commentaire sur l'une d'entre elles, la référence de Beynnon et Fleming 1998 sur la mesure de la déformation du ligament croisé antérieur *in vivo* (avec jauge de déformation) mériterait d'être plus largement décrite (pertinence et qualité de la mesure) notamment parce que cette référence est réutilisée à plusieurs reprises dans la suite du manuscrit.

Cette synthèse permet de dessiner les contours d'un cahier des charges d'une matrice support pour un biosubstitut du ligament croisé antérieur. Ce cahier des charges essaie d'intégrer des éléments biologiques, biochimiques, biomécaniques (à l'échelle cellulaire et articulaire), morphologiques et cliniques. Sur la base de ces critères, ce chapitre se termine sur un état de l'art des matériaux et structures pouvant être candidats pour répondre à ce cahier des charges.

Le second chapitre décrit le concept de matrice proposée dans cette thèse, ainsi que sa fabrication. Le choix du concept est très bien exposé, avec le détail des raisons ayant amenées à ce choix. Un procédé de fabrication a été mis au point pour réaliser des fibres homogènes à partir d'une petite quantité de matière. Puis, les fibres ont été tressées, afin d'obtenir la matrice support du biosubstitut. Cette partie mériterait d'avoir un titre de paragraphe « conclusion », pour terminer le chapitre à l'instar de l'ensemble des autres.

Le troisième chapitre constitue l'une des contributions majeures de cette thèse, en conduisant une modélisation géométrique et mécanique de la matrice support. A partir de la modélisation géométrique, la quantification de la porosité de la matrice est intéressante. Il est montré que le diamètre extérieur de la matrice est surestimé à partir de la modélisation géométrique seule et proche de la réalité lorsque la modélisation géométrique et mécanique est mise en œuvre. Il n'est cependant pas clair si l'étude de l'effet des paramètres du procédé sur la morphologie de la matrice s'est basée sur la modélisation géométrique seule ou sur la configuration initiale calculée. Plus largement, les outils de simulation mis en œuvre ouvrent des perspectives de recherche passionnantes pour évaluer d'autres matrices et estimer l'environnement mécanique local, à l'échelle de la cellule.

Le quatrième chapitre présente les résultats préliminaires d'études biologiques. Des cultures cellulaires ont pu être menées avec succès sur le matériau constitutif de la matrice. L'ensemencement de la matrice par une suspension de cellules souches mésenchymateuses ovines (forte concentration) permet d'obtenir en quelques semaines une distribution uniforme de néo-tissu. Ce résultat est un peu moins optimal pour les cellules humaines. Mais, ces résultats préliminaires sont très encourageants. Ils ont été complétés par de premiers résultats avec un bioréacteur.

Enfin, le dernier chapitre expose une discussion très détaillée des avantages et limites des travaux réalisés et ouvre de nombreuses perspectives apportées par les résultats de cette thèse. Cette partie ne se contente pas d'une discussion sur la base des résultats précédents, mais elle apporte de nouveaux résultats préliminaires pour conforter certaines perspectives. Ce chapitre vient admirablement conclure ce travail de thèse.

En conclusion, le travail effectué par Cédric Laurent au cours de sa thèse est remarquable. Le manuscrit est très agréable à lire, avec une excellente logique dans le processus de recherche, renforcé par les transitions entre les parties. Cette thèse a déjà donné lieu à deux articles publiés dans des revues internationales.



En conséquence, je donne un avis très favorable à la présentation des travaux de Cédric Laurent, pour l'obtention du grade de docteur de l'Université de Lorraine.

Fait à Lyon, le 12/07/2012

A handwritten signature in black ink, appearing to be "D. Mitton", written in a cursive style.

David MITTON
Directeur de Recherche

Vers un nouveau biosubstitut pour l'ingénierie tissulaire du Ligament Croisé Antérieur : approche biomécanique

L'ingénierie tissulaire, qui consiste à remplacer un tissu lésé par un biosubstitut constitué de cellules réparatrices ensemencées dans une matrice de support biodégradable, possède un potentiel prometteur pour la réparation du Ligament Croisé Antérieur (LCA). Or, aucune solution opérationnelle n'a encore été proposée à ce jour, notamment au vu du nombre de domaines scientifiques impliqués.

Dans ce travail, nous avons dressé un cahier des charges pour la définition de cette matrice en nous appuyant sur l'état de l'art. Une matrice de support tressée multicouche constituée de fibres de P(LL85/CL15) a été imaginée, puis les outils nécessaires à sa fabrication à l'échelle du laboratoire ont été mis en place. Nous avons ensuite développé des outils numériques spécifiques permettant la modélisation de sa géométrie et de son comportement biomécanique multi-échelles, qui ont été mis à profit afin d'optimiser les caractéristiques de la matrice compte tenu du cahier des charges établi.

De plus, des caractérisations biologiques ont montré que la matrice était compatible avec la culture de cellules souches, et était susceptible d'accueillir la formation d'un néo-tissu. Par ailleurs, nous avons mis en place un bioréacteur spécifique permettant d'imposer à la matrice de support des cycles de traction-torsion sous environnement contrôlé.

L'utilisation des informations locales issues de la modélisation biomécanique, afin d'interpréter ou d'optimiser les résultats de culture cellulaire sous sollicitations cycliques, constitue une perspective majeure du présent travail. Notre investigation permet en outre de penser qu'un nouveau biosubstitut pour le LCA pourrait prochainement être proposé.

Mots-clefs : ingénierie tissulaire, ligament croisé antérieur, biomécanique, biosubstitut, matrice de support, simulation par éléments finis, bioréacteur, mécanobiologie.

Towards a new biosubstitute for Anterior Cruciate Ligament tissue engineering : a biomechanical approach

Tissue engineering, which consists in replacing an injured tissue with a biodegradable scaffold seeded with cells, has the potential to overcome the limitations associated with current reconstructions strategies of the Anterior Cruciate Ligament (ACL). However, no relevant solution has been proposed yet, especially due to the variety of scientific fields involved in this approach.

In the current study, the key requirements for the design of a new scaffold have been listed from the current state of art. A scaffold based on P(LL85/CL15) fibers arranged into a multilayer braided structure has been proposed, and the tools needed to process this scaffold have been developed. Dedicated numerical tools have been proposed in order to predict the morphological and multiscale biomechanical behavior of the scaffold. These simulation tools have enabled to optimize the scaffold geometry in order to match the selected key requirements for ACL tissue engineering.

Moreover, preliminary biological assessments have shown that the scaffold was suited for the culture of stem cells and for tissue formation. In addition, a dedicated bioreactor has been developed in order to prescribe tension-torsion cycles within a controlled environment.

The use of local information issued from the biomechanical simulations open large perspectives as far as the optimization of culture conditions and the understanding of mechanisms that govern the formation of a ligamentous tissue are concerned. As a conclusion, the present study is likely to enable a new solution for ACL tissue engineering to emerge in the next years.

Keywords : computer-aided tissue engineering, biomechanics, anterior cruciate ligament, tissue-engineered construct, scaffold, bioreactor, finite element simulations, mechanobiology.