



HAL
open science

Élaboration et caractérisation de structures tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire

Cédryck Vaquette

► **To cite this version:**

Cédryck Vaquette. Élaboration et caractérisation de structures tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2008. Français. NNT : 2008INPL002N . tel-01753038

HAL Id: tel-01753038

<https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01753038>

Submitted on 29 Mar 2018

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.



AVERTISSEMENT

Ce document est le fruit d'un long travail approuvé par le jury de soutenance et mis à disposition de l'ensemble de la communauté universitaire élargie.

Il est soumis à la propriété intellectuelle de l'auteur. Ceci implique une obligation de citation et de référencement lors de l'utilisation de ce document.

D'autre part, toute contrefaçon, plagiat, reproduction illicite encourt une poursuite pénale.

Contact : ddoc-theses-contact@univ-lorraine.fr

LIENS

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 122. 4

Code de la Propriété Intellectuelle. articles L 335.2- L 335.10

http://www.cfcopies.com/V2/leg/leg_droi.php

<http://www.culture.gouv.fr/culture/infos-pratiques/droits/protection.htm>

Elaboration et caractérisation de structures tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire

THÈSE

Soutenue publiquement le 18 janvier 2008

Pour l'obtention du

Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
(spécialité Mécanique et Energétique)

par

Cédryck VAQUETTE

Ingénieur EEIGM

Composition du jury

- Rapporteurs :* Christian Oddou, Professeur, Universités de Paris 7, 12 et 13, B2OA Véronique Migonney, Professeur, Université de Paris 13, LBPS
- Examineurs :* Valéry Babak, Professeur, Russian Academy of Science, INEOS RAS, Moscou
Rachid Rahouadj, Maître de Conférences, Nancy-Université, INPL, LEMTA
Marie-Laure Viriot, Directeur de Recherche CNRS, Nancy-Université, DCPR, ENSIC
Xiong Wang, Professeur, Nancy-Université, UHP, LEMTA (Directeur de thèse)
- Membre invité :* Céline Frochet, Chargée de Recherche CNRS, Nancy-Université, DCPR, ENSIC

Résumé

L'ingénierie tissulaire est un domaine pluridisciplinaire visant l'élaboration de prothèses biologiques autologues. Dans cette stratégie, la fabrication de structures, appelées scaffolds, utilisées pour la culture cellulaire est nécessaire. Nous avons développé plusieurs méthodes de fabrication de ces structures tridimensionnelles.

La première méthode (*solvent casting/particulate leaching out*) utilisant une solution de polymère et des particules sphérolisées de glucose comme porogène, permet l'obtention de structures possédant des pores sphériques et bien interconnectés. Nous avons montré que ces scaffolds sont biocompatibles et que leurs propriétés mécaniques en compression peuvent être ajustées.

La seconde méthode, l'*electrospinning*, permet la fabrication de membranes fibreuses biocompatibles, dont le diamètre des fibres peut être contrôlé (de 800 nm à plusieurs micromètres).

La troisième méthode de fabrication consiste à tricoter des fils de suture, élaborant ainsi des matrices hautement poreuses, dont le comportement en traction est similaire, dans sa forme, à celui d'un tendon ou d'un ligament. En couplant le procédé de tricotage et celui d'*electrospinning*, il est possible de construire des scaffolds, où des microfibrilles alignées sont déposées sur la surface des structures tricotées. Ce procédé innovant autorise un ensemencement cellulaire facile et efficace des scaffolds et nous avons montré que les cellules s'orientent spontanément selon la direction des fibres, imitant ainsi la morphologie des tendons et des ligaments. Dans une future utilisation, dans un bioréacteur appliquant de la traction-torsion cyclique, les microfibrilles vont pouvoir transmettre les déformations aux cellules et stimuler la synthèse de la matrice extracellulaire.

Mots clés : Ingénierie tissulaire, scaffolds, electrospinning, biopolymère, ligament.

Abstract

Tissue engineering is a pluridisciplinary domain aiming at elaborating biological autologous prosthesis. In this strategy, the fabrication of structures, called scaffolds, used for cell culture is necessary. We developed several fabrication techniques of these three-dimensional structures.

The first technique (*solvent casting/particulate leaching out*), involving a polymer solution and spherulized glucose particles, allows the elaboration of scaffolds, owing spherical and well interconnected pores. We showed that the scaffolds are biocompatible and that their mechanical properties in compression can be adjusted.

The second technique, *electrospinning*, leads to the elaboration of biocompatible fibrous membranes whose fiber diameter can be controlled from 800 nm to several micrometers.

The third technique of scaffold fabrication proceeds by the elaboration of knitted scaffolds from suture threads. The knitted scaffolds are highly porous and their tensile behavior is similar, in its shape, to the ligaments and tendons stress-strain curves. Using knitting and electrospinning, it has been possible to fabricate knitted scaffolds where aligned microfibrilles are deposited on their surface. This innovative process allows an easy and efficient cell seeding and we showed that cells are orientated along the fibers, mimicking thus tendons and ligaments morphology. In the future, these scaffolds will be used in a bioreactor where cyclic traction and torsion will be applied. The aligned microfibrilles will be able to fully transmit the deformation to the cells, stimulating by this mean the extracellular matrix synthesis.

Keywords: Tissue engineering, scaffolds, electrospinning, biopolymer, ligament.

A mon Grand-Père

A la mémoire de Luc Marchal

*« Sitôt qu'un être humain obtient un PH.D.,
il se produit un phénomène étrange dans
son cerveau qui fait qu'il devient incapable
de prononcer les deux phrases suivantes :
"Je ne sais pas" et "Je me suis trompé". »*

James Randi

Remerciements

Un travail de recherche ne se fait jamais seul, et surtout dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, il est nécessaire de collaborer avec des personnes aux savoirs et aux parcours très différents. J'ai été amené à travailler dans plusieurs laboratoires, certains à la Faculté de Médecine de Nancy, d'autres à l'ENSIC, et bien évidemment au LEMTA.

C'est pourquoi je voudrais par ces quelques phrases, remercier les personnes qui m'ont aidé à réaliser les travaux qui sont présentés dans ce mémoire.

Je tiens à remercier en premier lieu, Xiong Wang, mon directeur de thèse, pour m'avoir trouvé un financement et pour la grande liberté qu'il m'a laissée, me permettant ainsi de tester diverses techniques.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Véronique Migonney, Directrice du Laboratoire de Biomatériaux et Polymères de Spécialité, et à Christian Oddou pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Ma reconnaissance va aussi à Valéry Babak de l'Institut A. Nesmeyanov de l'Académie des Sciences de Russie pour sa gentillesse, ses idées et pour le travail que nous avons effectué ensemble.

DCPR

Je souhaiterais exprimer ma profonde gratitude au personnel du Département de Chimie Physique des Réactions (DCPR, Nancy-Université) qui m'a très gentiment et aimablement accueilli pendant ces trois ans. Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à trois personnes de ce laboratoire :

Marie-Laure Viriot, pour m'avoir permis d'effectuer mes recherches au DCPR, pour la minutieuse correction de ce mémoire, et pour avoir accepté de faire partie des membres du jury ; Marie-Laure, encore une fois mille mercis.

Gabriel Wild, pour m'avoir permis de continuer mes recherches au DCPR, et pour les corrections qu'il a apportées à certains articles.

Céline Frochot, ma « tutrice » au DCPR, pour son amitié, ses conseils avisés, son écoute, ses corrections et son soutien : Céline, je te remercie du fond du cœur.

Je tiens en outre à remercier Marie-Josée Belgy, et Sébastien Hupont pour leur aide de tous les jours, et leur précieuse expérience qui m'a été utile.

Que Serge Corbel accepte mes remerciements pour m'avoir prêté l'alimentation haute tension nécessaire à la mise en place de la technique d'electrospinning.

Merci aussi à tout le personnel technique et administratif de ce laboratoire.

Je souhaite aussi remercier Cécile Nouvel et Jean-Luc Six du LCPM (Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire, ENSIC) pour le temps qu'ils m'ont consacré bien que ce projet n'ait pas abouti comme je l'aurais souhaité.

LEMTA

Mes remerciements vont aux membres du LEMTA et particulièrement à Cyril Kahn avec qui j'ai étroitement collaboré pendant l'évaluation mécanique des tendons et des scaffolds. Je souhaite le remercier encore une fois pour son amitié et les excellents moments que nous avons passés.

Je souhaite aussi remercier Lei Zhang pour sa bonne humeur, sa gentillesse et pour l'aide qu'elle m'a apportée dans la compréhension de la notice de la machine à tricoter qui était en chinois.

Je tiens aussi à remercier Rachid Rahouadj pour son aide et ses conseils.

Que Alain Gérard, Michel Marchand, Jean-Yves Morel et son équipe reçoivent ma sincère reconnaissance pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la conception des différentes machines et accessoires dont j'ai eu besoin.

Merci aussi à Christian Moyne, pour avoir toujours soutenu notre équipe, et aux personnels administratifs et notamment à Anne-Marie Louis-Dam.

Je souhaite aussi remercier Elisabeth Csapo et Lionel Grosjean pour leur aide et leur disponibilité dans la mesure des angles de contact.

Merci aussi à Ghania et Yoann, amis et collègues de bureau.

Faculté de Médecine

Je souhaite aussi remercier les membres de l'antenne du LEMTA de la Faculté de Médecine de Nancy.

Un grand merci à Luc Marchal pour les extraordinaires images de microscopie électronique, pour sa disponibilité et pour sa sympathie.

Que Dominique Dumas voit, par ces lignes, l'expression de ma gratitude pour son aide lors des expériences nécessitant l'utilisation du microscope confocal.

Que Saïd Slimani soit aussi remercié pour le travail collaboratif que nous avons effectué sur les lapins.

Je souhaite aussi remercier le personnel de l'Ecole de Chirurgie, Nguyen Tran, Frédérique et Aude pour leur aide dans les différentes phases de l'implantation animale.

Merci aussi à Karine Montagne du CHU de Nancy pour la préparation et l'exploitation des coupes histologiques des tendons.

Je remercie aussi Patrick Fievet et Omar Boullanouar, qui ont réalisé les mesures du potentiel des fibres.

Je souhaite associer à ces remerciements les différents organismes qui ont financé mes études à savoir le CROUS de l'Académie de Nancy-Metz, la Région Lorraine, et le CNRS.

En dernier lieu, je tiens à remercier ma famille, tout particulièrement ma Maman et ma Tante, et mes amis pour leur indéfectible soutien. Merci à Emilie pour ses encouragements et son réconfort.

Liste des Abréviations

Abréviations scientifiques

3D	Tridimensionnel
AFM	Microscopie de Force Atomique
CAO	Conception Assistée par Ordinateur
CF	Chloroforme
CSM	Cellules Souches Mésenchymateuses
DCM	Dichlorométhane
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMF	Diméthylformamide
ε	Déformation
E	Module d'élasticité
FDA	Food and Drug Administration
FDM	Fused Deposition Modeling
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
HES	Hématoxyline, Eosine, Safran
HFIP	Hexafluoroisopropanol
JX	Jour n°X
i.v.	Viscosité intrinsèque
LCA	Ligament Croisé Antérieur
MET	Méthanol
M_n	Masse molaire en nombre
M_w	Masse molaire en poids
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCL	Poly(ε -caprolactone)
PDLA	Acide poly(D,L-lactique)
PEO	Oxyde de polyéthylène
PET	Polyéthylène téréphtalate
PGA	Acide polyglycolique
PLCL	Acide poly(lactique-co-caprolactone)
PLGA	Acide lactique-co-glycolique

PLLA	Acide poly(L-lactique)
PP	Polypropylène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PU	Polyuréthane
PX	Passage n°X
ρ_m	Masse volumique
ρ_s	Masse volumique apparente
S	Contrainte
SC/LO	Solvent Casting/particulate Leaching Out
SDS	Dodécyle sulfate de sodium
Si	Silicone
SIS	Small Intestine Submucosa
TBP	Tri(<i>n</i> -butyl)phosphate
T_f	Température de fusion
T_g	Température de transition vitreuse
THF	Tétrahydrofuranne
TIPS	Séparation de Phase Thermiquement Induite
Tol	Toluène
UHMPE	Polyéthylène ultra haute densité
UV	UltraViolet
Xc	Taux cristallin

Abréviations administratives

DCPR	Département de Chimie Physique des Réactions, Nancy
LEMETA	Laboratoire d'Energétique et de Mécanique Théorique et Appliquée, Nancy

Sommaire

Avant propos

Introduction générale

Partie 1

1	SELECTION DES MATERIAUX : UNE ETUDE PRELIMINAIRE.....	7
1.1	SELECTION DES MATERIAUX.....	8
1.1.1	<i>Biocompatibilité</i>	8
1.1.2	<i>Propriétés physiques des polyesters</i>	10
1.1.3	<i>Dégradation des polyesters</i>	11
1.1.3.1	Principe de la dégradation.....	12
1.1.3.2	Facteurs affectant la dégradation.....	14
1.2	ETUDE DE BIOCOMPATIBILITE DES POLYESTERS.....	16
1.2.1	<i>Matériels et méthodes</i>	16
1.2.1.1	Matériels.....	16
1.2.1.2	Préparation des membranes.....	17
1.2.2	<i>Caractérisation des membranes</i>	17
1.2.3	<i>Culture cellulaire et test de biocompatibilité</i>	18
1.2.3.1	Milieu de culture.....	18
1.2.3.2	Tests de biocompatibilité.....	18
1.2.3.3	Statistiques.....	19
1.2.4	<i>Résultats et discussion</i>	19
1.2.4.1	Caractérisation des membranes.....	19
1.2.4.2	Biocompatibilité.....	21
1.3	CONCLUSION.....	23

Partie 2

2	ELABORATION DE SCAFFOLDS POSSEDANT DES PORES SPHERIQUES ET INTERCONNECTES	25
2.1	METHODES DE FABRICATION CLASSIQUES DES SCAFFOLDS.....	26
2.1.1	<i>Solvent casting/Particulate leaching out (SC/LO)</i>	26
2.1.1.1	Paramètres influençant le procédé.....	27
2.1.1.2	Limitations du procédé.....	30
2.1.2	<i>Séparation de phase thermiquement induite (TIPS)</i>	31
2.1.2.1	Paramètres influençant le procédé.....	32
2.1.2.2	Limitations de la technique.....	34

2.1.3	<i>Gas foaming</i>	35
2.1.3.1	Paramètres influençant le procédé.....	36
2.1.3.2	Limitations du procédé.....	36
2.1.4	<i>Fused Deposition Modeling (FDM)</i>	37
2.1.4.1	Principe du procédé.....	37
2.1.4.2	Paramètres influençant le procédé.....	39
2.1.4.3	Limitations du procédé.....	40
2.1.5	<i>Impression tridimensionnelle</i>	41
2.1.6	<i>Frittage laser (selective laser sintering)</i>	41
2.1.7	<i>Autres techniques</i>	42
2.2	MATERIELS ET METHODES	43
2.2.1	<i>Matériels</i>	43
2.2.1.1	Polymère, porogène et autres matériels.....	43
2.2.1.2	Milieu de culture	43
2.2.2	<i>Caractérisation et modification des particules</i>	44
2.2.2.1	Observation des particules	44
2.2.2.2	Modification des particules	44
2.2.2.3	Mesure de la température de flamme	45
2.2.3	<i>Fabrication des scaffolds</i>	45
2.2.4	<i>Evaluation des scaffolds</i>	47
2.2.4.1	Evaluation morphologique	47
2.2.4.2	Evaluation de la porosité	47
2.2.4.3	Evaluation mécanique	47
2.2.4.4	Evaluation biologique	47
2.3	RESULTATS	51
2.3.1	<i>Caractérisation des particules</i>	51
2.3.2	<i>Température de flamme</i>	53
2.3.3	<i>Evaluation des scaffolds</i>	54
2.3.3.1	Evaluation morphologique	54
2.3.3.2	Evaluation de la porosité	56
2.3.3.3	Evaluation mécanique	57
2.3.3.4	Evaluation biologique	58
2.4	DISCUSSION.....	63
2.4.1	<i>Procédé de fabrication</i>	63
2.4.2	<i>Propriétés des scaffolds</i>	66
2.4.2.1	Propriétés physiques.....	66
2.4.2.2	Propriétés biologiques	66
2.4.2.3	Taille, géométrie des pores et interconnectivité.....	67
2.5	CONCLUSION.....	69

Partie 3

3	ELECTROSPINNING : DEPOSITION DE MICROFIBRES	71
3.1	LE PROCEDE	72
3.1.1	<i>Principe et description</i>	72
3.1.2	<i>Paramètres influençant le procédé</i>	77
3.1.2.1	Propriétés de la solution de polymère	77
3.1.2.2	Conditions du procédé.....	85
3.1.3	<i>Orientation des fibres</i>	89
3.1.3.1	Alignement mécanique.....	89
3.1.3.2	Alignement par la géométrie du collecteur	92
3.1.4	<i>Limites de l'electrospinning</i>	93
3.2	UNE ETUDE DE CAS.....	95
3.2.1	<i>Matériels et méthodes</i>	95
3.2.1.1	Déposition aléatoire.....	95
3.2.1.2	Déposition alignée.....	97
3.2.1.3	Observation morphologique	98
3.2.1.4	Evaluation biologique	98
3.2.2	<i>Résultats</i>	99
3.2.2.1	Déposition aléatoire.....	99
3.2.2.2	Déposition alignée.....	106
3.2.3	<i>Discussion</i>	109
3.2.3.1	Effet des paramètres de déposition.....	109
3.2.3.2	Evaluation biologique	112
3.2.3.3	Déposition alignée.....	114
3.3	CONTROLE DE LA CHARGE DES FIBRES	115
3.3.1	<i>Matériel et méthode</i>	115
3.3.1.1	Matériel	116
3.3.1.2	Préparation des solutions.....	116
3.3.1.3	Fabrication des membranes	116
3.3.1.4	Electrospinning.....	116
3.3.1.5	Morphologie des fibres.....	117
3.3.1.6	Mesure du potentiel zêta	117
3.3.1.7	Mesure de l'angle de contact.....	117
3.3.2	<i>Résultats</i>	118
3.3.2.1	Morphologie des fibres.....	118
3.3.2.2	Mesure du potentiel zêta	120
3.3.2.3	Mesure de l'angle de contact.....	121
3.3.3	<i>Discussion</i>	121
3.3.3.1	Morphologie des fibres.....	121
3.3.3.2	Séparation de phase.....	122
3.4	CONCLUSION ET PERSPECTIVES	123

Partie 4

4	INGENIERIE TISSULAIRE DU TENDON ET DU LIGAMENT	125
4.1	LIGAMENT ET TENDONS.....	126
4.1.1	<i>Fonction</i>	126
4.1.1.1	Le ligament croisé antérieur.....	126
4.1.1.2	Les tendons.....	126
4.1.2	<i>Composition des tissus conjonctifs</i>	126
4.1.3	<i>Structure</i>	129
4.1.3.1	Structure macroscopique.....	129
4.1.3.2	Structure microscopique.....	130
4.1.3.3	Vascularisation.....	132
4.1.4	<i>Propriétés mécaniques</i>	132
4.1.4.1	Propriétés macroscopiques.....	132
4.1.4.2	Propriétés microscopiques.....	134
4.1.5	<i>Pathologies et traitements</i>	135
4.1.5.1	Greffes biologiques.....	135
4.1.5.2	Greffes synthétiques.....	137
4.2	STRUCTURES TRIDIMENSIONNELLES EN INGENIERIE TISSULAIRE DU TENDON ET DU LIGAMENT	140
4.2.1	<i>Emploi de structures d'origine naturelle</i>	140
4.2.1.1	Emploi de tissus collagéniques d'origine animale.....	140
4.2.1.2	Emploi de collagène.....	142
4.2.1.3	Emploi de polysaccharides.....	145
4.2.2	<i>Emploi de structures d'origine synthétique</i>	146
4.2.2.1	Scaffolds tressés.....	146
4.2.2.2	Scaffolds tissés.....	148
4.3	PROPRIETES DES SCAFFOLDS TISSES	150
4.3.1	<i>Matériels et méthodes</i>	150
4.3.1.1	Fil de suture.....	150
4.3.1.2	Protocole de tissage.....	150
4.3.1.3	Evaluation morphologique.....	151
4.3.1.4	Evaluation mécanique.....	152
4.3.1.5	Dégradation des scaffolds Vicryl.....	156
4.3.2	<i>Résultats</i>	158
4.3.2.1	Evaluation morphologique.....	158
4.3.2.2	Evaluation mécanique.....	160
4.3.2.3	Dégradation des tissés Vicryl.....	171
4.3.3	<i>Discussion</i>	177
4.3.3.1	Propriétés des scaffolds.....	177
4.3.3.2	Dégradation des scaffolds.....	179
4.4	DEVELOPPEMENT DE SCAFFOLD COMPOSITE, TISSE/ALGINATE.....	182
4.4.1	<i>Matériels et méthodes</i>	183
4.4.1.1	Matériels.....	183
4.4.1.2	Etude in vitro.....	183
4.4.1.3	Etude in vivo.....	184
4.4.2	<i>Résultats</i>	188
4.4.2.1	Etude in vitro.....	188

4.4.2.2	Etude <i>in vivo</i>	189
4.4.3	<i>Discussion</i>	194
4.4.3.1	Procédé de fabrication	194
4.4.3.2	Evaluation biomécanique	194
4.4.3.3	Etude <i>in vivo</i>	195
4.5	DEVELOPPEMENT DE COMPOSITES TISSE/MICROFIBRE	196
4.5.1	<i>Matériel et méthode</i>	196
4.5.1.1	Matériel	196
4.5.1.2	Protocole de fabrication	197
4.5.1.3	Etude biologique	199
4.5.1.4	Evaluation morphologique	200
4.5.2	<i>Résultats</i>	201
4.5.2.1	Membranes fibreuses.....	201
4.5.2.2	Scaffolds tissé/microfibres	205
4.5.3	<i>Discussion</i>	210
4.5.3.1	Membranes fibreuses.....	210
4.5.3.2	Méthode de fabrication.....	210
4.5.3.3	Comportement mécanique.....	212
4.5.3.4	Alignement cellulaire et stretching	212
4.5.3.5	Source cellulaire	213
4.6	CONCLUSION	215

Conclusions

Perspectives

Bibliographie

Index des figures

Partie 1

<i>Figure 1.1 : Formule développée des trois principaux polyesters.....</i>	<i>9</i>
<i>Figure 1.2 : Description du progrès de l'hydrolyse autocatalysée des polyesters.....</i>	<i>13</i>
<i>Figure 1.3 : Morphologie des films de polyesters.....</i>	<i>20</i>
<i>Figure 1.4 : Evolution du pourcentage de réduction de l'Alamar Blue de différentes membranes en fonction du temps.</i>	<i>22</i>

Partie 2

<i>Figure 2.1 : Morphologie des mousses issues du solvant casting/particulate leaching out. ...</i>	<i>27</i>
<i>Figure 2.2 : Diagramme de phase binaire montrant les morphologies des mousses obtenues lors de la séparation de phase.....</i>	<i>32</i>
<i>Figure 2.3 : Description schématique du procédé de Fused Deposition Modeling.</i>	<i>38</i>
<i>Figure 2.4 : Morphologie des scaffolds obtenus par FDM.....</i>	<i>39</i>
<i>Figure 2.5 : Schéma descriptif du procédé de frittage laser.....</i>	<i>42</i>
<i>Figure 2.6 : Description du procédé de sphérolisation des particules de sucre.</i>	<i>44</i>
<i>Figure 2.7 : Description du procédé modifié de SC/LO.</i>	<i>46</i>
<i>Figure 2.8 : Implantation des scaffolds chez le rat.....</i>	<i>51</i>
<i>Figure 2.9 : Morphologie des particules de sucre.....</i>	<i>52</i>
<i>Figure 2.10 : Profil de température de la flamme du bec Meker.....</i>	<i>54</i>
<i>Figure 2.11 : Morphologie des scaffolds en fonction de la concentration des solutions</i>	<i>55</i>
<i>Figure 2.12 : Dimension des passages d'interconnexion entre les pores.....</i>	<i>55</i>
<i>Figure 2.13 : Morphologie des scaffolds avec des canaux d'interconnexion.....</i>	<i>56</i>
<i>Figure 2.14 : Courbe de compression contrainte-déformation d'un scaffold en PLLA.</i>	<i>57</i>
<i>Figure 2.15 : Module de compression des scaffolds en PLLA.....</i>	<i>58</i>
<i>Figure 2.16 : Pourcentage de réduction de la molécule Alamar Blue.</i>	<i>59</i>
<i>Figure 2.18 : Coupes histologiques des scaffolds à J3, J10 et J17 après implantation.</i>	<i>61</i>

<i>Figure 2.19 : Morphologie du centre des scaffolds après implantation.</i>	62
<i>Figure 2.20 : Infiltration de cellules dans les pores internes.</i>	63
<i>Figure 2.21 : Scaffold de PLLA fabriqué avec des sphères de paraffine.</i>	65

Partie 3

<i>Figure 3.1 : Evolution du nombre de publications concernant la technique d'electrospinning.</i> <i>Source : Pubmed Central.</i>	73
<i>Figure 3.2 : Schéma descriptif du procédé d'electrospinning.</i>	74
<i>Figure 3.3 : Images de la zone d'instabilité du jet. PEO à 2% (m/vol) dans de l'eau.</i>	76
<i>Figure 3.4 : Membrane de PCL obtenue par electrospinning avec présence de bead.</i>	77
<i>Figure 3.5 : Modification de l'angle d'alignement des fibres.</i>	92
<i>Figure 3.6 : Photographie de la machine d'electrospinning.</i>	96
<i>Figure 3.7 : Description du tambour rotatif.</i>	97
<i>Figure 3.8 : Morphologie des fibres de PCL déposées à différentes concentrations</i>	100
<i>Figure 3.9 : Influence de la distance de déposition sur la formation de beads.</i>	101
<i>Figure 3.10 : Influence de la distance de déposition sur la taille des fibres et des beads.</i>	102
<i>Figure 3.11 : Effet de la tension sur le procédé.</i>	103
<i>Figure 3.12 : Pourcentage de réduction de l'Alamar Blue des CSM du lapin.</i>	104
<i>Figure 3.13 : Morphologie des cellules cultivées sur les membranes micro-fibreuses.</i>	105
<i>Figure 3.14 : Morphologie des fibres de PCL alignées.</i>	108
<i>Figure 3.15 : Membrane de fibres alignées en bicouche.</i>	109
<i>Figure 3.16 : Formule de l'Eudragit RS.</i>	116
<i>Figure 3.17 : Morphologie des fibres.</i>	118
<i>Figure 3.18 : Distribution de l'Eudragit dans les fibres PCL/Eudragit.</i>	119
<i>Figure 3.19 : Potentiel en fonction de la pression appliquée.</i>	120

Partie 4

<i>Figure 4.1:Organisation des tissus collagéniques.</i>	128
<i>Figure 4.2 : Morphologie macroscopique du ligament croisé antérieur.</i>	130
<i>Figure 4.3 : Enchevêtrement des fibrilles de collagène.</i>	131
<i>Figure 4.4 : Courbe de traction contrainte-déformation d'un ligament.</i>	133

<i>Figure 4.5 : Morphologie d'un gel de collagène.</i>	143
<i>Figure 4.6 : Morphologie des scaffolds fibreux en polysaccharides.</i>	145
<i>Figure 4.7 : Exemple de structures tressées pour la reconstruction du LCA.</i>	147
<i>Figure 4.8 : Morphologie des scaffolds tissés.</i>	148
<i>Figure 4.9 : Machine de tricotage du laboratoire.</i>	151
<i>Figure 4.10 : Histoire de l'essai de relaxation.</i>	154
<i>Figure 4.11 : Mors de traction cylindrique.</i>	154
<i>Figure 4.12 : Système de préhension des scaffolds tissés Mersilk.</i>	155
<i>Figure 4.13 : Morphologie des fils de suture.</i>	158
<i>Figure 4.14 : Morphologie des scaffolds tissés.</i>	159
<i>Figure 4.15 : Comportement en traction des fils Vicryl.</i>	160
<i>Figure 4.16 : Impact du niveau de pré-déformation sur la relaxation des fils Vicryl.</i>	162
<i>Figure 4.17 : Influence de la vitesse d'étirement sur la relaxation, 10% de déformation.</i>	162
<i>Figure 4.18 : Comportement en traction des tissés Vicryl.</i>	165
<i>Figure 4.19 : Comportement en traction des tissés Vicryl.</i>	166
<i>Figure 4.20 : Impact du niveau de pré-déformation sur la relaxation des tissés Vicryl.</i>	167
<i>Figure 4.21 : Influence de la vitesse d'étirement sur la relaxation des tissés Vicryl.</i>	168
<i>Figure 4.22 : Comportement en traction des tissés en soie.</i>	170
<i>Figure 4.23 : Evolution de la viscosité intrinsèque en fonction du temps.</i>	171
<i>Figure 4.24 : Evolution du pH du milieu de dégradation en fonction du temps.</i>	172
<i>Figure 4.25 : Perte de masse des scaffolds au cours de la dégradation.</i>	173
<i>Figure 4.26 : Courbes de traction des scaffolds au cours de la dégradation.</i>	174
<i>Figure 4.27 : Morphologie des scaffolds au cours de la dégradation.</i>	175
<i>Figure 4.28 : Dégradation des scaffolds tissés, apparition de fibres creuses.</i>	176
<i>Figure 4.29 : Gradient de la vitesse de déformation dans les scaffolds tissés.</i>	178
<i>Figure 4.30 : Protocole d'implantation des scaffolds tissé/alginat chez le lapin.</i>	186
<i>Figure 4.31 : Description des mors utilisés pour les tests biomécaniques.</i>	187
<i>Figure 4.32 : Morphologie des composites tissé/alginat.</i>	188
<i>Figure 4.33 : Viabilité des fibroblastes dans les scaffolds composites tissé/alginat.</i>	189
<i>Figure 4.34 : Courbe de traction d'un tendon sain et d'un tendon régénéré.</i>	190
<i>Figure 4.35: Rapport des modules d'élasticité des tendons d'Achille lésés.</i>	191
<i>Figure 4.36 : Coupes histologiques des tendons après 13 semaines.</i>	192
<i>Figure 4.37 : Coupes histologiques des tendons régénérés.</i>	193
<i>Figure 4.38 : Disposition des tissés sur le tambour rotatif.</i>	199

<i>Figure 4.39 : Morphologie des membranes fibreuses de PLCL.....</i>	<i>201</i>
<i>Figure 4.40 : Viabilité des cellules souches mésenchymateuses sur les membranes fibreuse de PLCL (70/30).....</i>	<i>202</i>
<i>Figure 4.41 : Morphologie des cellules sur les membranes de PLCL.....</i>	<i>203</i>
<i>Figure 4.42 : Morphologie des cellules sur les membranes alignées.....</i>	<i>204</i>
<i>Figure 4.43 : Morphologie des scaffolds tissés après un dépôt de PLCL (70/30).....</i>	<i>205</i>
<i>Figure 4.44 : Morphologie des composites tissé en soie/microfibres.....</i>	<i>206</i>
<i>Figure 4.45 : Morphologie des scaffolds composites tissé/microfibres.....</i>	<i>206</i>
<i>Figure 4.46 : Viabilité des cellules souches du rat sur les composites tissé/microfibres.....</i>	<i>207</i>
<i>Figure 4.47 : Morphologie des cellulesensemencées sur les composites tissés Vicryl/microfibres.....</i>	<i>208</i>
<i>Figure 4.48 : Morphologie des cellules et mise en évidence de sécrétion extracellulaire. ...</i>	<i>209</i>

Index des tables

Partie 1

<i>Tableau 1-1 : Propriétés thermiques des principaux polyesters.....</i>	<i>10</i>
<i>Tableau 1-2 : Propriétés mécaniques des principaux polyesters</i>	<i>11</i>
<i>Tableau 1-3 : Epaisseur et rugosité des films de polyester et de silicone.</i>	<i>19</i>

Partie 2

<i>Tableau 2-1 : Diamètre des particules angulaires et sphérolisées.....</i>	<i>53</i>
<i>Tableau 2-2 : Porosité des structures</i>	<i>56</i>

Partie 3

<i>Tableau 3-1 : Paramètres de l'electrospinning.</i>	<i>80</i>
<i>Tableau 3-2 : Paramètres permettant d'ajuster le diamètre des fibres.</i>	<i>88</i>
<i>Tableau 3-3 : Paramètre pour la déposition de fibre alignées.....</i>	<i>91</i>
<i>Tableau 3-4 : Diamètre des fibres et des beads en fonction des paramètres de déposition. ...</i>	<i>99</i>
<i>Tableau 3-5 : Potentiel zêta des fibres de PCL, Eudragit et PCL/Eugragit (96/4).....</i>	<i>120</i>
<i>Tableau 3-6 : Angles de contact des membranes et des fibres.....</i>	<i>121</i>

Partie 4

<i>Tableau 4-1 : Propriétés mécaniques en traction des fils de suture Vicryl.</i>	<i>161</i>
<i>Tableau 4-2 : Temps de relaxation des fils de suture Vicryl 4-0</i>	<i>163</i>
<i>Tableau 4-3 : Propriétés mécaniques en traction des tissés Vicryl.</i>	<i>167</i>
<i>Tableau 4-4: Temps de relaxation des tissés Vicryl 4-0</i>	<i>168</i>
<i>Tableau 4-5 : Propriétés mécaniques en traction des tissés en soie.....</i>	<i>170</i>
<i>Tableau 4-6 : Evolution des propriétés mécaniques au cours de la dégradation.....</i>	<i>175</i>

Avant-propos

Avant d'aborder directement les travaux de recherche qui sont relatés dans ce manuscrit, il me semble nécessaire d'y ajouter quelques données sur le travail en ingénierie tissulaire et sur le contexte de l'étude qui m'a été confiée au sein du LEMTA.

Historiquement, le projet d'ingénierie tissulaire, développé au LEMTA, a commencé en 2001 avec une première étude sur le rôle de certains facteurs de croissance sur la synthèse de matrice extracellulaire et la prolifération de fibroblastes. Cette première étape fut purement biologique et donc l'aspect matériau n'a pas été pris en considération.

L'objectif avéré des travaux réalisés pour ce mémoire a été de poursuivre cette étude en développant différents procédés de fabrication de supports tridimensionnels de culture cellulaire et de tester leurs interactions avec des cellules. Ainsi, les techniques qui sont présentées dans le manuscrit sont des procédés nouveaux pour le laboratoire, importés et mis au point pendant la durée de la thèse. Un certain nombre de problèmes techniques a été résolu afin d'obtenir des procédés fonctionnels. L'expérience acquise sera, je l'espère, utile pour les prochains chercheurs de notre laboratoire qui s'attèleront au développement de matrices pour l'ingénierie tissulaire.

Introduction générale

Cette partie introductive permet de définir les concepts qui sont utilisés dans ce travail. Elle précise en outre les différents objectifs de l'étude.

➤ Ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est une discipline émergente dans les sciences biomédicales. Elle connaît un intérêt croissant depuis les années 90 puisqu'elle peut permettre la création et la culture de tissus *in vitro*. En 1993, R. Langer et J.P. Vacanti publient dans Science un article qui en pose les bases. L'ingénierie tissulaire est classiquement définie comme étant un domaine pluridisciplinaire combinant les principes des sciences de la vie, de l'ingénierie, des sciences des matériaux et de la biomécanique en vue de restaurer, maintenir, améliorer la fonction d'un tissu ou d'un organe endommagé [LAN 93]. Ces auteurs expliquent comment, à partir de biomatériaux et de cellules dites souches, il est envisageable de créer des prothèses biologiques, c'est-à-dire de prélever au patient des cellules, puis de les cultiver dans un support adéquat, éventuellement biodégradable, avant que ce nouveau tissu ne soit réimplanté. C'est donc une prothèse biologique autologue. Les prothèses classiques qui sont encore utilisées de nos jours sont constituées de matériaux inertes qui engendrent une réaction inflammatoire qu'on tend à rendre la plus faible possible. Cette nouvelle génération de prothèses, dites biologiques, à la différence des prothèses classiques, utilise le biomatériau de façon active afin de développer un néo tissu qui suppléera aux fonctions du tissu ou de l'organe endommagé. Ce matériau bioactif devra, après un laps de temps, être assimilé ou bien intégré par l'hôte. L'idée de pouvoir recréer des tissus *in vitro* et de les réimplanter dans le corps humain permettra très probablement de surmonter les deux principaux défauts des greffes, à savoir le manque de donneur et l'immunocompatibilité des greffons. Cependant, l'ingénierie tissulaire n'a pas encore tenu toutes ses promesses puisqu'il n'existe que peu d'applications cliniques. Aussi, le travail restant à faire est encore gigantesque en raison de la complexité du problème faisant intervenir des matériaux inertes et des tissus vivants. La compréhension et le contrôle de certains phénomènes comme par exemple la différenciation cellulaire, la synthèse de matrice extracellulaire, l'interaction cellules/biomatériau restent, somme toute, limités ou assez aléatoires.

➤ Structures tridimensionnelles ou scaffolds

L'objectif de cette étude est de développer des matrices tridimensionnelles appelées de façon courante par cet anglicisme : *scaffold*. « *Scaffold* » signifie échafaudage, ce qui montre bien la fonction de support de ces structures. Cette terminologie sera adoptée pour la suite de ce manuscrit. Ainsi, les termes, matrice 3D, structure, mousse et scaffold se rapporteront à la même définition. Le scaffold est défini comme un support de culture cellulaire tridimensionnel. En règle générale, il tente d'imiter au plus proche la morphologie du tissu qu'il doit remplacer et il doit, entre autre, subir les efforts mécaniques tant qu'un nouveau tissu ne s'est pas formé. Une fois qu'un néo tissu est présent, le scaffold doit, soit être intégré, soit être assimilé, soit être dégradé, par le corps. L'architecture des scaffolds diffère selon l'application pour laquelle ils sont destinés. Des scaffolds poreux sont utilisés pour l'ingénierie tissulaire de l'os et du cartilage. En revanche, des scaffolds fibreux, sont, en règle générale, employés pour l'ingénierie tissulaire de la peau. De même, l'ingénierie tissulaire des tissus tendineux ou ligamentaires nécessite des scaffolds possédant une grande flexibilité et une grande résistance à la traction-torsion. Des scaffolds tissés, tricotés ou tressés ont donc été élaborés pour remplir ces fonctions précitées. On s'aperçoit qu'en fonction du tissu visé, le scaffold doit répondre à un cahier des charges très spécifique.

Les objectifs de ce travail sont la fabrication et la caractérisation de telles structures répondant à un cahier des charges qui est précisé ci-après.

➤ Cahier des charges

Le scaffold doit être biocompatible étant donné qu'il seraensemencé par des cellules. La biocompatibilité est liée à la fois au matériau en lui-même mais aussi à son procédé de fabrication (des traces de solvant organique pouvant provoquer une mort cellulaire). La matrice doit posséder une haute porosité et présenter une importante interconnexion entre les pores afin de permettre la diffusion des nutriments et la migration cellulaire. De même, le rapport aire surfacique/volume doit être le plus élevé possible présentant ainsi une large surface pour les interactions cellules/matrice.

Les propriétés mécaniques du tissu à remplacer donnent les propriétés que le scaffold doit présenter puisqu'il va subir les mêmes stimulations biomécaniques. Par analogie, les scaffolds pour l'ingénierie tissulaire de l'os doivent avoir une bonne résistance à la compression. De même, pour les scaffolds visant à remplacer les tissus collagéniques, une élasticité et une grande résistance à la traction sont des propriétés requises.

De nombreuses stratégies en ingénierie tissulaire recrutent des matériaux biodégradables afin de limiter les réactions inflammatoires à long terme. L'avantage d'une matrice se dégradant est, qu'en libérant de la place, elle permet l'expansion du tissu et l'obtention, après la culture dans le bioréacteur, d'un tissu naturel. La durée de dégradation requise dépend essentiellement du temps de culture nécessaire à la synthèse du tissu. D'autres matériaux non dégradables sont toutefois utilisés. Aussi, leurs interactions avec le corps humain doivent être aussi minimales que possible.

Pour résumer ce cahier des charges, qui constitue en somme les différents objectifs à atteindre, il convient de fabriquer une structure biocompatible, possédant une porosité élevée, résistante à la fatigue mécanique et dont la durée de dégradation est ajustée en fonction du temps de culture *in vitro*. La fabrication d'une telle structure peut s'effectuer grâce à différents procédés. La méthode de fabrication influera sur l'architecture de la matrice comme je le montrerai au cours de cet exposé.

➤ Succès de l'ingénierie tissulaire

L'ingénierie tissulaire est dite « discipline émergente » depuis les années 90, c'est-à-dire si elle prend son temps, bien que des Groupes de recherche, toujours plus nombreux, s'attellent à ce sujet. Cependant, très peu d'études ont dépassé le stade de l'implantation animale pour aller en clinique. Il existe néanmoins des méthodes qui ont permis la reconstruction et l'implantation de tissu chez l'homme. Nous pouvons citer l'équipe de Nicolas L'heureux, au Canada, qui en utilisant une technique de culture cellulaire par couche a réussi à reconstruire des vaisseaux sanguins fonctionnels [L'HE 07]. Cette étude a été effectuée pour différents animaux dont des primates, et un protocole clinique a été développé. Plus proche de nous, l'équipe de Jochen Ringe de Berlin, a élaboré un substitut cartilagineux en associant des fibres d'acide polyglycolique et des chondrocytes autologues pour remplacer le cartilage hyalin présent dans le genou. D'après ce chercheur, plusieurs milliers de patients ont été traités par cette prothèse, appelée Bioseed[®], et semblent satisfaits de la fonctionnalité de leur articulation [RIN 07].

➤ Présentation du mémoire

Celui-ci se divise en quatre parties qui, bien qu'indépendantes, forment une suite logique du déroulement des travaux. Pour chaque chapitre, une introduction bibliographique est présentée avant de définir les objectifs de l'étude, suivie par la présentation des techniques expérimentales débouchant sur les résultats et la discussion.

La première partie traite de la sélection du matériau, ou plutôt de la gamme des matériaux sélectionnés, en fonction de leur biocompatibilité et de leur propension à se dégrader. Cela constitue en effet une première étape nécessaire à la réalisation du projet. Le paramètre essentiel que doivent posséder ces matériaux, c'est-à-dire la biocompatibilité, a été évalué lors d'une étude préliminaire.

La seconde partie aborde la fabrication de structures poreuses. Les différents procédés classiques de fabrication sont examinés et critiqués avant de présenter la technique, qui bien que déjà existante, a été importée, modifiée et améliorée au laboratoire afin de créer des structures tridimensionnelles. Les propriétés des scaffolds issus de ce procédé de fabrication, sont analysées tant au niveau morphologique, mécanique que biologique. Aussi, les performances de ces structures sont estimées *in vivo* pour évaluer la pénétration tissulaire dans la matrice.

La troisième partie de ce travail expose en détail une technique de fabrication utilisée de plus en plus fréquemment dans l'ingénierie tissulaire, la déposition de micro- ou nano- fibres dans un champ électrique, l'électrofilage. Pour des raisons pratiques, le terme anglais d'*electrospinning* sera exclusivement employé dans la suite du mémoire. Je montrerai dans cette partie quels sont les paramètres influant sur ce procédé. Comme dans le second chapitre, une critique de ce procédé est proposée avant d'aborder un aspect plus expérimental par une étude de cas. Finalement, une technique originale permettant de modifier le potentiel zéta des fibres est aussi décrite. Ce procédé d'*electrospinning* sera utilisé pour la fabrication de scaffolds pour l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament, sujet de la quatrième partie.

La quatrième partie concerne la fabrication d'une structure tissée pour l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament. Dans un premier temps, il convient de présenter la structure interne de ces tissus collagéniques avant de rendre compte de leurs pathologies et des techniques développées pour les reconstruire ou les remplacer lorsqu'ils sont endommagés. Les limites

de ces techniques sont mises en évidence avant d'aborder l'intérêt de l'ingénierie tissulaire et les différents scaffolds qui sont employés. La stratégie et les objectifs de cette étude sont ensuite définis afin de s'orienter sur la fabrication de structures tissées. La mécanique et la dégradation de ces structures tissées sont étudiées. La biocompatibilité des scaffolds est évaluée pour deux types de structures : un composite tissé/alginate gélifié, et un scaffold tissé/microfibres. Ces deux types de scaffold font l'objet d'études séparées. Finalement, une critique de ces structures est avancée avant d'aboutir à une conclusion générale de l'ensemble des travaux.

Partie 1

1 Sélection des matériaux : Une étude préliminaire

L'objectif de cette partie est d'adopter une réflexion permettant la sélection des matériaux utilisables pour l'ingénierie tissulaire. Le cahier des charges défini dans la partie introductive permet, en fonction de critères établis, de procéder à cette sélection.

1.1 Sélection des matériaux

1.1.1 Biocompatibilité

Le premier critère de sélection est bien entendu la biocompatibilité. Ainsi il convient de se diriger vers les matériaux qui sont connus et admis pour être biocompatibles. C'est le cas notamment de la famille des polyesters aliphatiques, mais aussi du collagène déjà utilisé par plusieurs laboratoires dans le domaine de l'ingénierie tissulaire [LEE 02a] [CHE 03].

Cependant, le collagène présente des inconvénients tels que la nécessité d'être isolé à partir de tissu humain ou animal aboutissant alors à de grandes variations dimensionnelles d'un lot à l'autre. De plus, l'utilisation de matériaux naturels d'origine humaine ou animale augmente le risque de transmission de maladie.

C'est pour cela que nous nous sommes orientés vers l'utilisation de polymères synthétiques et biodégradables, qui, en sus d'être moins chers, permettent d'avoir une bonne reproductibilité du fait du procédé de fabrication. C'est donc tout naturellement que nous nous sommes acheminés vers l'emploi de polyesters aliphatiques.

Dans la famille des polyesters aliphatiques, plusieurs polymères se distinguent par leur utilisation comme matériel de suture biorésorbable. L'acide polylactique (PLA) et l'acide polyglycolique (PGA) ainsi que leurs copolymères acide lactique-co-glycolique (PLGA) ont été acceptés par la *Food and Drug Administration (FDA)* pour leurs applications *in vivo* il y a plusieurs dizaines d'années. Ce sont des matériaux hydrophobes. Certains sont commercialisés tels que les fils de suture Vicryl® (90% d'acide glycolique et 10% d'acide lactique), polyglactine®, polysorb®, etc.

Nous nous sommes intéressés en particulier à trois polyesters et leurs copolymères :

- Acide polylactique (PLA)
- Acide polyglycolique (PGA)
- Acide poly(lactique-co-glycolique) (PLGA)
- Poly- ϵ -caprolactone (PCL)
- Acide poly(lactique-co-caprolactone) (PLCL)

La figure 1.1 présente les formules moléculaires des trois polyesters précités.

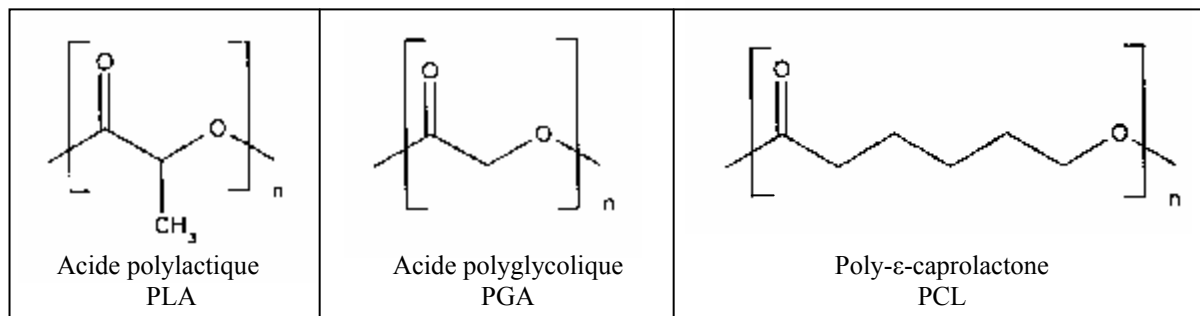


Figure 1.1 : Formule développée des trois principaux polyesters.

En raison de la présence d'un carbone asymétrique, l'acide lactique existe sous les formes L-lactique et D-lactique. Il en résulte l'existence de deux familles de PLA :

- l'acide poly-L-lactique (PLLA),
- les copolymères acide poly-D,L-lactique (PDLA).

L'acide D-lactique est impossible à synthétiser sans produire son énantiomère. Les propriétés intrinsèques de ces polyesters varient principalement en fonction de la masse molaire moyenne (M_w), du rapport massique des monomères, du taux de cristallinité, de l'orientation des chaînes.

1.1.2 Propriétés physiques des polyesters

Le tableau 1-1 présente certaines propriétés thermiques des polyesters retenus pour leur biocompatibilité.

Tableau 1-1 : Propriétés thermiques des principaux polyesters : T_g , température de transition vitreuse, T_f : température de fusion. Données provenant de Alkermes Inc., (LA/GA) et (LA/CL) rapport massique des monomères.

		T_g [°C]	T_f [°C]	Taux cristallin X_c [%]
PLLA		56-60	173-180	40%
PGA		35-40	225-230	> 40%
PLGA (LA/GA)				
Rapport massique des monomères	(90/10)	35-45	180-200	-
	(85/15)	50-55	-	amorphe
	(75/25)	48-53	-	amorphe
	(50/50)	43-48	-	amorphe
PCL		(-65)-(-60)	60	-
PLCL (LA/CL)				
	(85/15)	20-25	-	amorphe
	(75/25)	20-25	-	amorphe

Les faibles températures de transition vitreuse, (T_g) qui représente la température en dessous de laquelle les chaînes du polymère sont immobiles, du PCL et de ses copolymères vont engendrer à température ambiante des propriétés mécaniques différentes de celles du PLA et du PGA comme le montre le tableau 1-2.

Tableau 1-2 : Propriétés mécaniques des principaux polyesters :

* tiré de [YAN 01] et ** Alkermes.

	Résistance à la traction [MPa]	Elongation à rupture [%]	Module de Young [GPa]
PLLA*	66	3,1-5,8	2,8-4,2
PDLA*	27,6-41	3-10	1,4-2,8
PGA*	> 68,9	15-20	> 6,9
PLGA (LA/GA)			
(90/10)*	41,4-55,2	3-10	1,4-1,8
(50/50)**	0,6	5	1,3
PCL*	20,7-34,5	300-500	0,21
PLCL (LA/CL)**			
(50/50)	0,55	> 1000	0,7
(75/25)	10,25	> 400	-
(85/15)	22,5	> 400	-

Le PLLA est un matériau fragile qui supporte mal les déformations en traction, son élongation à rupture étant de 3 à 6%. Bien que possédant un module de Young plus élevé, le PGA reste peu élastique pour un polymère (élongation à rupture entre 15 et 20%). En revanche, la PCL et ses copolymères font preuve d'une très grande élongation à rupture (> 300%). Un classement croissant en terme d'élasticité peut être établi : PLLA < PGA < PCL.

Les caractéristiques mécaniques répertoriées précédemment sont valables pour des milieux continus. Par essence, la matrice que nous cherchons à élaborer doit être très poreuse. Ainsi, les propriétés mécaniques vont indubitablement chuter, bien que conservant la même tendance.

Cependant, outre les caractéristiques mécaniques, un autre paramètre est à prendre en compte : il s'agit de la dégradation du polymère.

1.1.3 Dégradation des polyesters

La dégradation d'un polymère est la détérioration des propriétés due à un changement de la structure chimique [LI 95]. Dans le cas des polyesters aliphatiques, la photodégradation sera écartée, étant donné qu'elle sera ici négligeable lorsque comparée à d'autres mécanismes de dégradation (mécanique, chimique notamment).

L'avantage des polyesters réside dans le fait que leurs produits de dégradation sont, en règle générale, assimilés par l'organisme. Il en découle leurs applications dans le biomédical. Il existe deux voies principales de dégradation des polyesters : l'hydrolyse et la dégradation enzymatique. L'hydrolyse étant le processus principal de dégradation, elle seule sera traitée.

1.1.3.1 Principe de la dégradation

La présence de la liaison ester dans le squelette du polymère permet, *via* son hydrolyse, la scission de la chaîne polymère. On rappelle que l'obtention d'un ester se fait lors de la réaction équilibrée entre un acide carboxylique et un alcool, produisant aussi une molécule d'eau (formule 1.1).



L'hydrolyse d'un ester conduit donc à la production d'un acide et d'un alcool (sens 2). Cette réaction peut être catalysée par des acides et des bases. Ainsi, l'acide carboxylique issu de la dégradation est capable d'accélérer l'hydrolyse de la liaison ester. Ce phénomène est appelé autocatalyse.

Dans le cas des polyesters, la réaction va aboutir à la scission de la chaîne en deux, l'une, ayant à son extrémité une fonction acide carboxylique et l'autre, une fonction alcool (formule 1.2)



Par conséquent, la chaîne possédant le groupe acide va accélérer encore la réaction d'hydrolyse.

L'hydrolyse d'un polyester suit toujours le même schéma. L'eau diffuse préférentiellement dans les zones amorphes du matériau initiant sa dégradation par la scission aléatoire des liaisons esters. On observe alors une chute du poids moléculaire moyen M_w . Les chaînes de polymère devenant, en raison de leur propre scission, de plus en plus petites, gagnent en mobilité et vont cristalliser [GÖP 96]. Une fois que l'eau a pu pénétrer dans les cristaux, la dégradation s'accélère jusqu'à l'obtention de chaînes à petites M_w , qui pourront elles-mêmes diffuser à travers le matériau entraînant une perte de masse et un ralentissement de la vitesse de scission des liaisons esters [PIT 81], ce qui constitue le phénomène d'érosion. Il apparaît que pour les pièces de grande taille la dégradation est plus rapide en masse qu'en surface. Ce phénomène a lieu en raison de l'autocatalyse plus forte en masse qu'en surface. La figure 1.2 illustre les étapes de cette dégradation [LI 95].

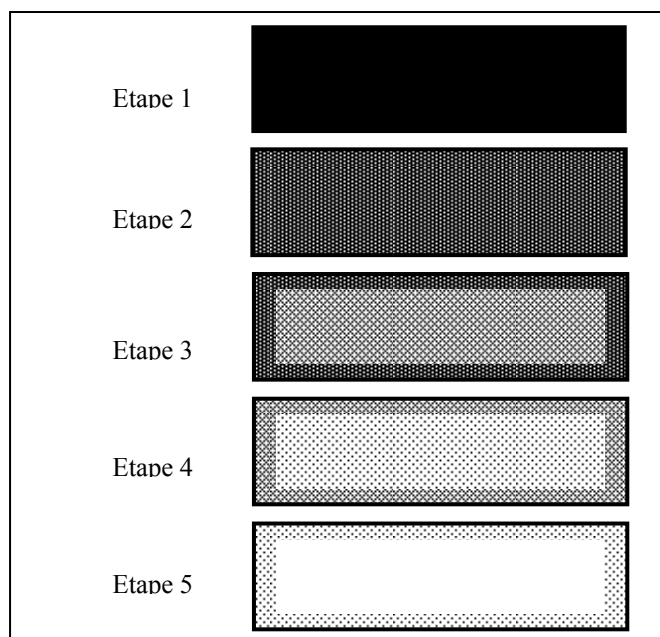


Figure 1.2 : Description du progrès de l'hydrolyse autocatalysée des polyesters de grande taille, dégradation en masse [LI 95].

La première étape décrit l'état du polymère. On estime qu'il est homogène dans le sens où la M_w est la même dans toute la matrice. Une fois placé dans un milieu aqueux (étape 2), la diffusion des molécules d'eau à travers le matériau permet le début de l'hydrolyse des liaisons esters. Lors de cette étape, la vitesse de dégradation de la surface est supérieure à celle qu'on trouve en masse car le gradient d'eau absorbé est décroissant en fonction de la profondeur. Cependant, les vitesses de dégradation vont s'inverser au cours du temps.

La réaction est autocatalysée de par la formation d'un nouveau groupe carboxyle lors de l'hydrolyse d'une chaîne. Cependant, les chaînes de basses M_w (oligomères) issues de la dégradation, lorsqu'elles sont formées à la surface du matériau, diffusent et sont solubilisées par le milieu de dégradation réduisant la concentration en groupement acide. Il en résulte une réduction de l'autocatalyse en surface conduisant à un ralentissement de la vitesse de dégradation. Le gradient d'acidité étant inversé, c'est-à-dire que l'intérieur du matériau est plus acide que la surface, la dégradation est alors plus rapide en masse qu'en surface (étape 3).

Lorsque les oligomères de l'intérieur du matériau sont devenus assez petits pour être solubilisés par le milieu, ils diffusent rapidement dans celui-ci à travers le matériau. Ce dernier se "vide" (étape 4). Finalement la peau du matériau se dégrade moins rapidement (étape 5).

Une conséquence immédiate de ce processus est que les dimensions d'une matrice de polyester ne varient que peu pendant la dégradation du matériau.

1.1.3.2 Facteurs affectant la dégradation

Ces facteurs sont à classer en deux catégories : les facteurs intrinsèques (le type de polyester, sa M_w , etc.) et les facteurs extrinsèques (pH du milieu, température, etc.).

1.1.3.2.1 Facteurs intrinsèques

➤ Type de polymère

Le type de polymère détermine la durée de dégradation. Le PGA est le polyester qui se dégrade le plus rapidement (quelques semaines) car la présence d'une liaison C-H jouxtant la liaison ester permet une accessibilité accrue de l'eau permettant la scission des chaînes. Le PLA se dégrade moins vite (de plusieurs mois à plusieurs années) car il y a un groupement CH_3 à proximité de la liaison ester ce qui réduit l'accessibilité de l'eau. La PCL se dégrade encore plus lentement (~ 3 ans) [LI 95] en raison notamment de sa grande hydrophobie.

➤ Composition chimique et configuration structurelle

La composition a une influence très importante sur la vitesse de dégradation. De manière générale et à de rares exceptions près, les homopolymères ont une durée de dégradation plus longue que leurs copolymères associés. Par exemple, les copolymères PLGA sont résorbés dans les 60 jours alors que le PLA peut nécessiter jusqu'à deux ans [MIL 77] pour être dégradé. Les unités d'acide polyglycolique sont dégradées plus rapidement que les unités d'acide lactique. Pour ces copolymères, un ordre de vitesse de dégradation peut être présenté :



Les copolymères PLCL suivent le même principe, c'est-à-dire que leur dégradation est plus rapide que les homopolymères correspondants.

➤ M_w et la distribution de la M_w

La valeur de la M_w ou bien de la M_n est l'un des facteurs les plus importants. Pitt et *al.* ont montré que des films de PLA de $M_n = 14\,000$ g/mol se dégradent plus rapidement que ceux ayant une $M_n = 49\,000$ g/mol [PIT 81] (on passe en effet de 28 semaines pour les premiers à 60 semaines pour les seconds en terme de résorption totale). D'autres auteurs ont montré cette même tendance pour l'ensemble des polymères PLGA.

La distribution des M_w joue un rôle majeur étant donné le caractère autocatalytique de la dégradation. Lorsqu'un polymère possède une M_w élevée et une distribution des M_w étroite, la

résistance à la dégradation est plus forte que pour un même polymère dont la distribution est élargie. Vert et *al.* ont montré que l'élimination des faibles M_w permet d'augmenter significativement la durée de dégradation [LER 76]. En conclusion, plus la M_w est faible, plus la dégradation est rapide.

➤ Morphologie

La morphologie regroupe l'état de cristallinité et l'orientation des chaînes.

○ Cristallinité

Le taux de cristallinité est très important puisque la dégradation des polyesters se produit préférentiellement dans les zones amorphes du matériau. Plus le taux de cristallinité est élevé, plus la dégradation est lente. On observe cependant une recristallisation due à la plus grande mobilité des chaînes issues de la dégradation.

○ Orientation des chaînes

Si les chaînes polymères ne sont que peu orientées, la dégradation se fera d'autant plus vite, puisque l'orientation des chaînes d'un polymère revient à favoriser la formation de cristaux.

A ces facteurs propres au matériau, s'ajoute l'action de l'environnement dans lequel évolue le polymère.

1.1.3.2.2 Facteurs extrinsèques

➤ Taille et géométrie

La taille et la géométrie de l'objet jouent des rôles prépondérants dans la dégradation des polyesters. Il apparaît que plus la taille est petite, plus la dégradation est lente, la dégradation en masse n'intervenant pas dans les géométries à faible taille. Ainsi des billes se dégradent plus vite que des fibres [GIN 87].

➤ Milieu de dégradation

Le milieu va influencer sur la vitesse de dégradation de par son pH, sa force ionique, et sa concentration en sel. Les solutions alcalines dégradent rapidement le PLA. Il apparaît qu'un milieu neutre augmente le temps de dégradation [CHU 82].

➤ Température

La température va permettre, si elle augmente, une plus grande mobilité des espèces chimiques et ainsi faciliter la diffusion des molécules d'eau, favorisant alors la dégradation.

Pour résumer ce paragraphe, il semble que les polyesters peuvent répondre à plusieurs critères du cahier des charges. Ils sont biodégradables et leurs propriétés mécaniques peuvent être ajustées. Leur utilisation comme matériel de suture laisse bien évidemment présager de leur biocompatibilité. Cette biocompatibilité doit cependant être testée puisqu'elle peut être affectée par le procédé de fabrication, le savoir-faire de l'expérimentateur et les traitements de post-fabrication. Comme il sera montré dans le reste du mémoire, les techniques de mise en forme des polyesters nécessitent, en règle générale, l'utilisation de solvants organiques qui peuvent altérer le caractère biocompatible du matériau. En utilisant une solution de polymère et en l'étalant sur une plaque, il est possible de fabriquer des films qui serviront à montrer que la technique que nous employons permet d'obtenir des structures biocompatibles. C'est ce dont on se propose d'effectuer dans la section suivante.

1.2 Etude de biocompatibilité des polyesters

L'objectif de cette étude est de prouver la non-toxicité de films de polyesters fabriqués au laboratoire. Il s'agit de tester la nocivité des solvants organiques utilisés dans leur fabrication, en partant du principe que si des films sont toxiques, alors les structures tridimensionnelles le seront puisque l'élimination du solvant est moins aisée pour ces dernières en raison de leurs géométries complexes.

1.2.1 Matériels et méthodes

1.2.1.1 Matériels

1.2.1.1.1 Polymères

Plusieurs polyesters ont été sélectionnés pour cette étude de biocompatibilité en raison de leur utilisation fréquente en ingénierie tissulaire comme nous l'avons mentionné dans le premier paragraphe :

- PCL ($M_n = 80\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), Sigma-Aldrich, France
- Acide poly(DL-lactique) (PDLA) ($M_n = 90\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), Sigma-Aldrich, France
- PLLA ($M_n = 302\ 000\ \text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$), Boehringer Ingelheim, Allemagne
- PLCL (LA/LC : 70/30, i.v. (viscosité intrinsèque) $1,4\ \text{dL}\cdot\text{g}^{-1}$), Boehringer Ingelheim, Allemagne

Des membranes de Silicone (Si) ont été aussi testées en raison de leur utilisation assez fréquente comme support de culture.

1.2.1.1.2 Solvant

- Chloroforme (CF) (bio-tech grad), Sigma-Aldrich, France.

1.2.1.2 Préparation des membranes

1.2.1.2.1 Fabrication

Les films de polyesters ont été fabriqués en utilisant une technique de *solvent casting*. Celle-ci consiste à dissoudre les polymères dans un solvant, puis à déposer une quantité définie de solution dans un moule. Une fois le solvant évaporé, on obtient une membrane plus ou moins épaisse. 3 mL de solution de PCL, PLCL et PDLA à 5% (m/vol) dans le chloroforme sont déposés de manière homogène, en évitant la formation de bulles, dans un moule en verre (50 x 90 mm²). Nous disposons les moules sous sorbonne aspirante pour laisser le chloroforme s'évaporer. Deux nouveaux castings de 3 mL sont alors effectués successivement afin d'obtenir une membrane facilement manipulable. Par conséquent, 9 mL de solution sont utilisés afin de fabriquer les films. Pour le PLLA, la concentration a dû être ajustée à 2% étant donné la haute viscosité de ce polymère et le film de PLLA est obtenu de façon similaire aux autres films.

Les films de polyesters sont ensuite placés dans une enceinte sous vide afin de procéder à l'élimination du solvant résiduel qu'elles contiennent encore. Ce traitement à basse pression (20 mbar) est réalisé pendant 12 h.

Afin de procéder aux tests de viabilité, les membranes sont découpées en disques de 9 mm de diamètre.

1.2.1.2.2 Stérilisation

La stérilisation des disques de polyesters a été effectuée en les immergeant dans de l'éthanol à 75° pendant 30 min. Ils sont ensuite rincés 3 fois de suite par de l'HBSS et exposés à une irradiation UV (lampe UV, Fisher-Bioblock France) pendant 30 min.

1.2.2 Caractérisation des membranes

L'épaisseur des membranes a été mesurée en utilisant un micromètre (Mitutoyo 1300, Japon). La morphologie et la rugosité des films ont été évaluées par microscopie de force atomique (AFM) et en utilisant le logiciel Nanoscope III pour évaluer leur impact sur l'adhésion et la prolifération cellulaire. Afin d'obtenir des données statistiques, 3 échantillons ont été utilisés pour chaque type de membrane.

1.2.3 Culture cellulaire et test de biocompatibilité

1.2.3.1 Milieu de culture

- Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM), Gibco, France
- Sérum de veau 10% (vol/vol), Gibco, France
- Pénicilline (100 U.mL⁻¹) Gibco, France
- Streptomycine (100 µg.mL⁻¹), Gibco, France
- Fungizone (2,5 µg.mL⁻¹), Gibco, France
- L-glutamine (4 mM), Gibco, France
- Acide ascorbique (150 µg.mL⁻¹) et NaHCO₃ (1,5 mg.mL⁻¹) Sigma-Aldrich, France

1.2.3.2 Tests de biocompatibilité

Une lignée de fibroblastes humains (CRL 2703) a été employée pour tester la biocompatibilité des films de polyesters. Les cellules ont été cultivées dans des boîtes de culture de 75 cm² jusqu'à confluence. Les fibroblastes ont été décollés de leur support de culture par l'action de 10 mL de trypsine (0,125 mg.mL⁻¹) pendant 5 min à 37°C, puis centrifugés à 400 g pendant 10 min. Une fois le surnageant éliminé, les cellules sont re-suspendues dans du milieu. 20 000 fibroblastes entre passage 13 (P13) et 15 ont étéensemencés par sédimentation sur les films. Pour chaque type de matériau, n = 3 x 2. Des puits de culture ont aussi étéensemencés à la même densité pour servir de contrôle positif durant les expériences.

L'activité métabolique des fibroblastes sur les différents supports de culture a été mesurée à J1, J7, J14, J21 et J28 en utilisant le test de viabilité Alamar Blue.

500 µL d'une solution à 10% d'Alamar Blue dans du DMEM sans rouge de phénol sont versés dans chaque puits. Des puits de culture sans cellules font office de témoins négatifs. La plaque de culture est ensuite placée à 37°C pour une incubation de 90 min. Ensuite les solutions sont prélevées et leurs absorbances sont mesurées à 570 et 630 nm en utilisant un spectrophotomètre (DU 640, Beckman USA). Le pourcentage de réduction de la molécule d'Alamar Blue a été calculé en fonction de l'équation (1.3) :

$$\%_{red} = \frac{(\epsilon_{ox}\lambda_{630} \times A_{570}) - (\epsilon_{ox}\lambda_{570} \times A_{630})}{(\epsilon_{red}\lambda_{570} \times A'_{630}) - (\epsilon_{red}\lambda_{630} \times A'_{570})} \times 100 \quad (1.3)$$

avec,

$\epsilon_{ox}\lambda_{570} = 80,586$, coefficient d'extinction de la molécule oxydée à 570 nm

$\epsilon_{ox}\lambda_{630} = 34,798$, coefficient d'extinction de la molécule oxydée à 630 nm

$\epsilon_{red}\lambda_{570} = 155,677$, coefficient d'extinction de la molécule réduite à 570 nm

$\epsilon_{\text{red}}\lambda_{630} = 5,494$, coefficient d'extinction de la molécule réduite à 630 nm

A_{570} , A_{630} , A'_{570} et A'_{630} représentant respectivement l'absorbance de l'échantillon et du témoin négatif à 570 et 630 nm.

1.2.3.3 Statistiques

Un test de Student a été réalisé pour chaque expérience et le seuil de significativité a été fixé à $p < 0,05$.

1.2.4 Résultats et discussion

1.2.4.1 Caractérisation des membranes

L'épaisseur des membranes a été mesurée en utilisant un micromètre. Les résultats obtenus sont listés dans le tableau 1-3.

Tableau 1-3 : Epaisseur et rugosité des films de polyester et de silicone.

	Epaisseur [mm]	Rugosité [nm]
PCL	$0,070 \pm 0,006$	120 ± 33
PLCL	$0,061 \pm 0,014$	20 ± 1
PLLA	$0,046 \pm 0,005$	$7,0 \pm 0,5$
PDLA	$0,103 \pm 0,016$	4 ± 1
Silicone	$0,241 \pm 0,007$	-

L'épaisseur des membranes des films de polyesters varie de 40 à 100 μm alors que celle des membranes de silicone est de 240 μm . La différence d'épaisseur entre les membranes provient de la différence de viscosité des solutions employées due à la masse molaire des polymères et de leurs solubilités dans le chloroforme.

La rugosité des films a été mesurée par AFM en scannant une zone de $40 \times 40 \mu\text{m}^2$. La membrane de silicone n'a pas pu être analysée pour des raisons techniques liées essentiellement à sa trop grande flexibilité. Il apparaît que les membranes de PLLA, PDLA et de PLCL possèdent une surface relativement homogène avec une rugosité faible (de 4 à 20 nm) comme le montre le tableau 1-3. Le PDLA possède la rugosité la plus faible (4 nm) et cette valeur est significativement différente comparée à celles des autres polyesters. La PCL possède une rugosité assez élevée de 120 nm. Ceci peut s'expliquer par la présence de macrostructures formées lors de l'évaporation du chloroforme comme le présente la figure 1.3 a).

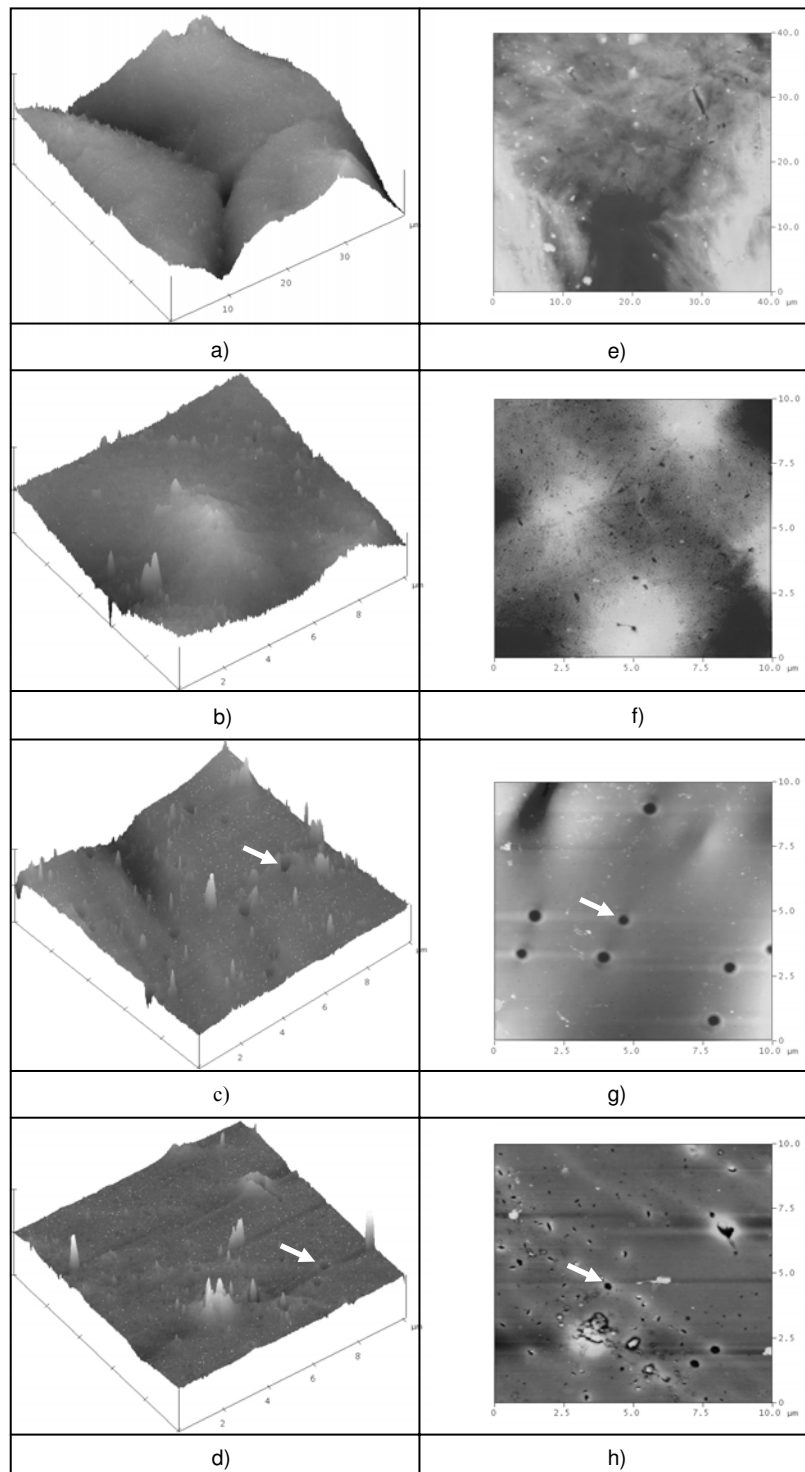


Figure 1.3 : Morphologie des films de polyesters. Microscopie de force atomique (AFM). a) PCL, b) PLCL, c) PLLA, d) PDLA. Rugosité des films, e) PCL, f) PLCL, g) PLLA, h) PDLA. Les flèches blanches indiquent des trous typiques d'évaporation du solvant.

Les autres films de polyesters possèdent une surface relativement plane (cf. figure 1.3 c), e) et f)) comparé à celle de la PCL, et la rugosité totale de ces films est plus petite. Cependant, il est possible d'observer sur ces membranes des cavités provenant de l'évaporation du chloroforme (figure 1.3 g) et h)).

Le procédé de mise en forme influe conséquemment sur la rugosité et la morphologie des membranes. Serrano et *al.* en utilisant un procédé de pressage à chaud dans des moules de métal, ont montré que des films de PCL possèdent une plus faible rugosité (62 nm) [SER 04] que celles obtenues dans cette étude préliminaire. Aussi, la morphologie des membranes de PCL en est affectée, ces membranes ne possédant pas de macrostructures. La rugosité des membranes de polyesters, qui semble par ailleurs avoir une importance dans les mécanismes d'adhésion cellulaire peut être augmentée en utilisant des attaques acides ou basiques. Plusieurs travaux ont montré qu'un traitement à la soude ou à l'acide provoque une hydrolyse de surface des polyesters [TSU 03]. Pour des traitements avec NaOH de 0,01 à 4 N s'étalant sur jusque 48 h, la perte de masse des membranes est inférieure à 1% du poids initial pour des membranes de PLLA et de PCL. Aussi, la masse molaire reste constante. L'hydrolyse de surface obtenue par ce type de traitement s'accompagne d'une élévation de la rugosité facilitant probablement l'adhésion cellulaire [GAO 98] [HAR 04]. En outre, un traitement de plusieurs heures avec de la soude 0,01N permet de diminuer l'angle de contact de près de 50% de sa valeur initiale [TSU 03]. Les polyesters étant des matériaux hydrophobes, si la mouillabilité du polymère est accrue, l'adhésion cellulaire en sera très probablement améliorée.

1.2.4.2 Biocompatibilité

La biocompatibilité des membranes a été testée en utilisant la lignée de fibroblastes humains (CRL 2703) à une densité d'ensemencement de 20 000 cellules par membrane. La viabilité des fibroblastes a été évaluée jusqu'à 28 jours de culture en employant le test de viabilité Alamar Blue. Les résultats de ces expériences sont rassemblés dans la figure 1.4. L'évolution du pourcentage de réduction, équivalent à un nombre de cellules, suit la même tendance pour tous les matériaux. En effet, après une rapide augmentation du pourcentage de réduction après une semaine de culture, celui-ci augmente moins vite et semble se stabiliser.

Cette stabilisation peut éventuellement s'expliquer par la colonisation de l'ensemble de la surface de culture empêchant ainsi la poursuite de la prolifération cellulaire.

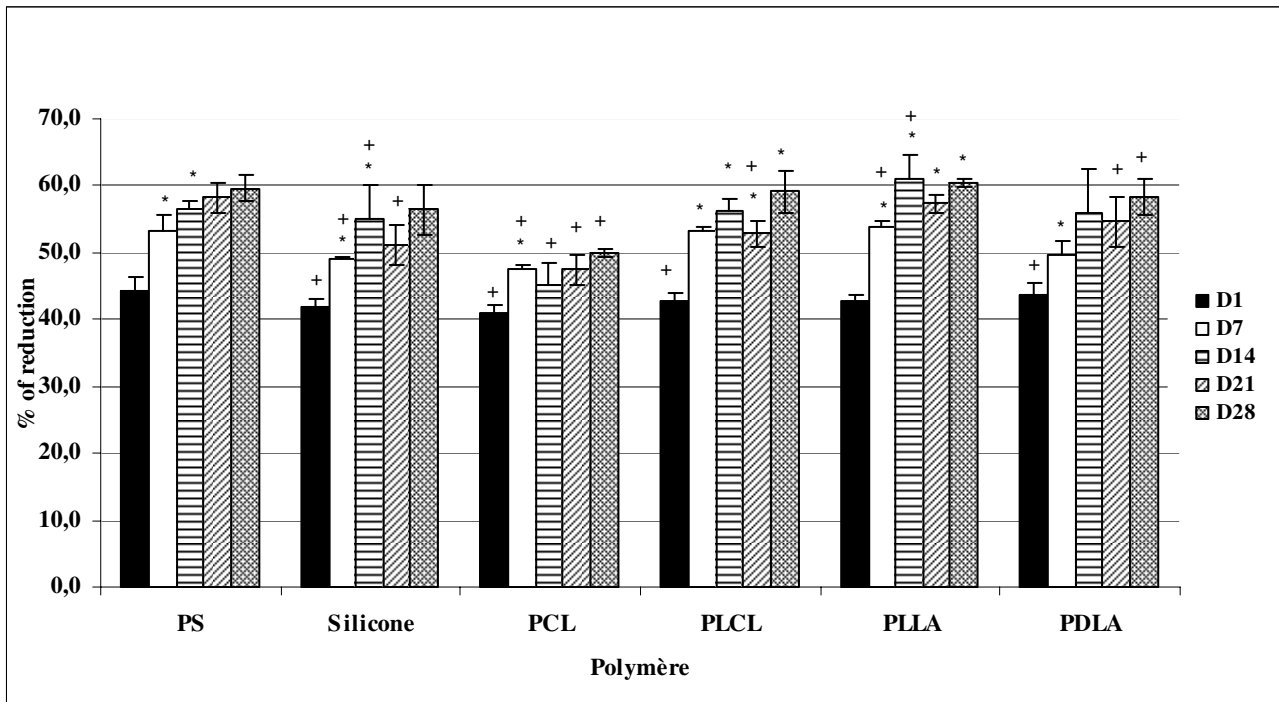


Figure 1.4 : Evolution du pourcentage de réduction de l'Alamar Blue de différentes membranes en fonction du temps. PS = puits de culture, PCL = Polycaprolactone, PLCL = acide poly(L-lactique-co-caprolactone) (70/30), PLLA = acide poly-L-lactique, PDLA = acide poly(D,L-lactique). * $p < 0,05$ même matériau comparé à la mesure de la semaine précédente. + $p < 0,05$ même jour de mesure comparé au contrôle positif PS.

Le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue après 24 h de culture est le plus élevé pour le puits témoin. Ceci met en évidence que le caractère hydrophobe des membranes de polyesters est un frein pour l'adhésion cellulaire. Ce phénomène a déjà été constaté [OUY 02] [SER 04]. Cependant, l'hydrophobie des films de polyesters, bien que diminuant le nombre de cellules adhérentes, n'est pas un facteur limitant de prolifération puisque le pourcentage de réduction augmente durant les quinze premiers jours pour tous les films, excepté pour la PCL. Les faibles valeurs du pourcentage de réduction obtenues pour les membranes de PCL peuvent s'expliquer par sa plus grande hydrophobie. Ces faibles valeurs de réduction semblent contradictoires avec l'énoncé cité précédemment stipulant que l'augmentation de la rugosité devrait favoriser l'adhésion cellulaire. Cependant, la valeur élevée de la rugosité de la membrane de PCL provient de la présence de macrostructures résultantes de l'évaporation du solvant. De nombreux auteurs ont montré qu'une attaque basique ou acide, augmentant la rugosité des films de polyesters, permet une adhésion cellulaire plus importante [KWO 01] [KHA 02] [LEE 02b] [HAR 04] [PAR 05]. En effet, la mouillabilité des substrats étant

meilleure, les cellules adhèrent en plus grand nombre. Serrano et *al.* ont analysé uniquement l'effet de la rugosité de films de PCL sur l'adhésion cellulaire. Le procédé de mise en forme (le pressage à chaud) permet de varier la morphologie des films en changeant la rugosité du moule utilisé. Ils n'ont ainsi pas utilisé de traitements alcalins pour augmenter la rugosité des membranes.

Contrairement à notre attente, l'adhésion cellulaire n'est pas améliorée pour les membranes plus rugueuses. Ceci montre que la rugosité n'est pas le facteur déterminant de l'augmentation du nombre de cellules adhérentes. Une explication pouvant être avancée est que, lorsque la rugosité des films est augmentée par une attaque physico-chimique, la densité des groupements d'acide carboxylique et hydroxyle à la surface de la membrane augmente [KHA 02]. Aussi, il semble que le paramètre influant sur l'adhésion cellulaire soit la densité d'acide carboxylique pouvant se lier aux protéines grâce à leurs N-terminaux.

Ces expériences ont cependant montré que les fibroblastes ont survécu et proliféré sur les membranes de polyesters aliphatiques durant 28 jours consécutifs. L'utilisation de ces matériaux et leur mise en forme par la technique de « *solvent casting* » sont validées.

1.3 Conclusion

Cette étude préliminaire a permis de sélectionner la gamme de matériaux qui sera utilisée dans notre stratégie d'ingénierie tissulaire. Les polyesters aliphatiques connus depuis plusieurs années pour leurs applications dans le domaine biomédical seront employés dans la suite des travaux en raison de leur biocompatibilité, de leurs propriétés de dégradation, et en raison du fait qu'il est possible dans une certaine mesure d'ajuster leurs propriétés mécaniques. L'étude de biocompatibilité sur les membranes de polyesters a pu entériner le *solvent casting* comme technique de fabrication. Dans le chapitre suivant nous présentons le procédé utilisant la technique de *solvent casting* afin de fabriquer des structures tridimensionnelles.

Partie 2

2 Elaboration de scaffolds possédant des pores sphériques et interconnectés

Le cahier des charges, défini en partie introductive, met en évidence la nécessité de fabriquer des structures poreuses et interconnectées. Les autres critères du cahier des charges semblent être, *a priori*, vérifiés par l'emploi de polyesters aliphatiques, matériaux dont on a vu qu'ils sont biodégradables, biocompatibles et dont on peut ajuster, dans une certaine mesure, leurs propriétés mécaniques. Il convient désormais d'étudier les procédés de fabrication permettant d'élaborer des structures tridimensionnelles. Les techniques d'élaboration de scaffolds pour l'ingénierie tissulaire sont excessivement nombreuses. Aussi est-il nécessaire de les décrire et d'exposer leurs points forts et leurs limitations. Ce chapitre s'articule donc autour de deux axes principaux : dans le premier, les différents procédés disponibles sont présentés avant de définir les objectifs qu'on se fixe ; le deuxième axe traite de la technique qui a été employée au laboratoire afin de fabriquer des structures tridimensionnelles. Cette partie expérimentale englobe les différentes évaluations tant morphologique, mécanique, que biologique qui ont été effectuées afin de caractériser les scaffolds.

2.1 Méthodes de fabrication classiques des scaffolds

Parmi les procédés abordés dans ce chapitre, la technique d'*electrospinning* n'y est pas traitée car elle fait l'objet de la partie 3.

2.1.1 Solvent casting/Particulate leaching out (SC/LO)

La technique de *solvent casting/particulate leaching out* est très probablement la technique la plus employée dans les laboratoires de recherche afin de fabriquer des structures tridimensionnelles. Il existe un nombre toujours grandissant de publications utilisant cette technique. Il serait quelque peu fastidieux de dresser une liste de ces publications, aussi, nous nous attacherons à citer celles qui apportent des innovations concernant ce procédé. Le procédé de *solvent casting/particulate leaching out* repose sur un principe simple : l'ajout d'un porogène, généralement une poudre, dans une solution de polymère. Il est aussi possible d'effectuer le contraire, c'est-à-dire l'ajout d'une solution de polymère dans un assemblage de porogène. Ceci constitue l'étape de *solvent casting*. Lorsque le solvant de la solution de polymère s'est évaporé, on élimine le porogène en immergeant le solide obtenu dans un autre solvant. C'est l'étape de *leaching out*. L'élimination du porogène libère l'espace qu'il occupait produisant ainsi une structure poreuse [MIK 94]. Les solvants utilisés dans ce procédé doivent être choisis avec discernement puisqu'il est nécessaire que le solvant du polymère soit un non-solvant du porogène et réciproquement, le solvant du porogène qui est employé lors de l'étape de *leaching out* doit être un non-solvant du polymère.

Ce procédé peut être employé pour un grand nombre de polymères synthétiques et naturels. Les polymères les plus employés sont naturellement les polyesters aliphatiques mais, d'autres polymères tels que du poly-éthylacrylate-co-hydroxyéthylméthacrylate [BRI 05], les poly-hydroxybutyrates [CAI 03], et des polymères naturels tels que la chitine [WEN 01], la gélatine [KAN 06] sont aussi utilisés.

La figure 2.1 présente la morphologie typique des scaffolds issus de cette technique.

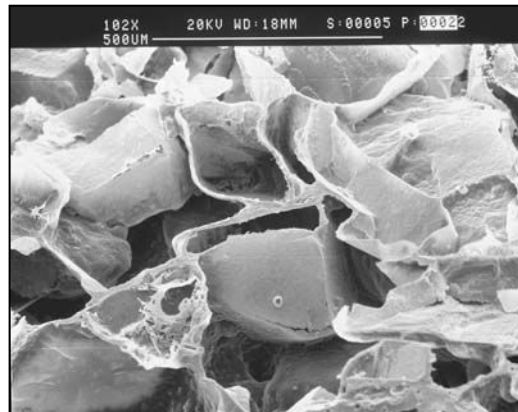


Figure 2.1 : Morphologie des mousses issues du *solvent casting/particulate leaching out*.

2.1.1.1 Paramètres influençant le procédé

2.1.1.1.1 Influence de la concentration de la solution de polymère

Plus la solution est concentrée, plus la quantité de matière apportée au système est importante, et plus le scaffold est dense [ZHA 99] [MA 01] [HOU 03].

2.1.1.1.2 Influence du porogène

➤ Fraction massique de porogène

Ce procédé permet d'ajuster la porosité des structures par la variation de la fraction massique de porogène introduit. Mikos et *al.* [MIK 94] ont fabriqué des membranes dont la porosité varie entre 40 et 90%. En effectuant une étude quasi systématique avec différents porogènes et différentes fractions massiques, ces auteurs ont observé un rapport linéaire entre la porosité et la fraction massique de porogène. Il existe néanmoins une autre possibilité pour ajuster la porosité des structures en jouant sur la concentration de la solution.

➤ Taille des particules du porogène

D'un point de vue morphologique, il est évident que la taille et la forme des pores du scaffold dépendent de celles du porogène. Une séparation des tailles de particule, par un tamisage, permet la fabrication de scaffold possédant des pores plus ou moins petits. D'après Mikos et *al.* [MIK 94], la taille des particules ne semble pas affecter de façon significative la valeur de la porosité si la fraction massique du porogène est constante.

➤ Nature du porogène

L'emploi de différents porogènes ne semble pas affecter, non plus, la porosité globale du scaffold si les masses volumiques des porogènes restent assez proches. Mikos et *al.* n'ont pas observé de différence entre des scaffolds fabriqués avec du chlorure de sodium, du citrate de sodium et du tartrate de sodium.

La nature du porogène peut dans certains cas permettre une modification de sa géométrie. En comparant des structures possédant des pores sphériques, obtenus grâce à de la paraffine, et des pores rectangulaires, obtenus grâce à l'emploi de chlorure de sodium, il a été montré que pour des conditions constantes (fraction massique, concentration de la solution de polymère, volume de solution) les scaffolds utilisant de la paraffine comme porogène possèdent une porosité plus élevée [ZHA 05a]. La densité de la paraffine étant plus petite que celle du chlorure de sodium, la porosité du scaffold s'en trouve modifiée. La compaction et l'arrangement spatial peuvent en outre influencer sur la porosité de la mousse.

Les porogènes employés pour ce procédé peuvent être divisés en deux branches distinctes, les porogènes inorganiques, et les porogènes organiques.

○ Porogènes inorganiques

Les porogènes inorganiques traditionnellement utilisés sont le sel, le sucre en raison de leur abondance et de leur bonne solubilité dans l'eau. Cependant, d'autres porogènes sont disponibles. Ainsi qu'il a été mentionné dans le début de ce paragraphe, Mikos et *al.* ont employé du tartrate et du citrate de sodium. On peut également noter l'utilisation de bicarbonate d'ammonium [YOO 04] bien que moins fréquente.

○ Porogènes organiques

L'emploi de porogènes organiques s'est récemment développé afin de modifier facilement la forme des particules. La paraffine permet de fabriquer des microsphères de différents diamètres [MA 01] [MA 03] [CHE 04]. Ma et *al.* ont élaboré des micro-billes de paraffine grâce à une émulsion de paraffine liquide dans une solution aqueuse d'alcool polyvinylique à 60°C [MA 01]. Après un brusque refroidissement de l'émulsion, effectué en ajoutant de l'eau

proche de 0°C, des microsphères solides sont obtenues. Ce procédé permet de changer la morphologie des pores tout en gardant un bon contrôle de la taille des particules. Du polyméthylmétacrylate (PMMA) a été aussi employé pour fabriquer des scaffolds possédant des pores ronds et interconnectés [BRI 05]. L'emploi de ces porogènes organiques nécessite l'utilisation de solvant lors de l'étape de *leaching out*.

La gélatine, polymère dérivé du collagène, intervient aussi comme porogène pour ce procédé [THO 95] [THO 98] [ZHO 05] [LIU 06]. Liu et *al.* ont obtenu des sphères de gélatine par une émulsion d'une solution aqueuse de gélatine dans de l'huile à 45°C [LIU 06]. L'émulsion est refroidie brusquement en ajoutant de l'acétone à -18°C. Les sphères de gélatine sont rincées plusieurs fois dans de l'acétone anhydre en vue d'éliminer l'huile résiduelle. Ensuite, il convient de placer les sphères de gélatine dans un autre solvant organique (dioxane) afin de procéder à l'extraction de l'eau. Les sphères subissent un séchage à froid à -18°C pendant 4 h, puis à -5°C pendant 5 jours. Finalement, elles subissent un séchage à l'air pendant encore 3 jours. Un frittage à 37°C dans une atmosphère saturée en eau pendant une heure est réalisé avant l'étape de *solvent casting*. Une fois le solvant évaporé, la gélatine est éliminée par l'action du cyclohexane pendant plusieurs jours. Ce procédé est relativement innovant puisqu'il n'emploie pas de surfactants dans la préparation de sphères contrairement à d'autres travaux [THO 95] [THO 98].

Plus récemment, Hacker et *al.* [HAC 07] ont développé des porogènes élaborés à base d'un mélange de lipides solides (Softisan[®], Witepsol[®]). Pendant la fabrication de ces microsphères d'un diamètre compris entre la centaine de micromètres et 1 millimètre, les lipides sont fondus puis émulsifiés dans de l'eau à 65°C. Ce mélange est ensuite refroidi pour solidifier le porogène. Ce dernier est extrait en fin de procédé en plaçant les scaffolds dans du *n*-hexane à une température suffisante pour fondre le porogène et augmenter sa solubilité dans ce solvant. Des particules de glace ont été aussi employées [CHE 01] afin de servir de porogène. Cette technique diffère en certains points du SC/LO. On ajoute à la solution de polymère, préalablement refroidie à -20°C, des particules de glace élaborées par pulvérisation d'eau distillée dans de l'azote liquide. Le mélange est placé ensuite dans l'azote liquide puis subit un séchage à froid de 48 h. Ce séchage permet d'éliminer l'eau et le solvant organique. Cette méthode a l'avantage de n'utiliser aucun solvant organique lors de l'étape de *leaching out*.

La température influe fortement sur la géométrie, la taille et la distribution des particules de glace pendant leur mise en forme. Ceci limite le contrôle de la distribution et de la taille des particules. Aussi, la manipulation de ce porogène est assez difficile et nécessite de travailler à

des températures plus basses que celle de la fusion de l'eau. Au final, la maîtrise de la valeur de la porosité, de la forme de pores et de l'interconnectivité n'est pas optimale.

2.1.1.2 Limitations du procédé

2.1.1.2.1 Emploi de solvant organique

L'emploi de solvant organique est la première limitation du procédé. L'utilisation de solvants organiques peut intervenir à différents stades de fabrication, soit pour solubiliser le polymère, soit pour extraire le porogène. Une étape de séchage sous vide doit être réalisée afin de les éliminer au maximum. Si le séchage des structures n'est pas bien effectué, la biocompatibilité est affectée.

2.1.1.2.2 Dimension des scaffolds

La taille des scaffolds produits par ce procédé ne peut excéder plusieurs centimètres. En effet, lorsque les scaffolds sont trop volumineux, il devient difficile d'extraire totalement le porogène. La présence de porogène résiduel peut être un aspect néfaste lorsqu'il s'agit de sel ou de paraffine. Il en est de même pour l'étape de séchage du scaffold. Si celui-ci est trop volumineux, la concentration de solvant résiduel au centre de la structure empêche une colonisation cellulaire de l'ensemble de la structure. Il est cependant possible de fabriquer des structures possédant un volume assez important pour pouvoir les utiliser en ingénierie tissulaire. Il est ainsi possible de fabriquer des structures ayant des dimensions similaires à celles d'un sucre en morceau [HOU 03]. Wu et *al.* [WU 06] ont produit des scaffolds de la taille d'une oreille (6 cm de longueur, 3 cm de largeur).

Lors de l'évaporation du solvant pendant le procédé, le scaffold subit une rétraction due à la solidification de la solution de polymère. Il est difficile de prévoir les dimensions exactes des structures qui sont élaborées par ce procédé. A cela s'ajoute la formation d'une peau de polymère sur les surfaces de scaffolds en contact avec l'air [MIK 94]. Ainsi, il est nécessaire de pratiquer une découpe avant d'utiliser les scaffolds afin d'ajuster les dimensions de celui-ci et d'enlever la peau se trouvant sur les côtés.

2.1.1.2.3 Interconnectivité

L'interconnectivité des structures utilisées dans l'ingénierie tissulaire est un paramètre des plus importants. En effet, il permet la diffusion des gaz et des nutriments et la migration cellulaire. La technique de *solvent casting/leaching out* développée par Mikos n'engendre pas d'interconnexion entre les pores. D'autres techniques s'inspirant de ce procédé ont été

développées afin de palier à ce problème. Murphy et *al.* [MUR 02] ont élaboré un procédé de frittage en atmosphère humide permettant la formation de cols entre les particules du porogène. Ceci permet d'obtenir des pores connectés les uns aux autres. Il en est de même avec l'emploi de particules de paraffine, de sel ou de sucre qui, après avoir subi un frittage à plus ou moins haute température, génèrent des structures interconnectées [MA 01] [HOU 03] [GRO 04] [CHE 04] [ZHA 05a].

Le *solvent casting/leaching out* est une technique d'une grande versatilité qui peut s'appliquer pour un nombre important de polymères et de porogènes à partir du moment où le solvant du polymère est non-solvant du porogène et réciproquement. Malgré les quelques limitations dont elle fait l'objet, elle reste une technique très employée en raison de sa simplicité et du peu d'équipement nécessaire à sa réalisation.

2.1.2 Séparation de phase thermiquement induite (TIPS)

Cette technique est basée sur le fait qu'une solution homogène de polymère est convertie *via* un transfert de chaleur, en une solution non homogène comportant deux phases, l'une riche en polymère et l'autre pauvre en polymère. Typiquement, le transfert de chaleur induisant la séparation de phase s'effectue par un refroidissement brutal appelé trempe. La température de trempe doit être obligatoirement inférieure à la température de solidification du solvant qui est employé. Un séchage à froid permet d'enlever ce solvant et d'obtenir conséquemment un solide micro-structuré [NAM 99].

La procédure de fabrication des mousses par ce procédé suit traditionnellement trois étapes :

- Mise en solution du polymère dans un solvant organique. Celle-ci peut se faire à différentes températures.
- Pré-refroidissement : une trempe intermédiaire s'avère nécessaire afin de pouvoir contrôler le diamètre des pores.
- Trempe à très basse température pour fixer définitivement la microstructure et séchage à froid, afin d'enlever le solvant.

L'intérêt de cette technique réside dans sa capacité à engendrer des structures possédant des morphologies différentes en changeant uniquement quelques paramètres du procédé (concentration de la solution, température et route de la trempe).

2.1.2.1 Paramètres influençant le procédé

La morphologie des mousses peut être ajustée en fonction de la concentration de la solution de polymère mais aussi en fonction de la température et de la route de trempe, du temps de trempe, de l'épaisseur de la membrane, etc.

2.1.2.1.1 Concentration de la solution de polymère

La figure 2.2 présente l'impact de la concentration de polymère sur la morphologie des mousses. Il existe deux zones, l'une métastable et l'autre instable, où les mécanismes de formation des pores sont différents. Dans la région instable ($C'_1 < C < C'_2$), la solution en état d'instabilité se démixe spontanément pour atteindre deux compositions d'équilibre C_1 et C_2 , la décomposition est dite spinodale. Cette séparation de phase intervient spontanément et ne requiert pas d'énergie d'activation. Lorsque la concentration de la solution est comprise entre C_1 et C'_1 ou bien C'_2 et C_2 , la solution est dans la zone de métastabilité et se démixe selon un mécanisme de croissance-nucléation. Lorsque la décomposition est spinodale ($C'_1 < C < C'_2$), les mousses obtenues possèdent une porosité ouverte et interconnectée, en revanche, dans la zone de métastabilité les mousses ont une porosité fermée [HUA 03].

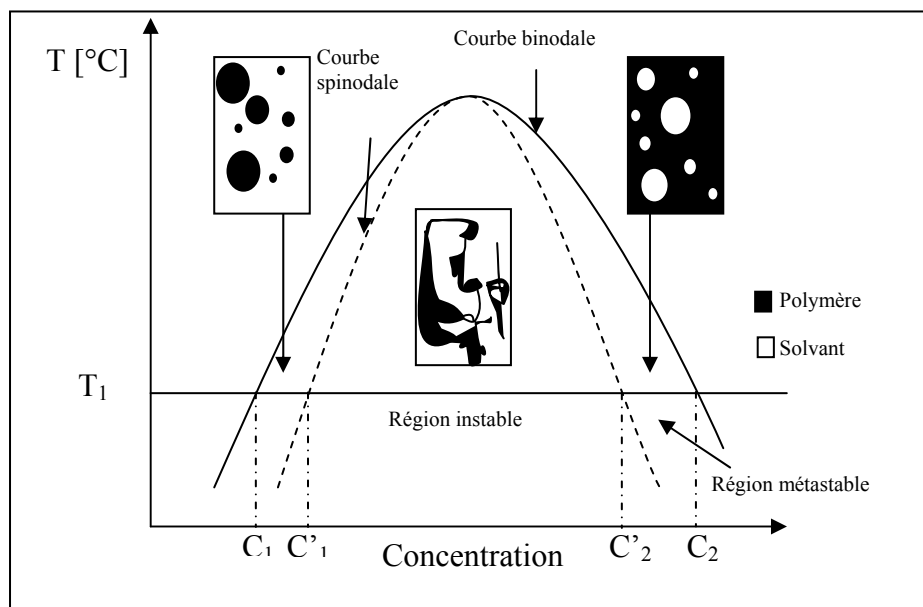


Figure 2.2 : Diagramme de phase binaire montrant les morphologies des mousses obtenues lors de la séparation de phase.

➤ Taille des pores

Plus la concentration est élevée, plus la mousse obtenue sera dense et micro-structurée. Les concentrations plus faibles semblent permettre la formation de pores plus gros. Hua et *al.* [HUA 02] ont rapporté que les faibles concentrations induisent la formation de pores de dimensions plus importantes et qu'elles favorisent une croissance plus rapide de ces mêmes pores. En évaluant la morphologie des mousses obtenues pour une solution à 4,5 et 6% (m/vol) en fonction du temps de trempage intermédiaire (de 2 à 60 min), ces mêmes auteurs ont montré qu'au cours du temps, la taille des pores reste inchangée pour la solution la plus concentrée.

➤ Morphologie des pores

La morphologie des pores peut être ajustée par la concentration de la solution de polymère. Par exemple, lorsque des solutions de PLGA, à différentes concentrations dans du dioxane, sont trempées dans l'azote liquide, la morphologie des pores passe de sphérique pour la solution la moins concentrée, à une morphologie quasi tubulaire pour la solution la plus concentrée [NAM 99].

La viscosité de la solution est liée à la concentration de cette dernière. Les faibles viscosités privilégient la formation de pores de diamètre important dans les premières minutes de la trempage [NAM 99].

2.1.2.1.2 Effet de la température de trempage

La température de trempage a un impact majeur sur la morphologie des mousses. En effet, c'est elle qui contrôle la cinétique du transfert de chaleur entre la solution et le milieu extérieur. Pour une concentration donnée, la température de trempage détermine quel mécanisme de séparation de phase est employé.

Il est généralement admis que les températures de trempage plus élevées induisent la formation de gros pores [NAM 99] [TU 03]. Ainsi, la trempage à l'azote liquide d'une solution de PLLA à 12,5% (g/vol) dans du dioxane produit des pores de 4-5 μm de diamètre alors que la même solution trempée à température ambiante produit des pores de 40 μm de diamètre [NAM 99]. Cependant, des résultats infirmant cette règle ont été observés. Hua et *al.* ont observé qu'une température de trempage proche de la température de décomposition binodale permet de diminuer conséquemment le diamètre des pores [HUA 03]. Si la température est abaissée afin de se trouver dans la zone de décomposition spinodale, la taille des pores est alors supérieure. En conclusion, le mécanisme de formation des pores influe énormément sur la structure du scaffold.

Un autre paramètre qui agit sur la microstructure des mousses est la durée de trempe intermédiaire. Cette trempe permet de choisir la région (instable ou métastable) dans laquelle on va travailler, c'est-à-dire le mécanisme de formation des pores. Ce mécanisme est dominant pendant les premières minutes de trempe, il laisse ensuite place à un autre phénomène, la coalescence des régions riches en solvant. Des temps de trempe intermédiaire élevés permettent l'obtention de structures dont le diamètre des pores peut atteindre 150 μm . Deux aspects négatifs sont liés à cette coalescence : l'interconnectivité décroît en fonction du temps de trempe intermédiaire et une sédimentation du polymère a été observée dans de nombreux cas. De plus, la distribution du diamètre des pores croît avec la durée de trempe [HUA 03].

2.1.2.1.3 Mélange de solvants

Des mélanges de solvants peuvent être employés afin de contrôler certains paramètres du procédé tels que la vitesse de sédimentation, la température de décomposition spinodale pour une concentration donnée. Hua et *al.* ont utilisé un mélange de dioxane-eau dans différentes proportions pour fabriquer des mousses de PLLA [HUA 02]. L'ajout d'eau engendre une diminution de la solubilité du polymère provoquant une sédimentation plus rapide du polymère lors du procédé. La température de précipitation du polymère dans la solution est elle aussi diminuée par l'addition d'eau dans le système. Ceci permet d'augmenter la zone métastable de la solution et donc d'obtenir une plage de température plus grande où la formation des pores s'effectue par un mécanisme de nucléation-croissance.

2.1.2.1.4 Porogènes et additifs

La séparation de phase thermiquement induite peut être couplée avec le procédé de *solvent casting/particulate leaching out* afin d'introduire une porosité supplémentaire et surtout de mieux contrôler le diamètre des pores [TU 03].

Des additifs ont été employés principalement pour faire varier la morphologie des pores. Nam et *al.* [NAM 99] ont ajouté un surfactant, le Pluronic F127, provoquant la formation de pores plus gros et plus allongés (100 μm de long et 10 μm de large).

2.1.2.2 Limitations de la technique

Cette technique présente de nombreux points positifs tels que l'obtention de mousses dont la porosité est interconnectée. Cependant, elle possède des désavantages qui ne sont pas des moindres.

2.1.2.2.1 *Emploi de solvant organique*

L'emploi de solvants organiques est généralisé pour cette technique bien que certains polymères naturels hydrosolubles aient été tout de même utilisés [STO 04].

2.1.2.2.2 *Séchage des mousses*

Le séchage à froid des mousses constitue une étape consommant énormément de temps puisque dans certains cas, des séchages de plusieurs jours sont nécessaires pour éliminer le solvant. L'équipement pour la trempe et le séchage peut s'avérer aussi assez coûteux dès lors que la température doit être ajustée.

2.1.2.2.3 *Contrôle de la taille des pores*

La concentration de la solution et la température de trempe déterminent le mécanisme de formation des pores (soit décomposition spinodale, soit nucléation-croissance). La décomposition spinodale permet l'obtention d'une porosité ouverte mais la taille des pores est contrôlée par la durée de la trempe *via* le phénomène de coalescence. Cependant, la taille maximale des pores n'excède pas 100-150 μm car la sédimentation du polymère intervient pour des temps de trempe longs.

2.1.2.2.4 *Savoir-faire*

Cette technique est dépendante de l'habileté de l'opérateur et de la préparation des outils (pipettes, moules, etc.) utilisés pendant le procédé. Les résultats sur la microstructure des pores peuvent être assez différents d'un opérateur à l'autre.

2.1.3 Gas foaming

Un échantillon polymère est placé dans une enceinte pressurisée afin de la saturer en CO_2 . En exposant de façon prolongée, un polymère sous du CO_2 à haute pression, il absorbe suffisamment de gaz pour abaisser sa température de transition vitreuse en dessous de la température du procédé produisant ainsi une solution polymère/gaz. L'étape suivante consiste à libérer rapidement le CO_2 (la pression diminue alors brutalement) afin de créer une instabilité conduisant à la formation de bulles provoquant la création de pores dans le polymère [MOO 96] [SIN 04].

Cette technique initialement développée par Mooney *et al.* [MOO 96] permet de fabriquer des scaffolds sans utiliser de solvants organiques ce qui représente un avantage certain. Toutes les opérations d'extraction de porogène ou de solvant résiduel présentes dans les autres techniques sont éliminées.

Les mousses élaborées par Mooney et *al.* possèdent une porosité s'échelonnant de 60 à 97% en fonction du polymère utilisé. Ces mêmes auteurs ont reporté la présence de pores de grand diamètre (jusqu'à 500 μm).

2.1.3.1 Paramètres influençant le procédé

2.1.3.1.1 Cristallinité

Le procédé est largement dirigé par la quantité de CO_2 que le matériau peut absorber. Ainsi, l'emploi de polymère hautement cristallin, comme le PGA par exemple, ne permet pas la formation de mousses poreuses [MOO 96]. Lorsque le polymère est amorphe, il est capable de dissoudre plus de CO_2 qu'un polymère cristallin. Lors de l'étape de dépressurisation, la nucléation de bulles, donc la formation de pores, est plus importante pour les polymères amorphes engendrant des mousses de porosité plus élevée.

2.1.3.1.2 Pression appliquée

La pression appliquée lors de l'étape d'absorption joue un rôle majeur sur la quantité de gaz absorbée. Singh et *al.* ont montré que les fortes pressions de CO_2 permettent d'absorber plus de CO_2 et d'atteindre un état de saturation plus rapidement que les petites pressions [SIN 04]. Le temps d'application de CO_2 peut être relativement long pour atteindre l'équilibre de saturation (jusqu'à 72 h) [MOO 96].

2.1.3.2 Limitations du procédé

2.1.3.2.1 Porosité

Le *gas foaming* ne permet pas de construire des structures ayant une porosité ouverte. En effet, les pores, bien que de morphologie sphérique, ne sont que peu reliés entre eux. Ce manque d'interconnectivité empêche la migration cellulaire et un ensemencement homogène au sein de la structure. De plus, la porosité n'est pas tout à fait contrôlable puisque dépendante de la quantité de CO_2 absorbé et du matériau utilisé. La taille des pores et sa distribution sont aussi difficiles à contrôler. Lors du dégazage, de nombreux pores de diamètre inférieur à 100 μm sont formés. Barry et *al.* ont reporté aussi la présence de pores de taille assez petite ($\sim 50 \mu\text{m}$) [BAR 04].

Il est possible de coupler le *gas foaming* avec une étape de *particulate leaching out*. En ajoutant un porogène au polymère cela permet d'obtenir des mousses dont les pores sont un peu plus interconnectés [HAR 98]. L'addition de porogène permet aussi de mieux contrôler le diamètre des pores et de l'augmenter.

Maspero et *al.* ont développé une technique utilisant le *gas foaming* afin d'élaborer des prothèses dentaires [MAS 02]. Après avoir effectué un moulage de la dent à remplacer, ces auteurs remplissent ce moule de morceaux de fibre de PLGA, et procèdent alors à un *gas foaming*. Cette étape a pour but, non pas de créer de la porosité dans le matériau, comme nous l'avons présenté dans ce paragraphe, mais de fusionner les particules de polymère entre elles par leur dissolution partielle. La porosité provient alors des espaces présents entre les particules. En procédant ainsi, cela leur permet de fabriquer une réplique exacte de la dent en l'espace de quelques heures [MAS 02].

2.1.3.2.2 Type de matériaux

Comme il a été précédemment mentionné, cette technique ne fonctionne pas pour les polymères trop cristallins en raison de leur faible capacité d'absorption du CO₂.

Les trois techniques présentées dans cette partie, bien que possédant des avantages indéniables, ne permettent pas de fabriquer des scaffolds dont les dimensions sont totalement contrôlées. Des procédés issus du prototypage rapide ont été développés pour palier à cet inconvénient. Ce sont ces techniques qui sont abordées dans les paragraphes suivants. Elles sont généralement assistées par un logiciel de type CAO, permettant la construction de structures dont les dimensions peuvent être déterminées préalablement à la fabrication.

2.1.4 Fused Deposition Modeling (FDM)

2.1.4.1 Principe du procédé

Cette technique a été initialement développée par Hollister [HOL 00] et Hutmacher [HUT 01] [ZEI 02]. Cette méthode consiste à déposer par couche des fibres de polymère. La figure 2.3 propose une illustration schématique de ce procédé.

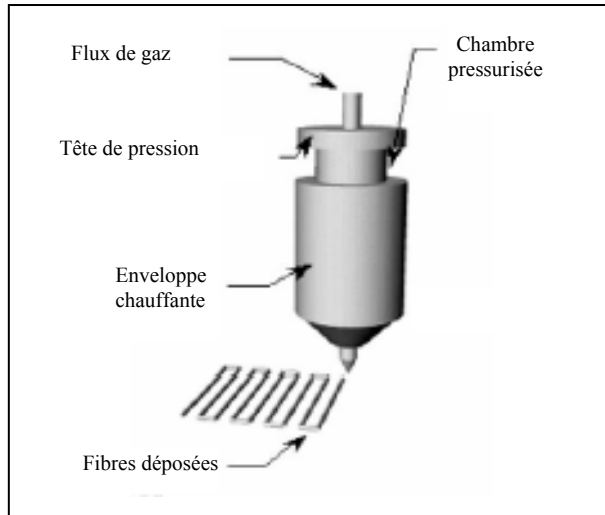


Figure 2.3 : Description schématique du procédé de Fused Deposition Modeling. Tiré de [MOR 06].

Le dispositif utilisé est composé d'une chambre thermostatée, d'une filière (une aiguille) de diamètre variable (200-500 μm) et d'une plate-forme pilotée par ordinateur permettant un déplacement en (x,y,z). Le polymère fondu est placé dans la chambre, et sous la pression d'un gaz (azote ou air comprimé) il est extrudé à travers la filière. La plate-forme se déplace afin que l'extrusion engendre une fibre dont le diamètre avoisine la centaine de micromètres. Cette opération est répétée plusieurs fois et des fibres sont disposées parallèlement les unes aux autres. Une seconde couche est déposée et, en réitérant de nombreuses fois cette opération, il est possible de fabriquer une structure tridimensionnelle. L'angle des fibres entre chaque couche peut être ajusté afin de créer des géométries plus ou moins complexes comme le présente la figure 2.4. L'orientation des couches est la plupart du temps selon des angles de 90, 60 ou 45°.

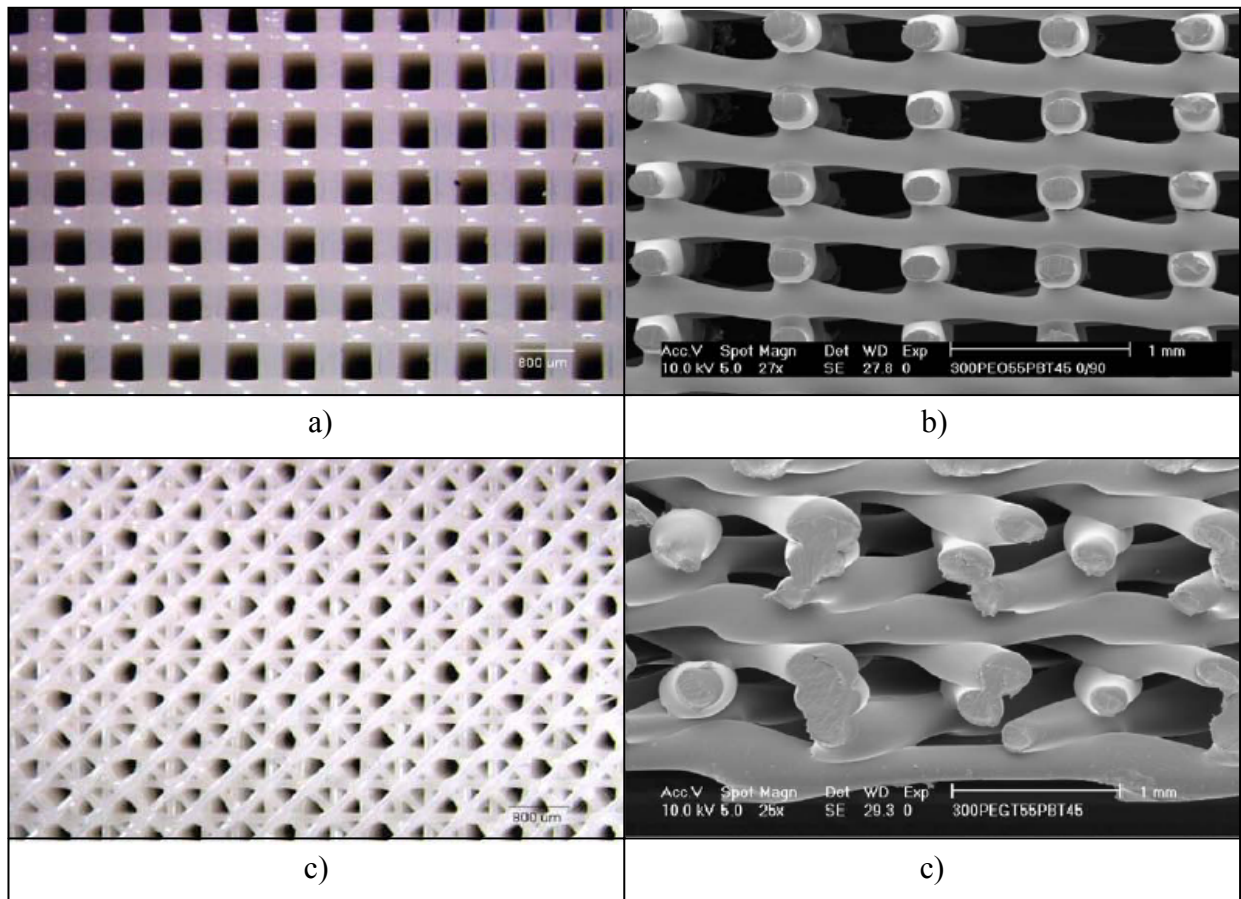


Figure 2.4 : Morphologie des scaffolds obtenus par FDM. a) et b) structure type 0-90°, c) et d) type 0-45°. Tiré de [MOR 06].

2.1.4.2 Paramètres influençant le procédé

2.1.4.2.1 Température du polymère

La température à laquelle les fibres de polymère sont déposées est probablement le paramètre déterminant du procédé. Celle-ci, en influant sur la viscosité du polymère en fusion, provoque des changements dans le diamètre des fibres, sur leur morphologie (à plus haute température les fibres auront tendance à s'étaler), sur la cohésion des couches (à plus faible température, il n'y aura pas de fusion des points de contacts des fibres donc pas de cohésion). Ces propriétés physiques ont, à leur tour, un impact sur la porosité des scaffolds et sur la taille des pores. Hutmacher et *al.* [HUT 01] ont montré que la température adéquate de déposition de PCL se situe aux alentours de 120°C. La fusion des points de contacts nécessaire à la cohésion de la structure est satisfaisante pour cette température.

2.1.4.2.2 Diamètre et orientation des fibres

Le diamètre des fibres permet de contrôler la porosité ainsi que la taille des pores. Moroni et *al.* ont prouvé que pour tout autre paramètre constant, les fibres de diamètres importants engendrent des scaffolds dont la porosité est plus élevée [MOR 06].

L'orientation des fibres permet de varier la porosité et la dimension des pores. Ces deux paramètres influent bien évidemment sur les propriétés mécaniques en compression. En effet, lorsqu'on peut faire varier la taille des pores et la porosité d'une structure, de drastiques effets peuvent être observés. Moroni et *al.* ont effectué une étude systématique de l'impact de l'architecture sur les propriétés physiques et mécaniques des scaffolds [MOR 06]. Ils ont montré que les propriétés mécaniques sont fonction de l'arrangement spatial des couches.

2.1.4.2.3 Espacement inter-fibre

Cette distance est une caractéristique majeure de l'architecture des scaffolds. La dimension des pores et la porosité dépendent de cette valeur. Elle ne peut cependant pas être plus petite que la taille d'une fibre, de l'ordre de la centaine de micromètres.

2.1.4.2.4 Pression dans la chambre

La pression appliquée dans la chambre permet d'extruder des fibres de polymère. Il y a donc une relation directe entre cette pression et le volume de polymère déposé par unité de temps.

2.1.4.2.5 Vitesse de déplacement de la plate-forme

La vitesse de déplacement de la plate-forme contrôle le diamètre des fibres : plus la vitesse est importante, plus les fibres seront fines. Pour un espacement inter-fibre constant, la porosité va nécessairement augmenter.

2.1.4.3 Limitations du procédé

Ce procédé est très intéressant ; en premier lieu, il est très versatile et permet de travailler avec un grand nombre de polymères ; en second lieu, il permet la fabrication de structures dont les pores sont entièrement interconnectés. La dimension de scaffolds est contrôlée de façon relativement précise. Même s'il existe une légère rétractation du polymère lors de sa solidification, elle est cependant moins marquée que celle observée pour les techniques utilisant des solutions de polymère. L'obtention de pores complètement interconnectés est un immense avantage pour permettre la circulation des nutriments et des gaz. Plusieurs auteurs ont rapporté la colonisation complète des scaffolds après implantation chez l'animal

[HUT 03] [ROH 03] [VAN 07]. Comme tout procédé, il possède néanmoins des inconvénients.

2.1.4.3.1 Contrôle du diamètre des fibres et des pores

La technique de FDM ne permet pas de fabriquer des scaffolds dont les fibres structurantes ont un diamètre inférieur à 100 μm . Par voie de conséquence, la dimension des pores ne peut elle aussi être inférieure à une valeur proche de la centaine de micromètres. Ces pores sont tellement interconnectés qu'ils engendrent un problème pour l'ensemencement cellulaire des structures. Celui-ci ne peut s'effectuer par sédimentation puisque la structure ne permet pas de retenir les cellules avant qu'elles n'aient eu le temps d'adhérer. Hutmacher et *al.* ont montré que cette technique d'ensemencement a une efficacité très faible, de l'ordre de 30%. Des solutions ont cependant été mises en place comme par exemple l'utilisation de gel de collagène, de micromasses [HUT 03].

2.1.4.3.2 Coût du matériel

La déposition de fibre nécessite un appareillage sophistiqué et relativement coûteux.

2.1.5 Impression tridimensionnelle

L'impression tridimensionnelle se base sur la construction d'une matrice tridimensionnelle par la déposition localisée de solvant sur une couche de particules de polymère. Une fois le solvant évaporé, une nouvelle couche de polymère est déposée sur la première couche et de nouveau la déposition localisée de solvant est effectuée. Il est possible d'obtenir des géométries plus ou moins complexes. La structure interne des parois des scaffolds peut être poreuse, lorsqu'un porogène est mélangé avec le polymère. Une étape de *leaching out* permet de l'éliminer provoquant la formation de pores. Cette technique ne permet cependant pas d'obtenir des scaffolds aux dimensions très précises.

2.1.6 Frittage laser (selective laser sintering)

Cette technique a pour principe de fusionner des particules de polymère par l'irradiation de cette poudre avec une source lumineuse de haute énergie comme un laser (figure 2.5). Ce frittage se réalise couche par couche. Ainsi, une fois une couche réalisée, des particules de polymère sont disposées sur la couche inférieure pour être de nouveau sélectivement irradiées. Cette technique permet la réalisation de scaffold possédant une architecture complexe [WIL 05] [ZHO 07].

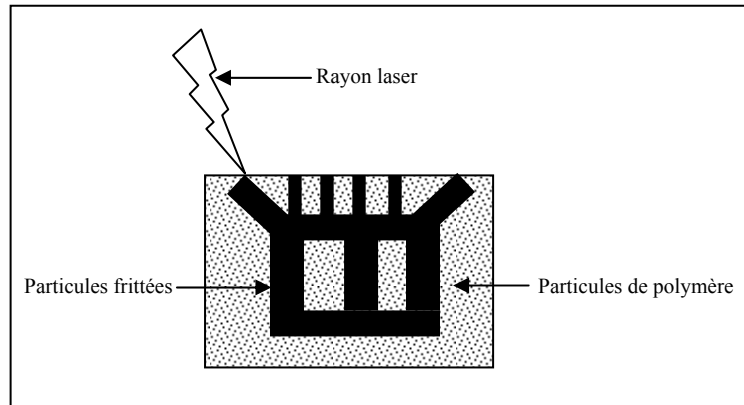


Figure 2.5 : Schéma descriptif du procédé de frittage laser.

2.1.7 Autres techniques

Leone *et al.* ont développé une technique originale afin de fabriquer des structures poreuses à partir d'hydrogel de polysaccharides [LEO 04]. Une fois le gel réticulé, il est disposé sous un filtre possédant des pores de 40, 70, ou 100 μm de diamètre. Ce système est ensuite installé sur un bécher contenant du bicarbonate de sodium. En ajoutant doucement quelques gouttes d'acide chlorhydrique, un violent dégagement gazeux se produit, qui en passant au travers du filtre, puis au travers de l'hydrogel permet de créer de la porosité dans le scaffold. Le contrôle de la taille des pores s'effectue par le type de filtre utilisé. Cette technique permet, de façon simple, de fabriquer des scaffolds en s'affranchissant de l'utilisation de porogène. Le procédé est plus rapide, mais la dimension des pores n'excède pas 50 μm et l'interconnectivité entre les pores est peu présente.

Une autre technique consiste à mélanger, sous rapide agitation, de la PCL à 120°C, avec de l'eau. L'eau étant un non-solvant de la PCL, cette dernière se solidifie et une structure fibreuse est obtenue qui est par la suite centrifugée [OH 07]. Cette étape permet d'accumuler la PCL au fond du récipient de centrifugation et de séparer le polymère et l'eau. Le gradient de centrifugation subi par le polymère le long de l'axe du récipient de centrifugation provoque la formation d'un gradient de taille de pores dans le scaffold. Le scaffold est ensuite séché à froid avant d'être placé à 59°C pendant 60 min pour lui procurer une intégrité physique par la fusion partielle des fibres de PCL entre elles. Cette technique permet aussi de s'affranchir de l'emploi de solvant, mais, par contre, elle a le désavantage de rendre le contrôle de la taille et de la morphologie des pores difficile.

En conclusion de cette partie, nous avons montré que l'ingénierie tissulaire nécessite l'utilisation de scaffolds dont le cahier des charges a été défini en introduction. Les techniques de fabrication des scaffolds sont nombreuses et la liste qui est présentée dans les paragraphes précédents n'est pas exhaustive. Parmi toutes ces techniques, notre groupe de recherche s'est dirigé vers l'utilisation de la technique de *solvent casting/particulate leaching out*. Plusieurs raisons expliquent ce choix. La première raison provient de la très grande simplicité de mise en œuvre de ce procédé. La seconde est liée au coût financier qui est très modique puisque le SC/LO ne nécessite pas d'appareillage particulier. Le fait de pouvoir contrôler la porosité et la taille des pores constitue la dernière raison pour laquelle j'ai opté pour ce procédé.

Dans l'étude qui suit, je me suis attaché à modifier ce procédé afin de développer une technique permettant de fabriquer des scaffolds dont les pores sont sphériques et interconnectés. Le paragraphe 2.1.1 aborde cet aspect, mais la technique que je présente ici emploie seulement de l'eau pour retirer le porogène.

2.2 Matériels et Méthodes

2.2.1 Matériels

2.2.1.1 Polymère, porogène et autres matériels

- PLLA ($M_n = 302\ 000$ g/mol), Boehringer Ingelheim, Allemagne.
- Chloroforme (bio-tech grade), Sigma-Aldrich, France.
- Particules de sucre (qualité alimentaire), Erstein, France.
- Bec Meker, Fisher-Bioblock, France.
- Tamis (200 μm , 300 μm , 500 μm et 700 μm), Retsch, France.
- Glucose Meditest, Macherey-Nagel, Allemagne.
- Alamar Blue, Serotec, Angleterre.

2.2.1.2 Milieu de culture

- Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM), Gibco, France.
- Sérum de veau 10% (vol/vol), Gibco, France.
- Pénicilline (100 U.mL⁻¹) Gibco, France.
- Streptomycine (100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), Gibco, France.
- Fungizone (2,5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$), Gibco, France.

2.2.2 Caractérisation et modification des particules

2.2.2.1 Observation des particules

Les particules de sucre sont tamisées et deux populations (200-300 μm et 300-500 μm) sont sélectionnées. La morphologie des particules est observée par microscopie optique (loupe binoculaire). Pour chaque gamme de particule et de taille, le diamètre moyen a été mesuré ($n = 100$).

2.2.2.2 Modification des particules

L'objectif de cette modification est de produire des particules de sucres sphériques. La méthode adoptée s'inspire de Gross et *al.* [GRO 04], c'est-à-dire qu'une source de chaleur est utilisée afin de fondre partiellement les particules de porogène. La population 200-300 μm est sphérolisée en versant ces particules à un débit massique d'environ $1 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$, au travers d'un tube métallique placé au-dessus d'une flamme produite par un bec Meker (figure 2.6). Le cylindre métallique est légèrement rétréci afin de permettre un meilleur guidage et le confinement des particules de sucre.

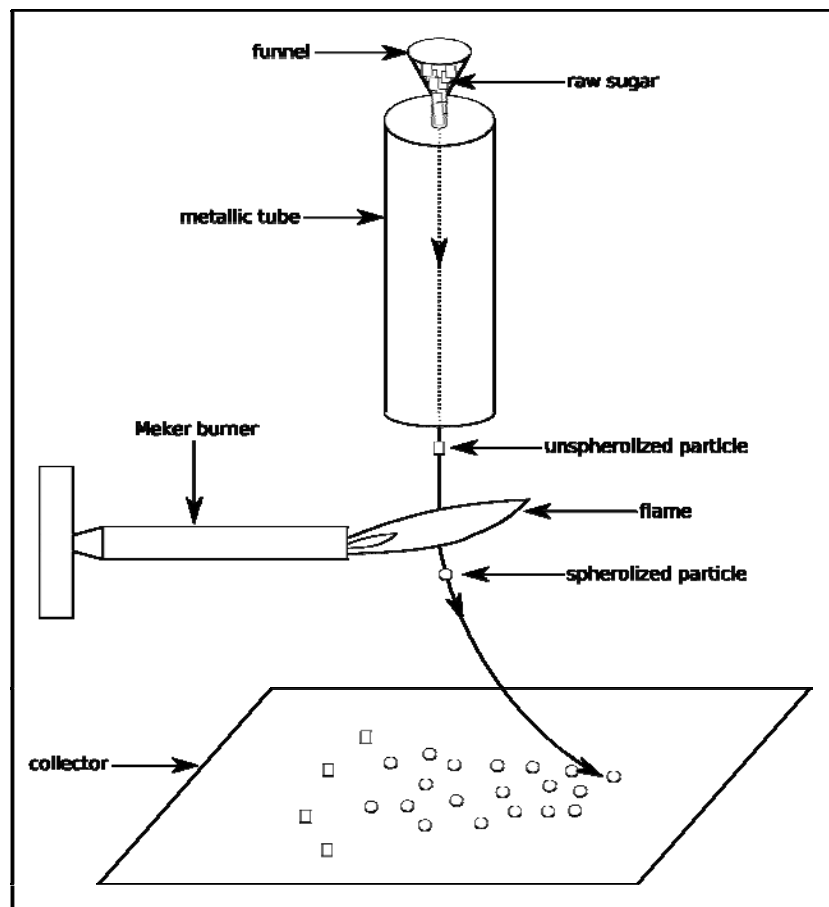


Figure 2.6 : Description du procédé de sphérolisation des particules de sucre.

Au fur et à mesure que les particules passent au travers de la flamme, la température qui y règne provoque une fusion partielle. Ces particules adoptent une configuration sphérique afin de minimiser leur énergie surfacique.

La sphérolisation des particules de plus grand diamètre (300-500 μm) a été effectuée en utilisant conjointement un second bec Meker afin d'améliorer le rendement de sphérolisation. En effet, avec un seul bec Meker, le débit massique du sucre devait être très faible pour obtenir des particules sphériques.

2.2.2.3 Mesure de la température de flamme

La température de flamme a été mesurée en utilisant un thermocouple prévu à cet effet et élaboré au Département de Chimie Physique des Réactions de Nancy (DCPR, Nancy-Université). Le thermocouple est déplacé graduellement le long de la flamme afin d'obtenir le profil des températures.

2.2.3 Fabrication des scaffolds

La méthode de fabrication choisie pour ce procédé est le *solvent casting/particulate leaching out*. Cette technique a déjà été décrite pour d'autres porogènes [MIK 94] [MA 01]. Des particules de sucre sphérolisées (1 g) sont collectées et disposées dans un moule cylindrique (diamètre 11 mm, hauteur 20 mm) où elles subissent une compression jusqu'à ce qu'elles occupent un volume de 0,6 mL. Cette étape de compaction est nécessaire afin d'amener les particules en contact les unes par rapport aux autres. Cet assemblage de porogène, appelé aussi négatif de porogène, est encore rempli d'air puisque les espaces interstitiels ne sont pas comblés.

Des solutions de PLLA à différentes concentrations dans du chloroforme sont préparées (5, 8 et 10% (m/vol)) et 0,6 mL sont versés sur l'assemblage de porogène. La figure 2.7 présente les différentes étapes du procédé. Un traitement sous vide (250 mbar, 3 min) est ensuite réalisé afin d'enlever l'air contenu dans le négatif en porogène. Lorsque la pression retourne à la pression atmosphérique, la solution de polymère pénètre dans l'assemblage, le casting de polymère est effectué. Le volume surnageant de solution est retiré (~ 0,2 mL). Lors de cette étape de fabrication, il est nécessaire d'ajouter un excès de solution de PLLA puisque l'élimination de l'air provoque une agitation de la solution dont un certain volume se retrouve sur les parois du moule.

Le solvant est ensuite évaporé afin d'obtenir un solide. Ces structures sont placées dans de l'eau distillée (20 mL) pour éliminer le sucre. L'eau distillée est changée 3 fois par jour jusqu'à ce que la présence de sucre ne soit plus détectée par un test de glucose. Une autre alternative est de procéder à un autre casting avant d'accomplir l'étape de *leaching out*. Les scaffolds sont ensuite séchés sous vide dynamique pendant 24 h afin d'éliminer le solvant résiduel.

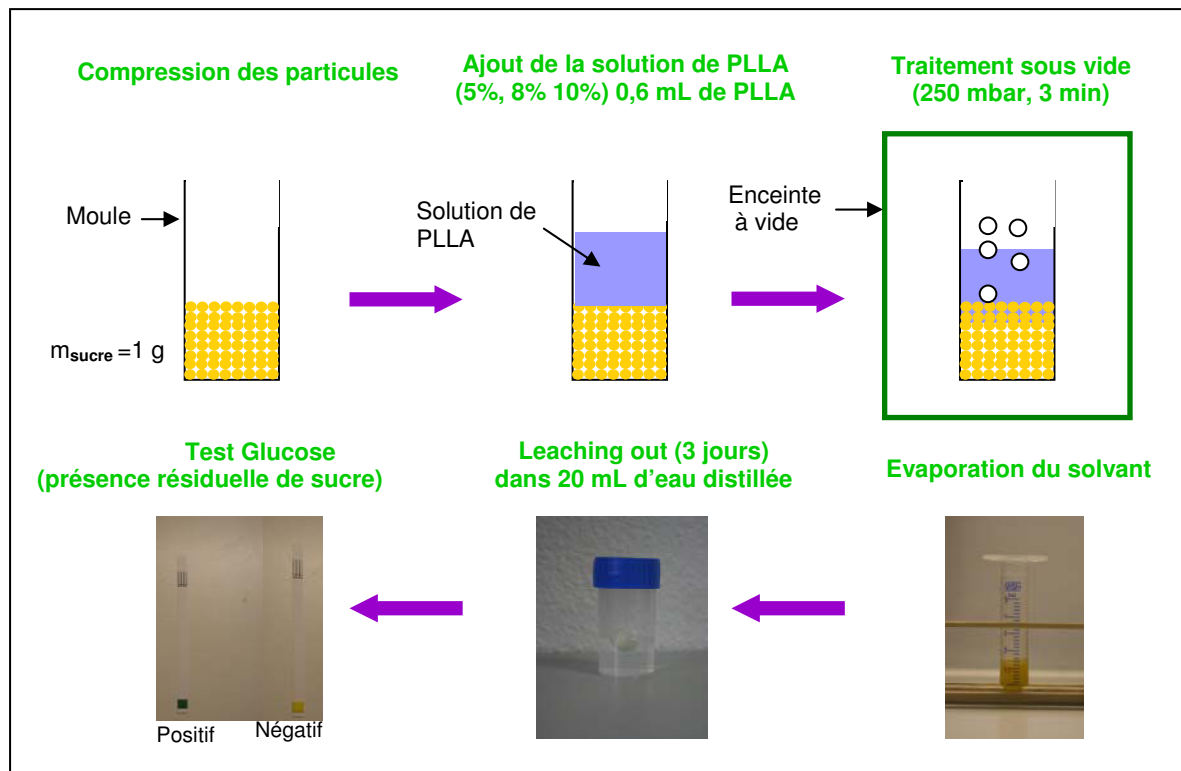


Figure 2.7 : Description du procédé modifié de SC/LO.

➤ Canaux d'interconnection

Il est possible d'incorporer des canaux dans ces structures afin d'augmenter encore l'interconnectivité des scaffolds et faciliter ainsi la diffusion des gaz et des nutriments. La méthode de fabrication a été décrite par Zhang et *al.* [ZHA 00]. Du sucre est porté à une température suffisante pour obtenir du caramel. Celui-ci est laissé à l'air libre pendant quelques minutes afin de le refroidir et d'obtenir une pâte visqueuse. Il convient ensuite de tirer des fils à l'aide d'une spatule. Cela forme des petits cylindres de diamètres variables. Ceux-ci sont mélangés avec les particules sphérolisées avant l'étape de *solvent casting*.

2.2.4 Evaluation des scaffolds

2.2.4.1 Evaluation morphologique

La morphologie interne des scaffolds a été observée par microscopie électronique à balayage. Les scaffolds cylindriques (diamètre 11 mm, hauteur 11 mm) sont découpés selon leur hauteur pour visualiser le centre des structures. Les échantillons subissent un coating à l'or-palladium pour permettre l'observation. Pour chaque concentration (5, 8 et 10% (m/vol)), 2 échantillons provenant de séries de fabrication différentes ont été étudiés.

2.2.4.2 Evaluation de la porosité

La porosité a été mesurée à partir de la masse et du volume de chaque scaffold selon l'équation (2.1) :

$$\varepsilon = 1 - \frac{\rho_s}{\rho_m} \quad (2.1)$$

ρ_s est la masse volumique apparente du scaffold, et ρ_m est la masse volumique du PLLA (1,27 g.cm⁻³) et bien sur, ε est la porosité.

2.2.4.3 Evaluation mécanique

Des tests de compression ont été réalisés afin de déterminer le module de compression des scaffolds. Les scaffolds sont préalablement découpés pour avoir une dimension de 11 mm de diamètre, de 11 mm de hauteur et pour avoir des surfaces parallèles. Un capteur de charge d'une précision de 0,3 N a été fabriqué pour ces tests et 6 échantillons différents par série de scaffolds ont été testés. Les essais de compression ont été effectués à une vitesse de déplacement de la traverse de la machine de 10 mm.min⁻¹. Le module de compression a été déterminé en calculant la pente de la région linéaire initiale. Un test de Student a été employé pour évaluer la significativité du module entre les différents scaffolds.

2.2.4.4 Evaluation biologique

2.2.4.4.1 Etude *in vitro*

➤ Prélèvement et culture des cellules

Des cellules souches de lapins de Nouvelle Zélande (2,5-3 kg) (Cégav, France) ont été utilisées pour caractériser la biocompatibilité des scaffolds de PLLA. Trois lapines différentes ont été employées.

➤ Ponction des cellules souches mésenchymateuses

○ Protocole d'anesthésie

Les lapines ont été anesthésiées en utilisant du Rompum (Xylazine) à 15 mg.kg^{-1} et de la Kétamine à 1 mg.kg^{-1} . Un premier bolus est administré par intraveineuse pour endormir le lapin. Une seconde demi-dose est injectée 10-15 min après le premier bolus. Toujours par voie intraveineuse, une dose d'entretien est administrée ($50 \text{ mg.kg}^{-1}.\text{h}^{-1}$ dans 20 mL de sérum physiologique).

○ Protocole de ponction

Pour réaliser la ponction, le bassin du lapin, au niveau de la crête iliaque est rasé. Après désinfection de la peau à la bétadine 5%, un trocart stérile est employé afin de prélever la moelle osseuse. Les lapines sont placées en position latérale afin de permettre une orientation à 45° du trocart par rapport à la crête. Une fois que l'os est perforé et que l'aiguille centrale du trocart est retirée, environ 3 mL de PBS contenant de l'héparine sont injectés dans la crête iliaque afin de faciliter le prélèvement. La récupération de la moelle osseuse est effectuée par aspiration dans une seringue stérile de 20 mL. En moyenne, on prélève 8 mL de moelle osseuse.

➤ Isolement des cellules souches

Après la ponction, la moelle osseuse est versée dans un tube de 50 mL où elle est mélangée avec 10 mL de milieu de culture. Une centrifugation à 3500 tr.min^{-1} permet de séparer les cellules souches des autres composants. La couche de cellules souches, se situant entre la couche de cellules sanguines et le plasma, est aspirée délicatement et re-suspendue dans 10 mL de milieu avant une incubation de 4 jours dans une boîte de culture de 75 cm^2 . Au quatrième jour, les cellules souches mésenchymateuses ont fermement adhéré au support alors que les hématies sont restées en suspension. Ainsi, en changeant le milieu de culture, les cellules sanguines sont éliminées et au bout de 3 passages, la culture de cellules souches mésenchymateuses est relativement pure.

➤ Stérilisation des scaffolds

Des scaffolds cylindriques (9 mm de diamètre et 7 mm de hauteur) sont immergés pendant 30 min dans de l'éthanol à 75%. Ensuite une irradiation UV pendant 15 min de chaque côté est réalisée. Les scaffolds sont alors abondamment rincés, 3 fois dans du milieu de culture afin d'éliminer la quantité résiduelle d'alcool. Ils sont placés sur un filtre stérile steritop afin

d'aspirer le milieu de culture se trouvant dans les structures. Cette étape est nécessaire pour pouvoir, par la suite, confiner la suspension cellulaire dans le scaffold. Une fois secs, les scaffolds sont placés dans un moule cylindrique stérile permettant de les manipuler facilement.

➤ **Ensemencement des scaffolds**

Des cellules souches mésenchymateuses (CSM) à passage 2 ou 3 sont décrochées du support de culture par l'action d'une solution de trypsine à 2,5% dans de l'HBSS (Hanks' Balanced Salt Solution) pendant environ 5 min. L'action de la trypsine est stoppée par l'ajout d'un même volume de milieu. La solution cellulaire ainsi formée, est centrifugée à 1200 tr.min⁻¹. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont suspendues dans 1 mL de milieu. La concentration de la solution cellulaire est déterminée par comptage dans une cellule de Thoma. 5x10⁵ CSM dans 100 µL sont prélevées à l'aide d'une seringue munie d'une aiguille 22G. Le faible volume injecté dans les scaffolds permet que celui-ci ne s'échappe pas hors de la structure et que les cellules soient confinées dans le scaffold. Le petit diamètre de l'aiguille permet de minimiser le volume mort de cette dernière et de ne pas trop endommager le scaffold. Les CSM sontensemencées en injectant la suspension cellulaire en 5 ou 6 endroits dans le scaffold afin d'obtenir un ensemencement le plus homogène possible. Les scaffolds, dans leurs moules, sont placés dans une boîte de Pétri pour une incubation de 4 h dans l'étuve. Cette étape permet l'adhésion des cellules sur les parois des pores du scaffold. Le maintien du scaffold dans un moule s'avère nécessaire afin de ne pas le comprimer, ce qui engendrerait un écoulement de la solution cellulaire et donc un mauvais contrôle de la densité d'ensemencement. Les cellules étant adhérentes, il est alors possible de transférer les scaffolds dans une plaque de culture de 48 puits et 1 mL de milieu est ajouté dans chaque puits. Pour les besoins du test, des puits témoins sontensemencés par la même densité cellulaire. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours.

➤ **Test de viabilité Alamar Blue**

L'Alamar Blue est un test de viabilité cellulaire décrit dans la partie 1. Ici, 9 échantillons (n = 3, x 3, pour chaque série d'expérience, des cellules provenant d'une lapine différente ont été employées) ont été utilisés pour mesurer la viabilité cellulaire à J1, J4, J7, et J14. 500 µL d'une solution d'Alamar Blue à 10% dans du DMEM sans rouge de phénol sont versés dans chaque puits. Les plaques de culture sont placées à 37°C pendant 120 min. Le reste du protocole expérimental ne varie pas, et est décrit dans la partie 1, paragraphe 1.2.3.2.

Un test de student sur les valeurs de la réduction d'Alamar Blue a été réalisé afin de déterminer les différences significatives entre les moyennes. $p < 0,05$ est considéré comme le seuil de significativité.

➤ Morphologie des scaffolds ensemencés

Les scaffolds sont fixés dans une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 2,5% pendant 24 h. Les scaffolds sont successivement plongés dans des bains d'éthanol de concentrations croissantes (de 30 à 90°). Ils sont ensuite séchés, découpés selon un diamètre et subissent un coating à l'or-palladium préalablement à l'observation. Deux échantillons de séries différentes ont été étudiés pour chaque jour de mesure. L'observation des scaffolds a été effectuée essentiellement au centre de ces structures.

2.2.4.4.2 *Etude in vivo*

Les performances des scaffolds ont été testées *in vivo* chez le rat afin de caractériser la croissance et la pénétration tissulaire.

➤ Préparation des structures

L'objectif de ce travail est de comparer la pénétration cellulaire et tissulaire dans des scaffolds, ayant des pores angulaires et peu interconnectés, et dans des scaffolds ayant des pores sphériques et très interconnectés.

La fabrication des scaffolds suit la même procédure que décrite précédemment à la différence que des particules de sucre non-sphérolisées ont été utilisées afin de construire des scaffolds possédant des pores angulaires et peu interconnectés. Une solution de PLLA à 6,5% dans du chloroforme a été employée pendant l'étape de *solvent casting*. Une fois les scaffolds fabriqués, ils sont stérilisés comme décrit dans le paragraphe 2.2.4.4.1.

➤ Protocole d'implantation

4 rats wistars ($m = 550-650$ g) ont été employés pour cette étude *in vivo*.

On rase le dos des animaux et on désinfecte à la bétadine. 9 poches sous-cutanées, distantes d'environ 2 cm, sont créées en pratiquant une incision au scalpel. Les poches sont ensuite agrandies à l'aide de ciseau de chirurgie à bords arrondis (cf. figure 2.8).

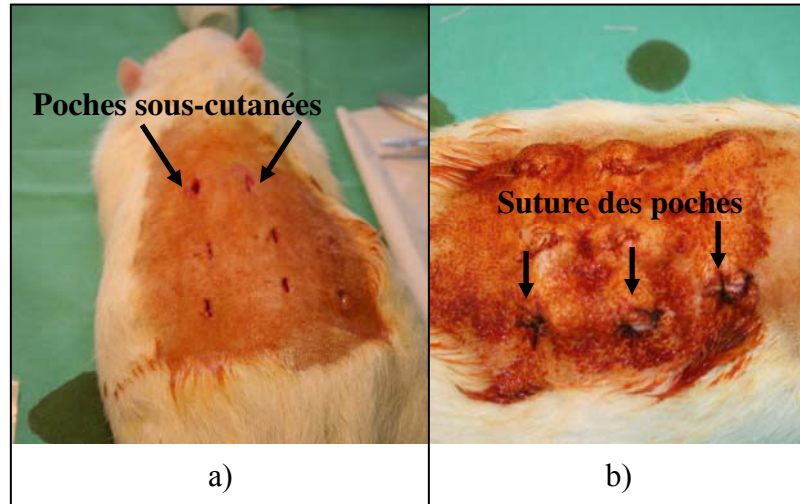


Figure 2.8 : Implantation des scaffolds chez le rat.
a) poches d'implantation, b) suture des poches.

Les scaffolds sont prélevés à J3, J10 et J17 pour une étude histologique et pour une étude en microscopie électronique.

➤ Etude histologique

Les structures, sitôt prélevées, sont découpées selon un diamètre et une moitié est plongée dans un fixateur (pour l'étude en microscopie électronique) l'autre partie est cryogénée dans de l'azote liquide. Les coupes sont effectuées dans un cryotome à -20°C avec une épaisseur de 10-12 μm . Le protocole de coloration HES (Hématoxyline, Eosine, Safran) est donné dans l'annexe 2. L'observation des lames est effectuée grâce à un microscope optique.

➤ Etude en microscopie électronique à balayage

Les scaffolds, une fois prélevés, sont fixés dans une solution aqueuse de glutaraldéhyde à 2,5% pendant 24 h. Les scaffolds sont préparés comme décrit précédemment (paragraphe 2.2.4.4.1).

2.3 Résultats

2.3.1 Caractérisation des particules

En tombant dans le tube métallique et en croisant la flamme du bec Meker, les particules de sucre sont sphérolisées. La flamme apporte assez d'énergie pour provoquer une fusion partielle des particules. Ces particules liquides minimisent leur énergie surfacique en adoptant

une configuration sphérique. Ces mêmes particules atteignent le collecteur (une plaque de plastique) une fois qu'elles se sont solidifiées dans l'air. La distance entre le bec Meker et le collecteur est ajustée afin de déposer des particules solides dont la température est assez faible pour éviter leur coalescence sur le collecteur. Les particules sphérolisées subissent une déviation selon le flux de gaz de la flamme comme le présente la figure 2.6. Une séparation aisée entre les particules non-sphérolisées et les particules sphérolisées est effectuée grâce à ce phénomène. La figure 2.9 présente la morphologie des particules avant et après sphérolisation.

Cette figure montre clairement que les particules de sucre sont complètement sphérolisées pour les deux populations (200-300 μm et 300-500 μm). L'efficacité du procédé est directement reliée au débit massique de sucre. A haut débit ($> 4 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$) un grand nombre de particules n'est pas sphérolisé. Un débit optimal, se situant vers $1 \text{ g}\cdot\text{min}^{-1}$, permet une sphérolisation totale tout en ayant un rendement important.

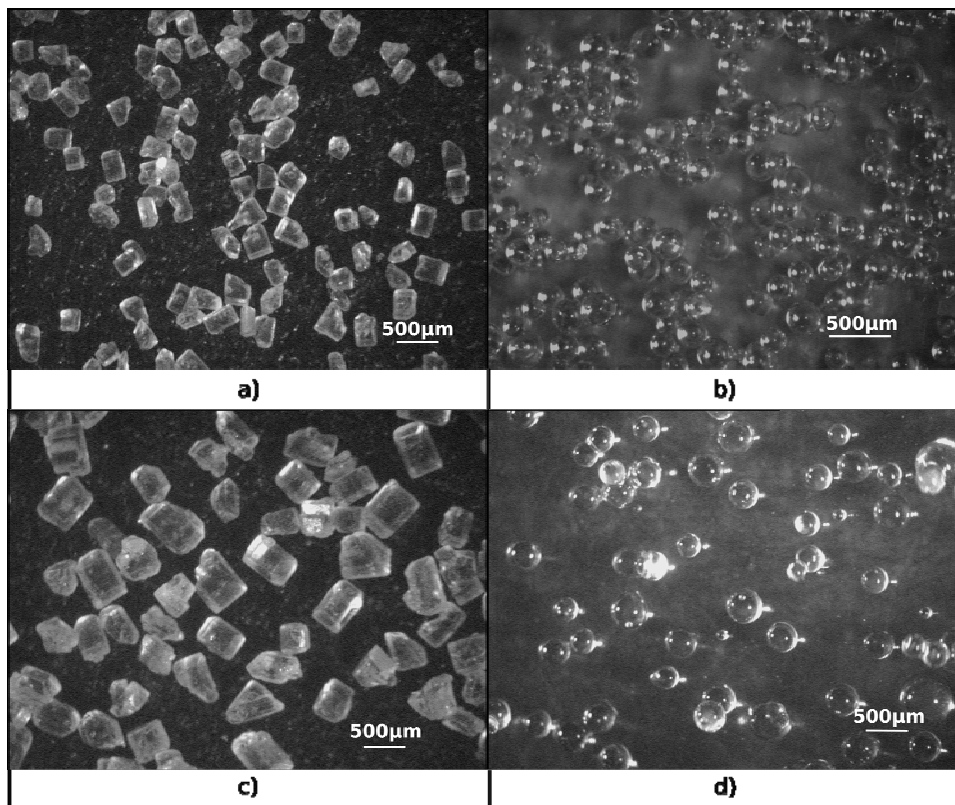


Figure 2.9 : Morphologie des particules de sucre. a) 200-300 μm non-sphérolisées, b) 200-300 μm sphérolisées, c) 300-500 μm non-sphérolisées, d) 300-500 μm sphérolisées. Loupe binoculaire.

Une étude statistique du diamètre des particules ($n = 100$) a été effectuée. Les résultats sont présentés dans le tableau 2-1.

Tableau 2-1 : Diamètre des particules angulaires et sphérolisées.

Diamètre [μm]	Particules angulaires [μm]	Particules sphériques [μm]
200-300	250 ± 50	250 ± 30
300-500	370 ± 75	380 ± 70

Les diamètres moyens des particules sphérolisées et non-sphérolisées sont proches, et ce indépendamment de la taille des populations. Ainsi, on peut conclure que les particules ne fusionnent pas, ni ne coalescent pendant, ou après le traitement de sphérolisation. Ce fait montre que le traitement thermique n'altère pas le diamètre des particules.

Les plus grosses particules (300-500 μm) n'ont pas été efficacement sphérolisées par ce procédé. Aussi, un second bec Meker a été employé, permettant d'apporter plus d'énergie au système et d'améliorer le rendement du procédé. Les diamètres des particules restent relativement proches entre les particules sphérolisées et non-sphérolisées, prouvant ainsi que les phénomènes de coalescence et de fusion n'ont pas non plus lieu pour un apport de chaleur plus conséquent.

2.3.2 Température de flamme

La température de flamme est un paramètre important du procédé de sphérolisation puisque c'est elle qui détermine la quantité d'énergie apportée aux particules de sucre. Divers essais ont été menés avec des flammes de plus faibles températures. Par exemple, l'emploi d'un bec Bunsen rend impossible la sphérolisation correcte des particules de sucre quelles que soient leurs tailles, sa température de flamme étant largement inférieure à celle du bec Meker. Le profil des températures de la flamme du bec Meker a été évalué en déplaçant un thermocouple le long de la flamme.

Comme le montre la figure 2.10, après une zone relativement froide, proche de l'embout du bec Meker, une rapide augmentation de la température a été observée jusqu'à ce qu'elle atteigne 1400°C . Ensuite, il apparaît une seconde zone où la température augmente plus doucement jusque 1500°C . La fin de la flamme est caractérisée par une décroissance graduelle de la température.

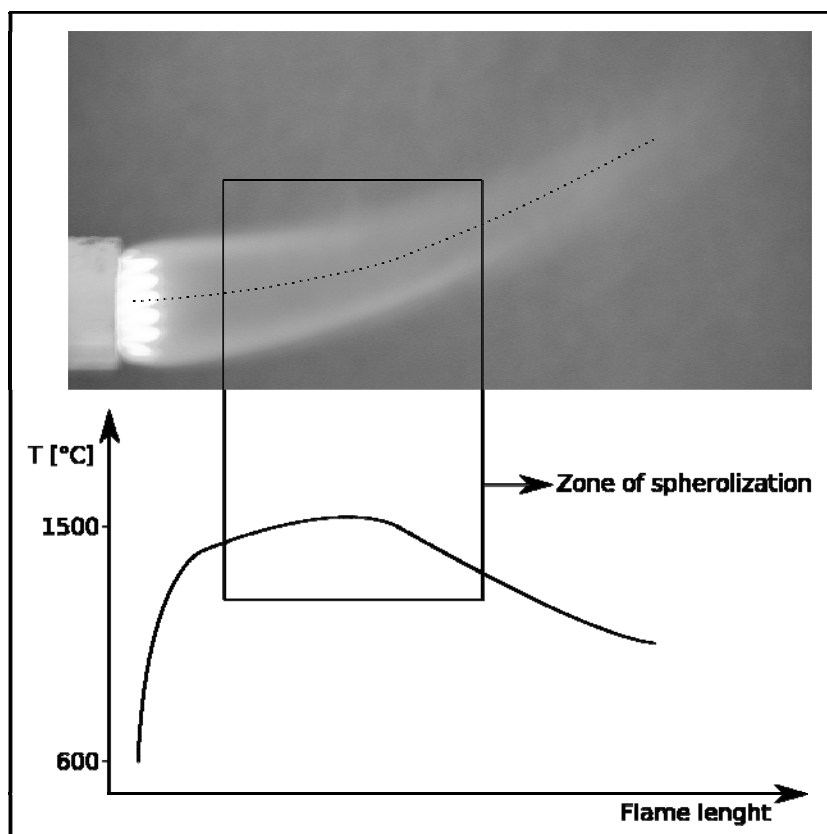


Figure 2.10 : Profil de température de la flamme du bec Meker.

Pendant le procédé de sphérolisation, les particules de sucre ont traversé la zone de la flamme où la température avoisine ou égale 1500°C comme le montre la figure 2.10. Par conséquent, il semble qu'une telle température soit nécessaire afin de sphéroliser des particules croisant la flamme à un débit de 1 g.min⁻¹. La raison pour laquelle les plus grosses particules ne sont pas efficacement sphérolisées par l'emploi d'un seul bec Meker peut trouver son origine dans le fait que le temps de résidence dans la zone de haute température n'est pas suffisamment long pour que le transfert d'énergie, provoquant la fusion des particules, n'ait complètement lieu.

2.3.3 Evaluation des scaffolds

2.3.3.1 Evaluation morphologique

Différentes concentrations de solutions de PLLA ont été ajoutées dans les négatifs en sucre afin d'obtenir des structures tridimensionnelles. La figure 2.11 présente les morphologies des scaffolds obtenus selon les concentrations des solutions de PLLA employées. Bien évidemment, la morphologie des scaffolds est dépendante de la concentration de la solution. Cependant, les scaffolds ont tous en commun la présence de pores sphériques et interconnectés.

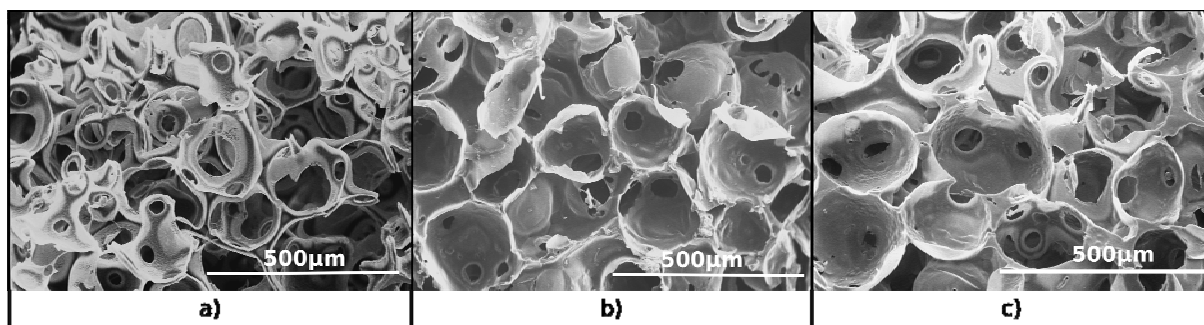


Figure 2.11 : Morphologie des scaffolds en fonction de la concentration des solutions de PLLA. a) 5%, b) 8%, c) 10%.

Les scaffolds obtenus à partir de solutions moins concentrées de PLLA possèdent une structure interne de type quasi fibreuse (figure 2.11 a)). Ceci provient du fait que la quantité de polymère introduite pendant l'étape du *solvent casting* n'a pas été suffisante pour recouvrir et entourer complètement les particules de sucre. Les scaffolds provenant de solutions plus concentrées ont, quant à eux, une morphologie régulière où les pores ont une géométrie sphérique et sont interconnectés entre eux. D'un point de vue strictement morphologique, aucune ou peu de différence ne peut être observée entre la solution à 8 et à 10% (m/vol). La forme des passages d'interconnexion étant circulaire, il est alors clair que cela provient de la formation de col entre les particules de sucre lorsqu'elles sont compressées pour être en contact plus intime. La présence de nombreux trous entre les pores est une caractéristique importante pour ces structures puisqu'ils vont favoriser la diffusion et la circulation des fluides et des gaz nécessaires à la viabilité d'une culture cellulaire. La figure 2.12 montre les dimensions typiques de ces passages d'interconnexion.

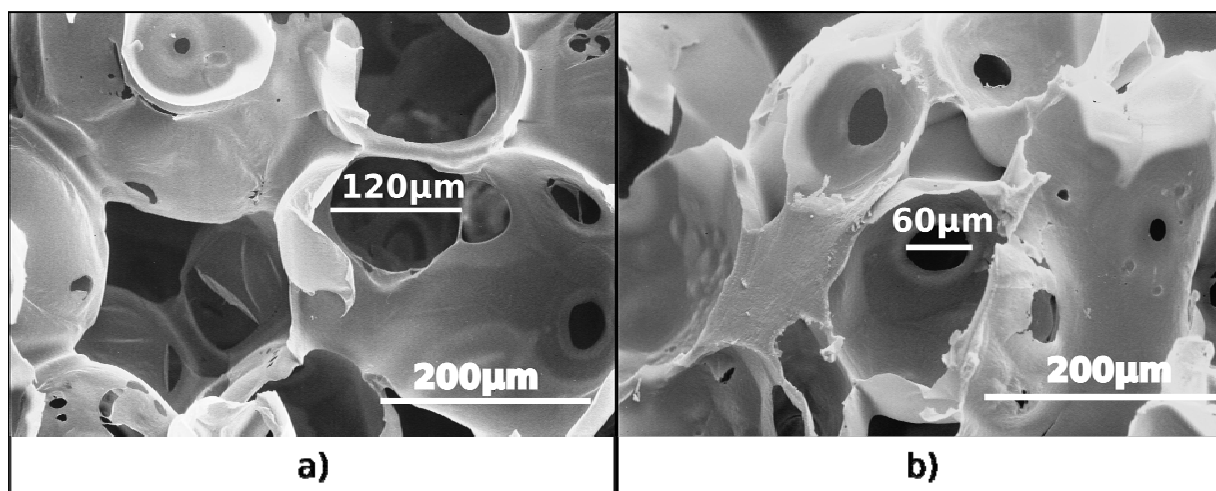


Figure 2.12 : Dimension des passages d'interconnexion entre les pores. a) solution de PLLA à 8% (m/vol), b) solution de PLLA à 10% (m/vol).

Ces passages mesurant de 20 à 100 μm pourront vraisemblablement permettre la migration cellulaire entre les pores.

La figure 2.13 présente la morphologie des scaffolds lorsque des micro-tubes de sucre sont incorporés aux particules de sucre sphériques.

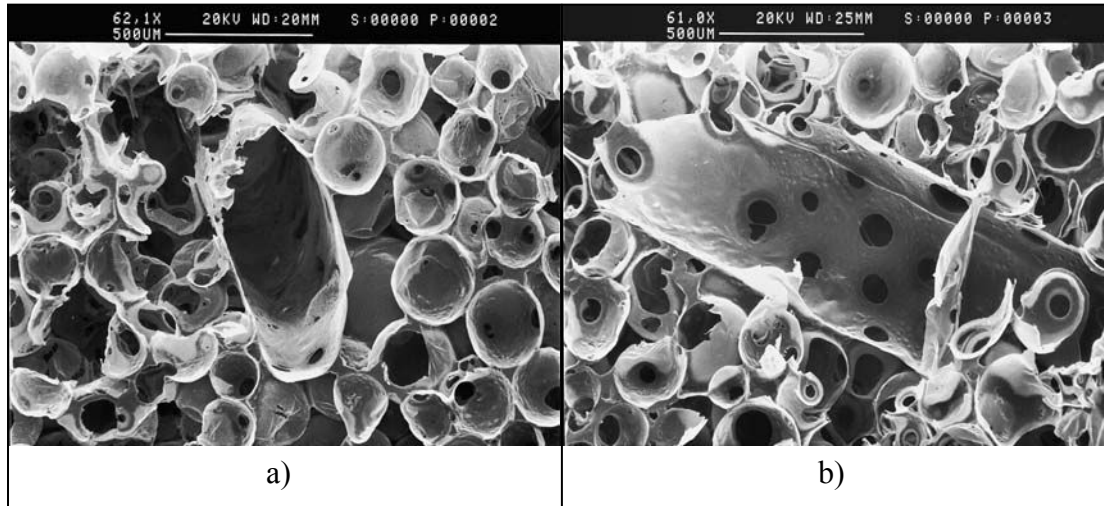


Figure 2.13 : Morphologie des scaffolds avec des canaux d'interconnexion.

a) diamètre du canal, b) coupe longitudinale du canal.

Le diamètre des canaux est de plusieurs centaines de micromètres. La figure 2.13 b) montre clairement que ces canaux sont interconnectés avec les pores environnants. La taille des pores d'interconnexion reste dans la gamme 20-100 μm .

2.3.3.2 Evaluation de la porosité

Le tableau 2-2 liste les porosités des scaffolds qui ont été mesurées selon la formule de l'équation (2.1).

Tableau 2-2 : Porosité des structures en fonction de la concentration des solutions de PLLA.

Solutions de PLLA [% , m/vol]	Porosité [%]	
	1 casting	2 castings
5	96,3 \pm 0,5	93,8 \pm 0,6
8	95,0 \pm 1,0	89,9 \pm 0,8
10	93,8 \pm 0,6	-

Comme le montre le tableau 2-2, en augmentant la concentration des solutions de PLLA, il est possible de diminuer la porosité des scaffolds. La porosité des scaffolds, obtenus avec la

solution de PLLA à 5%, est de $96,3 \pm 0,5\%$ alors que celle des scaffolds obtenus avec la solution de 10% est de $93,8 \pm 0,6\%$. La même tendance est observée lorsqu'un second casting est effectué. La porosité diminue lorsqu'une quantité plus importante de polymère est incorporée. Ceci permet de contrôler, dans une certaine mesure, les propriétés des scaffolds. Il est important de noter qu'un second casting n'a pu être effectué pour la solution à 10% (m/vol), en raison de la grande viscosité de cette solution qui rend la pénétration du polymère dans le négatif en sucre difficile et hétérogène.

2.3.3.3 Evaluation mécanique

Des tests de compression ont été effectués à température ambiante et en ayant mouillé les structures pendant 5 min préalablement au test. Les courbes de compression de la force en fonction de la déformation, ont été enregistrées sur une table traçante avant d'être numérisées pour en tirer les courbes de déformation-contrainte comme présenté dans la figure 2.14. Ces courbes présentent une zone linéaire initiale correspondant à une déformation purement élastique. Ensuite, survient un changement de pente dont le coefficient directeur est inférieur à celui de la zone initiale. C'est le phénomène de densification de la structure. En effet, la déformation subie par le scaffold engendre une chute de la porosité sans augmentation importante de la contrainte. Le troisième régime observé sur ce type de courbe devrait être une brusque augmentation de la contrainte une fois que la mousse est densifiée. Cependant ce régime n'apparaît pas complètement sur nos courbes en raison de la limite de fonctionnement du capteur qui est employé.

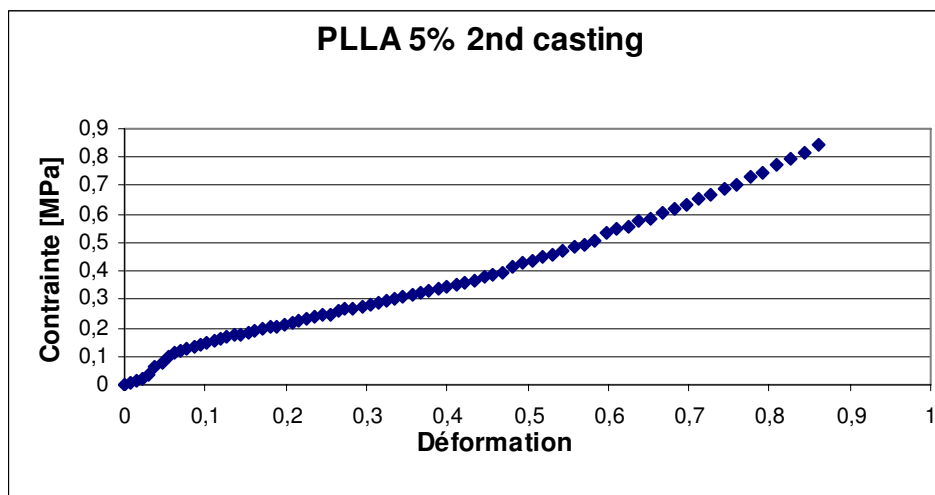


Figure 2.14 : Courbe de compression contrainte-déformation d'un scaffold en PLLA.

Le module de compression a été déterminé en calculant la pente de la partie linéaire initiale des courbes de compression. La figure 2.15 présente les résultats obtenus.

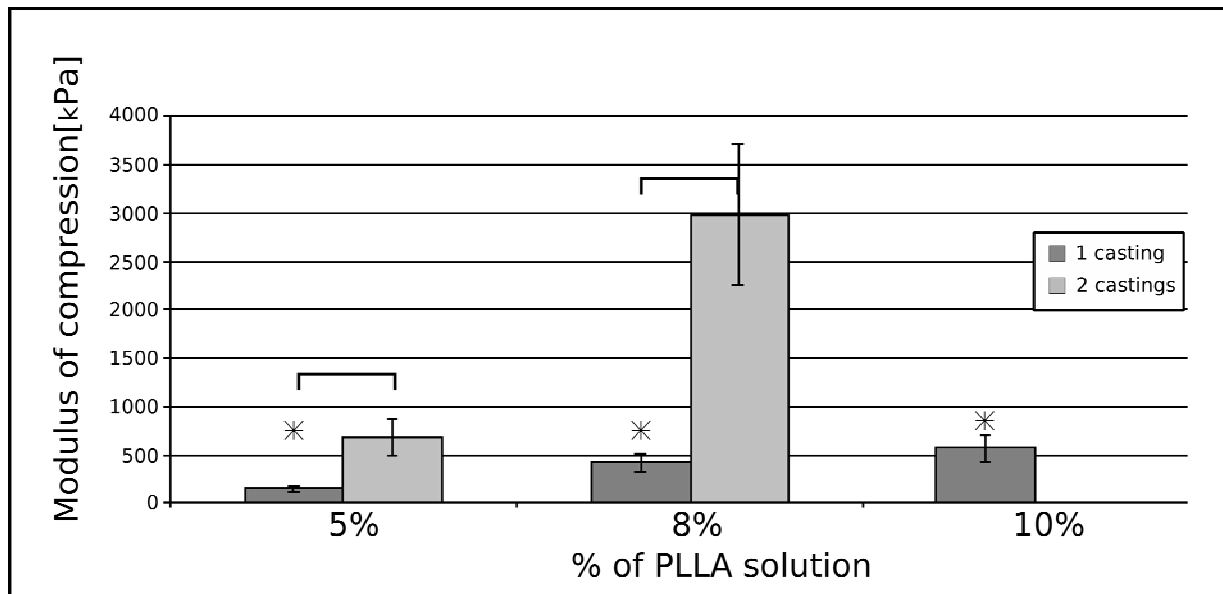


Figure 2.15 : Module de compression des scaffolds en PLLA en fonction de la concentration de la solution et du nombre de casting. Les étoiles et les barres montrent respectivement la significativité entre les concentrations et entre les castings.

Les modules de compression s'échelonnent entre 400 kPa pour les scaffolds les plus poreux jusqu'à 3 MPa pour les plus denses. Le module de compression, et plus généralement les propriétés mécaniques, sont fortement reliés à la concentration de la solution de PLLA qui a été employée. En d'autres termes, c'est la porosité du scaffold qui influe sur les performances mécaniques. De même, lorsqu'un second casting est effectué, les modules de compression augmentent de façon drastique, le module a été multiplié respectivement par 5 et 7 pour les castings avec les solutions de 5% et 8%. Ces résultats montrent la capacité de fabriquer des scaffolds dont on peut ajuster les propriétés mécaniques en jouant sur les paramètres de fabrication.

2.3.3.4 Evaluation biologique

L'évaluation biologique a comporté deux phases, l'une consiste en une étude *in vitro* de la biocompatibilité des scaffolds et l'autre consiste en une étude *in vivo* afin de considérer la pénétration cellulaire et tissulaire dans les structures.

2.3.3.4.1 Evaluation *in vitro*

La biocompatibilité des scaffolds a été évaluée en utilisant un test de viabilité Alamar Blue.

La viabilité des cellules dans les scaffolds a été mesurée à J1, J4, J7, J14 et J21. Le pourcentage de réduction de la molécule a été calculé selon l'équation (1.3). La figure 2.16 montre l'évolution du pourcentage de réduction en fonction du temps.

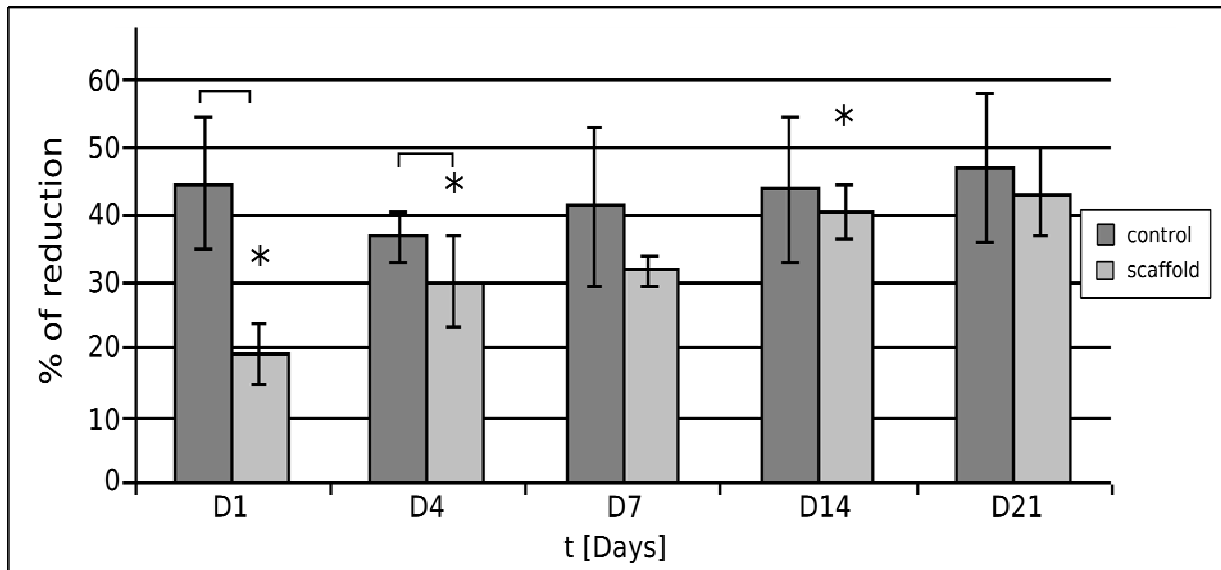


Figure 2.16 : Pourcentage de réduction de la molécule Alamar Blue en fonction du temps. Les étoiles et les barres représentent la significativité des mesures entre respectivement les différents jours et entre le scaffold et le contrôle.

24 heures après ensemencement, les cellules ont adhéré sur les parois des pores des scaffolds et le pourcentage de réduction se situe aux alentours de 20%. La différence entre ce pourcentage et celui obtenu pour le contrôle (40%) peut éventuellement s'expliquer par un certain temps d'adaptation de la part des cellules à un environnement tridimensionnel. La surface d'adhésion qu'un scaffold peut présenter aux cellules est bien supérieure à celle d'un puits de culture. Il est généralement reconnu que la densité cellulaire d'ensemencement joue un rôle prépondérant dans la croissance cellulaire. Si la densité est faible, l'expansion cellulaire est plus lente. Ce phénomène peut aussi expliquer la différence entre les valeurs obtenues pour le contrôle et le scaffold.

Le pourcentage de réduction du scaffold augmente lorsqu'on avance dans le temps. Ceci montre que l'activité métabolique des cellules est de plus en plus importante, ce qui peut constituer un signe de prolifération cellulaire. Après 21 jours de culture *in vitro*, le pourcentage de réduction atteint 40%. Il a donc doublé entre le début de la culture et la fin.

La morphologie des scaffolds ensemencés a été observée par microscopie électronique. Les résultats rassemblés dans la figure 2.17 montrent que la distribution cellulaire est très

hétérogène au sein des scaffolds. Cela est très probablement dû à la technique d'ensemencement cellulaire par injection qui reste assez basique. Cependant, comme le montre la figure 2.17 a) et b) les cellules sont capables d'adhérer profondément dans la structure. Sur ces clichés, les cellules sont à plus de 2 mm dans l'épaisseur de la structure. La morphologie des cellules ne présente pas de trace de souffrance cellulaire. Après 4 jours de culture, l'observation morphologique montre que de plus en plus de pores sont colonisés et dans certains cas un tapis cellulaire commence à recouvrir leur paroi. Il est important de noter que, là aussi, les pores colonisés se trouvent également à plusieurs millimètres dans la profondeur du scaffold. Il en est de même pour J7, J14 et J21. Après 3 semaines de culture *in vitro* les cellules sont encore dans le centre de la culture et ne subissent pas de conditions provoquant un stress trop important comme le montre la figure 2.17 f). Il est aussi important de noter qu'à J21, une couche de cellules s'est développée autour du scaffold.

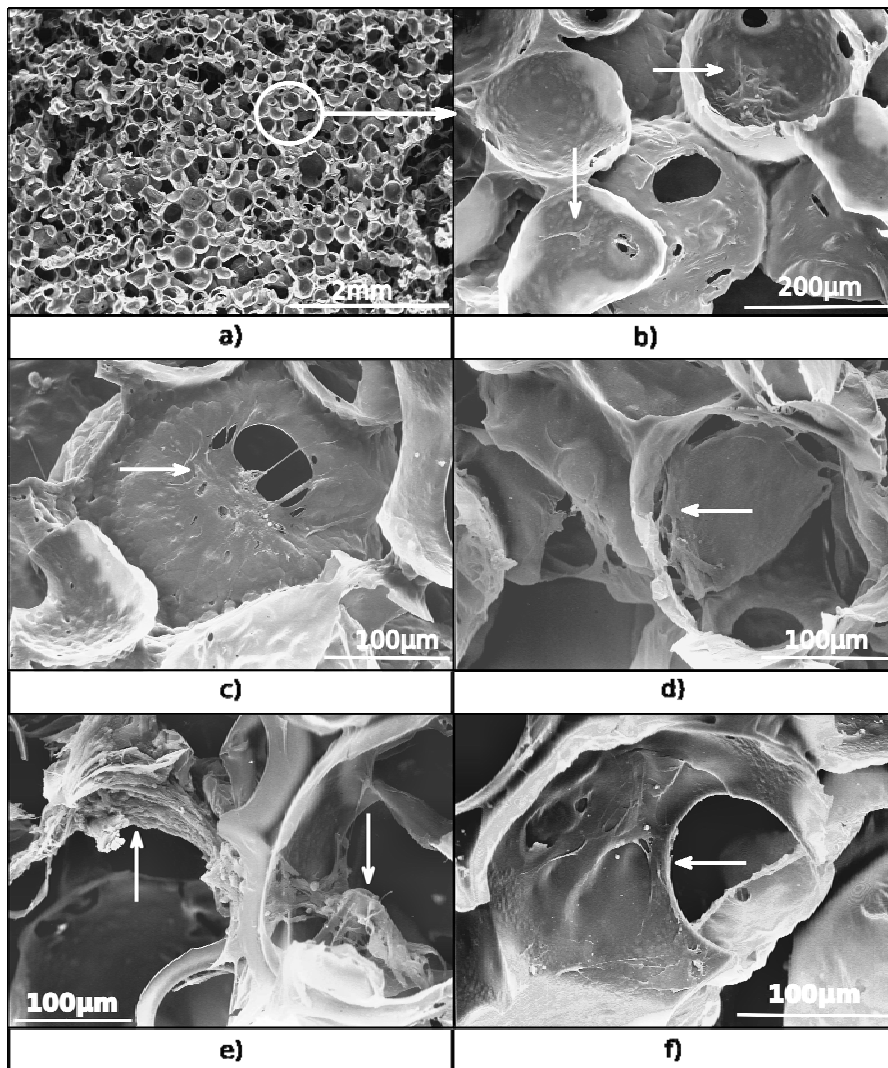


Figure 2.17 : Morphologie des scaffolds ensemencés par des CSM du lapin. a) et b) J1, c) J4, d) J7, e) J14, f) J21. Les flèches blanches montrent la localisation des cellules.

2.3.3.4.2 Evaluation in vivo

L'implantation chez le rat a permis d'évaluer la pénétration tissulaire au sein des structures. L'étude histologique montre la pénétration graduelle des tissus et des cellules caractéristiques d'une réaction d'inflammation et de résorption. La figure 2.18 présente les coupes histologiques représentatives de ces expériences.

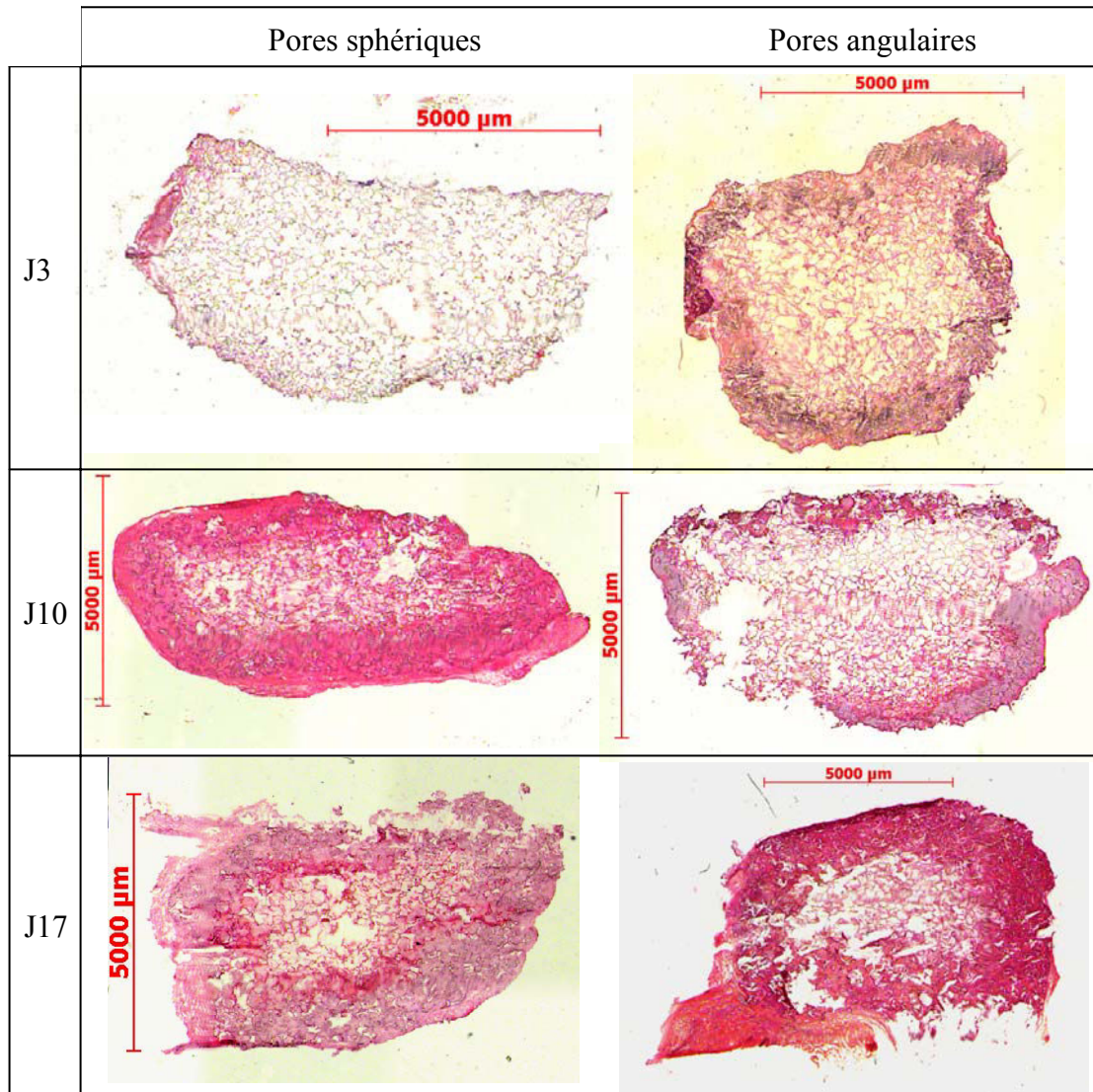


Figure 2.18 : Coupes histologiques des scaffolds à J3, J10 et J17 après implantation.

Après 3 jours d'implantation, la pénétration cellulaire et tissulaire est limitée dans les zones périphériques du scaffold. On peut cependant noter une colonisation plus importante des premiers pores de la structure à pores angulaires. La réponse de l'hôte n'est probablement pas encore complètement apparue. Après 10 jours d'implantation, une capsule fibreuse commence à englober les scaffolds et on remarque dans les deux structures une pénétration tissulaire (en

rose). Cette matrice contient des cellules nucléées et plurinucléées provenant très vraisemblablement de la réaction d'inflammation et de résorption. La pénétration tissulaire, dans les scaffolds à pores sphériques et interconnectés, est plus profonde comme le montre les images prises à J10 de la figure 2.18. Aussi, la présence d'un réseau fibreux au centre des scaffolds a pu être observée par les coupes d'histologie mais aussi par l'étude en microscopie électronique (figure 2.19, J10, pores sphériques). Après 17 jours d'implantation, un tissu fibreux a presque complètement colonisé les scaffolds à pores interconnectés (figure 2.18, pores sphériques) alors qu'une large zone au centre du second type de scaffold reste encore libre de tissus (figure 2.18, J17, pores angulaires). L'étude en microscopie électronique corrobore ces résultats (figure 2.19).

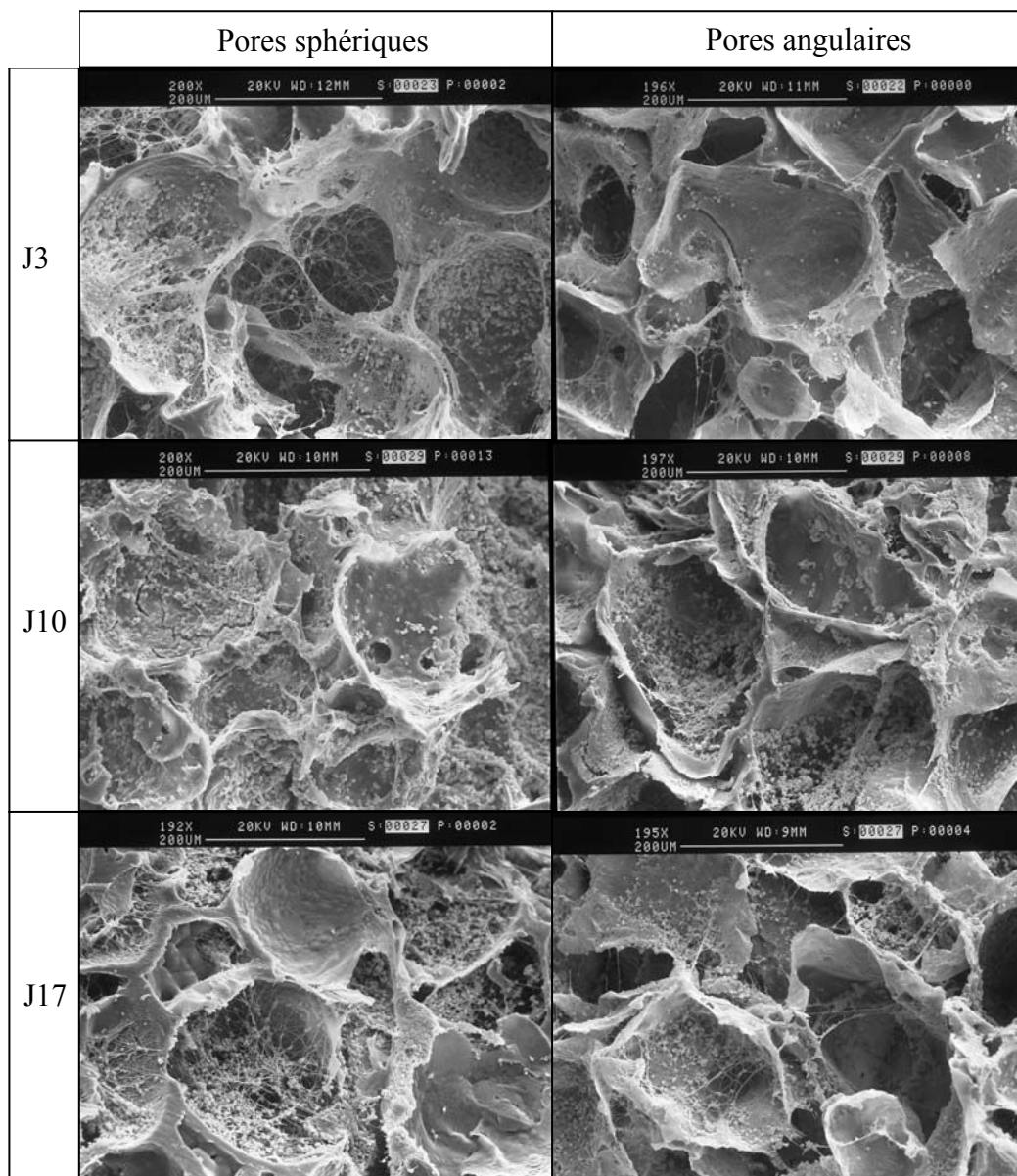


Figure 2.19 : Morphologie du centre des scaffolds après implantation.

Un réseau de fibrine, dès les premiers jours d'implantation, a été observé. Cependant, dans les scaffolds à pores interconnectés, il est beaucoup plus dense. Lorsque la durée d'implantation augmente, ce tissu fibreux se densifie et il est possible d'observer au centre des scaffolds des cellules, probablement des macrophages qui se sont infiltrés à travers les pores (figure 2.20).

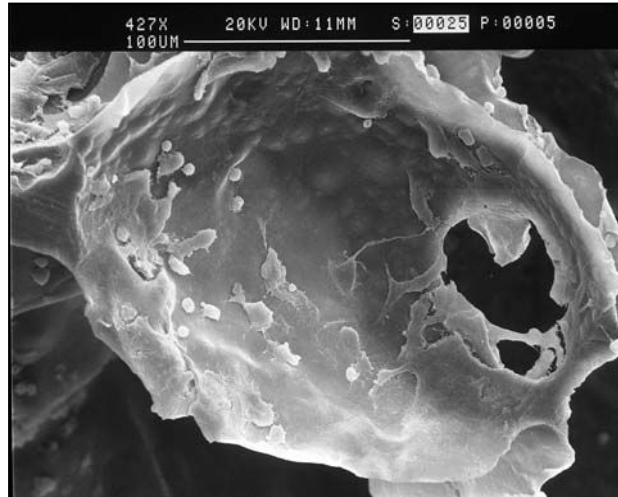


Figure 2.20 : Infiltration de cellules dans les pores internes des scaffolds après 3 jours d'implantation.

L'implantation animale a montré que les scaffolds élaborés par la technique développée au laboratoire font preuve d'un comportement *in vivo* supérieur à ceux fabriqués sans sphérolisation du porogène, dans le sens où la pénétration et la survie cellulaire ont été prouvées.

2.4 Discussion

2.4.1 Procédé de fabrication

Le but de ce travail était de développer un procédé de fabrication basé sur le *solvent casting/particulate leaching out* permettant de modifier l'architecture interne des pores tout en conservant l'emploi d'un porogène hydrosoluble afin d'éviter l'utilisation supplémentaire de solvants organiques lors de l'étape de *leaching out*.

L'utilisation de sucre comme porogène présente plusieurs avantages non négligeables. En raison de sa basse température de fusion ($\sim 190^{\circ}\text{C}$) ce porogène peut être sphérolisé facilement par une flamme d'énergie moyenne issue d'un bec Meker. De plus, c'est un porogène déjà utilisé par différents Groupes de recherche et il est communément accepté dans la fabrication de structures poreuses [ZHA 00] [FRO 02] [HOU 03]. L'utilisation de sucre

comme porogène présente un intérêt économique dû au faible coût de cette matière première et à sa grande disponibilité.

Cette technique se basant sur le SC/LO ne requiert pas d'équipement sophistiqué et coûteux comme c'est le cas pour le FDM ou le *gas foaming*.

Dans la littérature, une technique de sphérolisation de particules de chlorure de sodium a été développée par Gross et *al.* afin de pouvoir modifier la géométrie des particules, ces auteurs ont utilisé une flamme torche employée dans les procédés de décapage thermique [GRO 04]. Cette flamme hautement énergétique permet elle aussi de sphéroliser les particules de sel. Afin d'obtenir une bonne interconnectivité, une étape supplémentaire est nécessaire. Les sphères subissent un frittage à haute température pour engendrer la formation de cols entre elles. Ce frittage représente une dépense énergétique relativement importante puisqu'il est effectué à 750°C pendant plusieurs heures. L'emploi de particules de sucre est donc un gain en termes, de temps, d'énergie et conséquemment minimise le coût de fabrication des scaffolds.

L'utilisation d'eau distillée pour éliminer le porogène est un autre avantage de la technique. De nombreux Groupes de recherche ont employé de la paraffine en vue de fabriquer des sphères servant à l'élaboration des structures tridimensionnelles [MA 01] [MA 03] [CHE 04] [ZHA 05a] comme cela a été présenté dans le premier paragraphe de cette partie. Ces billes sont ensuite mélangées à une solution de polymère ou bien compressées et frittées à 40°C pour provoquer la formation de cols avant de subir un *solvent casting*. La paraffine est ensuite éliminée grâce à l'action d'hexane ou de cyclohexane. Les scaffolds possèdent une morphologie similaire à ceux que nous avons obtenus. Cependant, ce procédé se heurte à plusieurs limitations. Premièrement, l'emploi de ces solvants organiques nécessite un séchage rigoureux des scaffolds pour diminuer le taux résiduel de solvant afin qu'il ne soit pas toxique pour les cellules. Deuxièmement, la taille des scaffolds reste relativement petite (cylindres de 17 mm de diamètre et de 3 mm de hauteur [MA 01]). Des tests, effectués dans notre laboratoire en utilisant cette technique, ont montré que la fabrication de scaffolds de grandes dimensions (des cylindres de 11 mm de diamètre et de 20 mm de hauteur) est quasiment impossible, la paraffine étant difficile à éliminer au centre des structures comme le prouve l'image prise en microscopie électronique d'un scaffold qui a subi 15 jours de *leaching out* dans de l'hexane (figure 2.21).

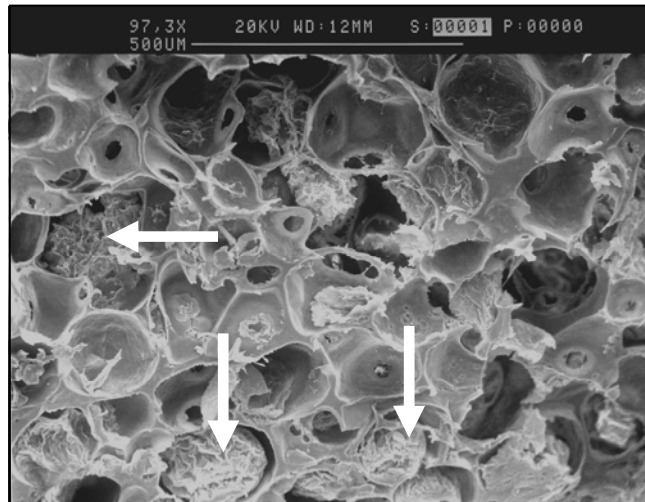


Figure 2.21 : Scaffold de PLLA fabriqué avec des sphères de paraffine. Le scaffold a subi un *leaching out* de 15 jours dans de l'hexane. Les flèches blanches mettent en évidence la présence de paraffine résiduelle.

Ce scaffold a subi 15 jours de *leaching out* dans l'hexane, ce dernier a été renouvelé 3 fois par jour. Il semble donc peu aisé d'éliminer complètement ce porogène pour les structures de grandes dimensions. Des scaffolds de dimensions similaires ont été fabriqués avec des sphères de sucre pour les besoins de l'évaluation mécanique par la méthode que j'ai développée. Le porogène dans ces structures a été éliminé en l'espace de 3 à 4 jours avec de l'eau sans que la présence de sucre résiduel n'ait pu être observée.

D'autres porogènes ont été employés dans la fabrication de particules sphériques. Le premier paragraphe de cette partie rapporte les travaux de Liu et *al.* [LIU 06], qui en utilisant de la gélatine, ont réussi à élaborer des sphères sans employer de surfactants. Cette technique, bien qu'intéressante, présente néanmoins le désavantage de nécessiter du cyclohexane pour l'étape de *leaching out*. Aussi, de délicates étapes d'extraction des solvants et de séchage à froid sont obligatoires afin de préserver la forme sphérique des particules. Leurs séchages peuvent durer jusqu'à 8 jours ce qui, en cumulant la durée de l'étape de *solvent casting*, de *leaching out* et de séchage final, peut amener le temps de fabrication des scaffolds à 13-15 jours. Ces auteurs ont rapporté la présence résiduelle de gélatine dans les structures [LIU 06]. Ce phénomène améliore l'adhésion cellulaire. Il constitue cependant une limitation puisque l'incorporation de gélatine d'origine animale peut éventuellement être associée à la transmission de maladie.

2.4.2 Propriétés des scaffolds

2.4.2.1 Propriétés physiques

L'utilisation de la technique de *solvent casting/leaching out* permet de pouvoir ajuster la porosité des scaffolds. De nombreux travaux ont mis en évidence ce phénomène. La variation de la porosité est généralement obtenue par l'emploi de solutions plus ou moins concentrées ou bien en changeant la fraction massique de porogène [MIK 94] [MA 01]. L'emploi de ces mousses est la plupart du temps dédié à l'ingénierie tissulaire du cartilage ou de l'os [GRO 04] [HAC 07], la résistance à la compression est donc une caractéristique importante. La possibilité qu'offre cette méthode de pouvoir ajuster la porosité et donc par conséquent, le comportement à compression des scaffolds, permet aussi de viser la reconstruction de différents tissus.

2.4.2.2 Propriétés biologiques

L'évaluation biologique *in vitro* a montré que des cellules peuvent survivre et proliférer plusieurs millimètres à l'intérieur des scaffolds. Cela montre que l'irrigation en oxygène et en nutriment à l'intérieur du scaffold est suffisante pour permettre le fonctionnement normal du métabolisme cellulaire. Malda a étudié la diffusion des fluides et des gaz dans des scaffolds et a montré que, dans la plupart des cas, ils ne pénètrent pas au centre des structures [MAL 04]. Le système de culture qui a été utilisé lors de l'évaluation *in vitro* est de type statique. Ainsi, la circulation des fluides et des gaz ne repose que sur les phénomènes de diffusion et de convection. Lewis et *al.* ont montré par une modélisation mathématique que ce type de culture conduit inévitablement à des zones de prolifération hétérogène se situant près des bords des scaffolds [LEW 05]. Ce phénomène a été remarqué pendant nos observations. Il est cependant remarquable qu'après 21 jours de culture, les cellules du centre soient encore viables et qu'elles ne présentent pas de signe de souffrance cellulaire. Vraisemblablement, les nombreuses cellules, proches des bords du scaffold, auraient dû consommer les nutriments et l'oxygène, empêchant ainsi les cellules situées au centre d'en bénéficier. Ceci prouve que, malgré un fort niveau de consommation des gaz et des nutriments, ces derniers peuvent atteindre le centre du scaffold et ce grâce à l'architecture interconnectée des structures. Il n'est pas impossible qu'une culture sous perfusion permette une prolifération plus importante dans le centre du scaffold.

Lors de l'implantation animale, un dense et important tissu fibreux a encapsulé et a pénétré dans les scaffolds. Il existe néanmoins un gradient de densité cellulaire. Ceci peut s'expliquer

par un moins bon accès des nutriments au centre des scaffolds. Là aussi, après 17 jours d'implantation, des cellules nucléées ont été observées au centre des scaffolds montrant ainsi que la diffusion des gaz et des nutriments, même si elle n'est pas optimale, a tout de même lieu.

2.4.2.3 Taille, géométrie des pores et interconnectivité

La taille et la morphologie des pores semblent influencer de façon conséquente l'adhésion, la migration cellulaire, et la pénétration des tissus au sein des structures. C'est donc un paramètre important pour l'ingénierie tissulaire. L'impact de la taille des pores a été étudié par de nombreux chercheurs et il est communément accepté qu'une taille de pore de 100 à 400 μm est optimale pour la régénération tissulaire de l'os et pour l'ostéoconduction [ZAR 01]. Plus récemment, Oh et *al.* ont avancé que la taille des pores pourrait affecter la prolifération *in vitro* de différents types cellulaires [OH 07]. Ces chercheurs ont montré que les fibroblastes préfèrent des petits pores de l'ordre de 200 μm de diamètre alors que les chondrocytes et les ostéoblastes seraient plus « confortables » dans des pores plus gros (290-400 μm). L'avantage de la technique de sphérolisation des particules de sucre vient du fait que plusieurs gammes de taille de particules, entre 200 et 500 μm , peuvent être utilisées. Il est possible de s'orienter vers la culture de tel ou tel tissu en fonction de la sélection du diamètre du porogène.

Cependant, des résultats contradictoires ont été avancés concernant l'effet de la taille des pores lors d'études *in vivo*. Il a été montré que la formation d'os dans le crâne du lapin a eu lieu dans des scaffolds possédant des pores de diamètres variant de 290 à 310 μm . D'autres auteurs ont démontré que le diamètre des pores n'a pas d'impact lors d'étude *in vivo*, si le scaffold possède une porosité complètement interconnectée [LU 99]. Ces auteurs soulignent l'importance de la taille des passages d'interconnexion entre les pores qui doivent se situer autour d'une valeur minimale de 50 μm . C'est la taille qui peut être obtenue si notre procédé est utilisé. Comme le montre la figure 2.12, les passages d'interconnection possèdent une taille située entre 10 et 100 μm . Cela semble être suffisant pour permettre la pénétration tissulaire et favoriser sa croissance.

L'interconnectivité des scaffolds est un paramètre primordial dans la fabrication des structures. De nombreux travaux traitent de son amélioration. Il existe différentes possibilités pour augmenter l'interconnexion entre les particules de porogène. Les techniques de *salt fusion* [MUR 02] ou *sugar fusion* [HOU 03], de frittage de paraffine [MA 01] ou de sel [GRO 04], déjà décrites dans le premier paragraphe de cette partie permettent la formation de

cols inter-particules. La création des cols peut s'opérer selon deux grandes tendances. La première est de placer un porogène hydrosoluble dans une atmosphère saturée en vapeur d'eau afin de promouvoir la mobilité des atomes [MUR 02] [HOU 03]. L'autre technique est un frittage à plus ou moins haute température pour provoquer la diffusion des éléments et la formation de cols [MA 01] [GRO 04]. Dans la technique employée ici, il n'est pas nécessaire de procéder à une telle étape. Le sucre, une fois sphérolisé, est du caramel, un peu collant et les particules de sucre s'agrègent entre elles, formant un négatif où elles ont déjà des points de contacts et où se forment naturellement les cols.

Le niveau d'interconnection peut être encore augmenté en couplant la technique de SC/LO avec celle de séparation de phase thermiquement induite. Chen et *al.* [CHE 04] ont développé cette méthode couplée pour des sphères de paraffine et une solution de PLLA. Lorsque le *solvent casting* a été effectué, le mélange de porogène et de polymère est placé dans une enceinte à basse température pour permettre la séparation de phase. Après le *leaching out* de la paraffine et séchage des scaffolds, ces auteurs ont obtenu des scaffolds dont les pores sont sphériques et macroscopiquement interconnectés mais aussi microscopiquement interconnectés puisque la structure de la paroi des pores consiste en une multitude de micro-fibres. Ce même procédé peut aussi être employé avec notre technique de sphérolisation en alliant ainsi tous ces avantages au niveau de l'interconnectivité avec celui de l'utilisation d'eau pour éliminer le sucre.

Une autre méthode pour augmenter l'interconnectivité est l'introduction de canaux. En utilisant une technique d'impression 3D, Kim et *al.* ont élaboré un scaffold possédant un réseau interne et interconnecté de canaux [KIM 98]. Ces auteurs ont montré que les cellules ont adhéré et survécu au centre même du scaffold. Il a été suggéré que la présence du réseau de canaux augmente la capacité d'apport d'oxygène et de nutriments.

D'autres travaux ont montré que l'insertion d'un ou de plusieurs canaux de diamètres variables dans des céramiques poreuses permet d'obtenir une pénétration cellulaire importante [ROS 04]. Il semble aussi qu'un diamètre minimal de 100 μm soit nécessaire pour l'infiltration cellulaire [ROS 04]. Des canaux peuvent aussi servir de trame pour la construction de micro-vaisseaux permettant une irrigation sanguine. Van der Blitterswijk a montré la formation *in vivo* de tels vaisseaux dont le lumen est recouvert de cellules endothéliales, les scaffolds ayant étéensemencés par un mélange de CSM et de cellules endothéliales. Cependant, ces vaisseaux n'étaient pas fonctionnels [VAN 07].

L'introduction de canaux dans les structures qui sont développées dans ce travail est tout à fait possible par une méthode de fusion du sucre ainsi que la figure 2.13 le met en évidence.

Ces canaux de diamètre supérieur à 100 μm devrait permettre de faciliter l'infiltration cellulaire *in vitro* et *in vivo*. Un désavantage de la technique développée par Zhang et al. [ZHA 00] est le mauvais contrôle et la mauvaise reproductibilité du diamètre des cylindres de sucre.

2.5 Conclusion

Ce travail a permis le développement d'une technique modifiée de SC/LO permettant la fabrication de scaffold possédant des pores sphériques et interconnectés. Il a été montré que les propriétés mécaniques des scaffolds peuvent être ajustées. Aussi, la biocompatibilité *in vitro* a été démontrée. La présence de cellules viables au centre des scaffolds semble indiquer que la diffusion des gaz et des nutriments au sein de la structure n'est pas limitée à sa périphérie. Ces scaffolds répondent au cahier des charges défini dans la partie introductive de ce mémoire. Ils sont en effet biocompatibles, biodégradables et possèdent une porosité élevée et interconnectée, les propriétés mécaniques sont ajustables selon le tissu qu'on tente de reconstruire. L'étude *in vivo* a permis de montrer une bonne pénétration cellulaire et tissulaire dans les scaffolds.

Le point le plus important de ce travail a été l'amélioration de l'interconnexion de la porosité qui peut être encore augmentée par l'incorporation de canaux de diffusion dans les structures ou bien la modification des parois des pores.

Ce procédé, de par sa grande versatilité, peut être employé avec d'autres polymères ce qui signifie qu'il est possible de faire varier les propriétés mécaniques et la durée de dégradation des scaffolds.

Une des perspectives de ce travail, serait de tester les scaffolds possédant des canaux à la fois *in vivo* et *in vitro* et de comparer ces résultats avec ceux obtenus avec les scaffolds sans canaux.

Un autre travail à envisager serait l'incorporation de facteurs de croissance dans les scaffolds qui seraient libérés progressivement.

Une autre étude intéressante pourrait considérer la modification de la surface des pores par des attaques chimiques (attaque acide, ou basique) ou bien par le greffage de molécules (par aminolyse) améliorant l'adhésion cellulaire.

Partie 3

3 Electrospinning : déposition de microfibres

Ce procédé permet la fabrication de structures fibreuses micro- ou nano-structurées. Son intérêt dans l'ingénierie tissulaire repose principalement sur le fait que le scaffold imite, dans sa morphologie, celle de la matrice extracellulaire. Il est généralement admis que les cellules devraient adhérer en plus grand nombre et s'accrocher plus fermement sur un tapis fibreux que sur une membrane pleine, car les fibres imitent au plus près leur « environnement naturel ». En comparant un film de polyuréthane (PU) et des nanofibres de ce même matériau, il a été montré qu'après 24 h de culture la structure fibreuse contient plus de cellules [LEE 05].

Cette partie expose les principes du procédé, il précise en outre les paramètres qui influent sur la déposition des fibres de polymère. Les limitations de la technique y sont abordées ainsi qu'une étude de cas détaillant la fabrication de microfibres de diamètre contrôlé, les tests de biocompatibilité effectués sur des cellules souches du lapin, et l'évaluation morphologique.

3.1 Le procédé

3.1.1 Principe et description

Abordons en premier lieu le principe du procédé. L'*electrospinning* (de sa traduction littérale : électro-filage) est un procédé permettant de fabriquer des fibres polymères ayant une dimension nanométrique ou micrométrique. Cette technique est connue depuis le début du 20^{ème} siècle. Zeleny en 1917 observa le phénomène d'*electrospraying* [ZEL 17] et Taylor en 1964, analysa les conditions sous lesquelles une goutte est déformée par un champ électrostatique [TAY 64]. Cette technique a déjà fait l'objet d'un dépôt de brevet par Formhals [FOR 34]. Ces dernières années, le nombre de publications relatant l'utilisation ou le développement du procédé d'*electrospinning* a augmenté exponentiellement comme le résume la figure 3.1, montrant ainsi le regain d'intérêt que suscite cette méthode et, ce, dans différents domaines des sciences appliquées. Cela peut en effet s'expliquer par le nombre important d'applications de l'*electrospinning*. Les micro- ou nanofibres peuvent être employées dans des domaines variés tels que le textile, la filtration (air ou eau) et bien entendu dans les sciences et technologies biomédicales dont l'ingénierie tissulaire fait partie.

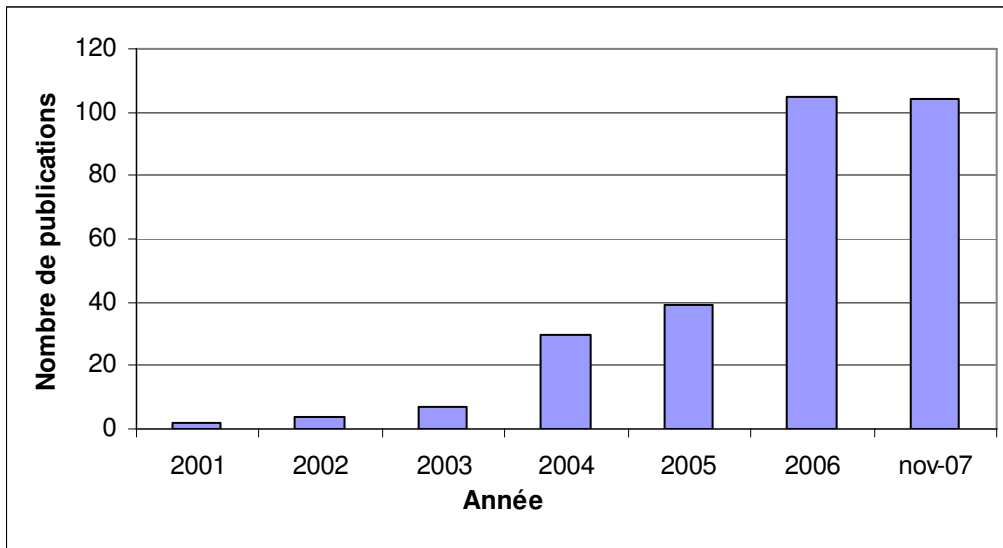


Figure 3.1 : Evolution du nombre de publications concernant la technique d'*electrospinning*.

Source : Pubmed Central.

Le principe de la déposition reste relativement simple. Le matériel employé reste basique, et il est généralement constitué par un pousse-seringue, une seringue, un tuyau, une aiguille et une alimentation haute-tension. Le principe du procédé est le suivant : une solution de polymère (ou un polymère fondu) est acheminée d'un réservoir (généralement, une seringue) vers une aiguille où un champ électrostatique de plusieurs kV est appliqué. Sous l'effet des forces électrostatiques se créant au sein de la solution de polymère, la goutte de polymère, en sortie de l'aiguille, s'allonge formant un cône dit de Taylor. Si le champ a atteint une valeur seuil, les forces électrostatiques vont vaincre les forces de tension de surface de la goutte de polymère provoquant la formation d'un jet. La formation de ce jet est principalement due au mouvement des charges libres à la surface et dans la solution de polymère. En d'autres mots, la force de traction s'appliquant sur le polymère en solution, générée par ce procédé, provient des interactions électriques entre le champ externe appliqué et les charges électriques contenues et acheminées par le jet. Lorsque les charges libres de la solution de polymère migrent en réponse au champ électrostatique, elles transfèrent très rapidement une force au polymère et provoque la déformation du jet. Le jet peut être décomposé en quatre parties différentes [REN 96]. On distingue en effet la base qui est constituée par le cône de Taylor, le jet, la zone d'instabilité du jet, et la zone de déposition appelée plus couramment collecteur. La figure 3.2 présente un schéma de la déposition.

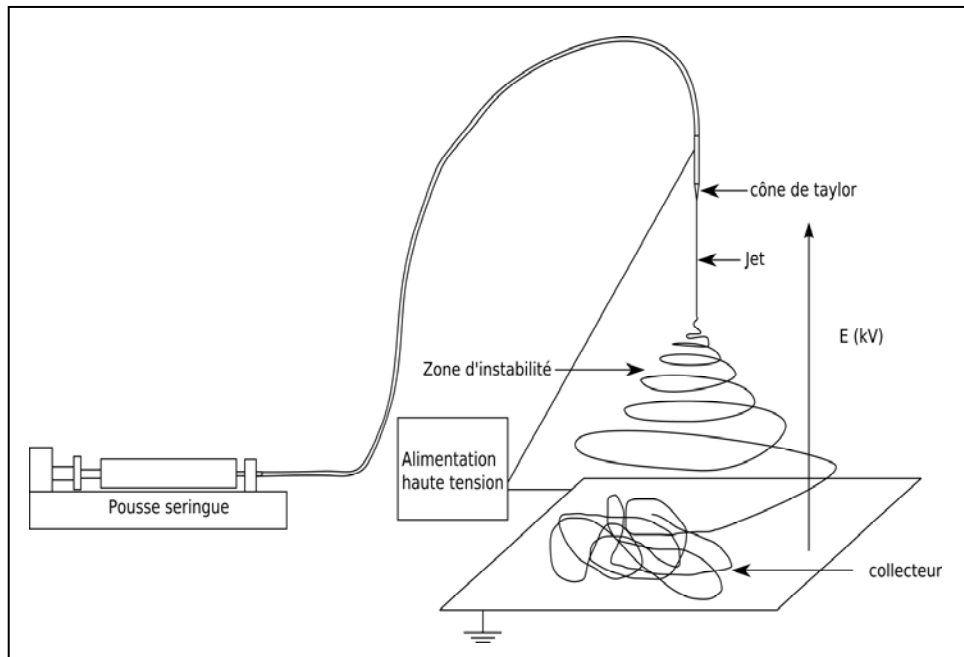


Figure 3.2 : Schéma descriptif du procédé d'*electrospinning*.

➤ La base

La base est la région d'où émerge le jet. Si aucun champ n'est appliqué, c'est une goutte sphérique. Sous l'effet du champ électrostatique, cette goutte subit deux principaux types de forces électrostatiques : la répulsion électrostatique entre les charges et l'interaction Coulombienne exercée par le champ extérieur [LI 04a]. Lorsqu'on dépasse une valeur seuil, la goutte se distord et prend une géométrie conique. C'est le cône que Taylor décrit en 1964 [TAY 64]. Les charges contenues dans la solution commencent à être accélérées. La géométrie du cône de Taylor peut être multiple et elle est fonction, pour une solution donnée, de la valeur du champ appliqué. Il a été démontré que lorsque des champs, ayant une valeur plus importante, ont été employés, le cône de Taylor voit son diamètre se réduire dans un premier temps, et, si l'on augmente encore la tension, il peut rétrocéder dans l'aiguille. En effet, si le champ appliqué est important, les charges libres contenues dans la solution vont migrer plus rapidement et un volume plus grand sera éjecté du cône de Taylor ce qui produit un cône de Taylor plus petit, qui a son origine, non plus en sortie de l'aiguille, mais à l'intérieur de cette dernière. La valeur du champ a une influence importante sur le procédé et cela sera abordé dans la section concernant les paramètres influant le procédé.

➤ Le jet

La seconde partie est le jet. Le jet se situe après le cône de Taylor, et il constitue l'endroit où les forces électrostatiques continuent à accélérer le polymère en solution. Ces mêmes forces électrostatiques vont contribuer à l'élongation du jet. Dans cette région, le diamètre du jet décroît et sa longueur augmente de telle sorte que la quantité de masse par unité de temps passant par un point de l'axe du jet reste constante. L'accélération du polymère a lieu par l'intermédiaire d'un transfert de force le long du jet qui possède alors un comportement viscoélastique. Les paramètres viscoélastiques de ce fluide sont dépendants du temps, puisque le solvant s'évapore pendant la déposition. En effet, au début du jet le polymère est en solution et se comporte comme un fluide d'un point de vue mécanique. Ensuite, et au fur et à mesure que le solvant s'évapore, la viscosité du fluide augmente et l'on tend à atteindre l'état solide. Les charges dans le jet sont responsables du transport du polymère dans la direction du champ et vers le collecteur. Cela constitue le mécanisme par lequel les charges atteignent le collecteur bouclant ainsi le circuit électrique. Cependant, avant que les fibres aient pu être déposées, le jet subit une instabilité, et c'est ce phénomène que nous décrivons ci-après.

➤ La zone d'instabilité

Renket et *al.* ont émis l'hypothèse que le jet subit une instabilité lorsque les forces radiales de répulsion produites par les charges électriques deviennent plus importantes que les forces de cohésion dans le jet [REN 96]. Il se divise donc en plusieurs jets. Cependant, cette approche est désormais contestée [SHI 01]. En utilisant des clichés obtenus après un temps d'exposition très court (18 ns), il s'avère, que ce qui semblait être de multiples jets est en fait un jet unique ondulant à une fréquence si grande qu'il forme un cône inversé comme le montre la figure 3.3.

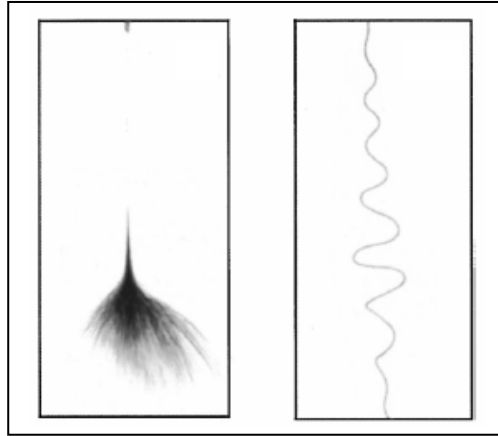


Figure 3.3 : Images de la zone d'instabilité du jet. PEO à 2% (m/vol) dans de l'eau.

a) 1 ms d'exposition, b) 18 ns d'exposition. Tiré de [SHI 01].

Cette instabilité provoque la courbure du jet et son étirement, et conséquemment le diamètre du jet décroît. A partir de ce moment, on peut considérer le jet comme une solution extrêmement visqueuse. Le jet se dépose ensuite sur le collecteur.

➤ Le collecteur

Le collecteur est l'endroit où le jet est stoppé. C'est généralement une plaque métallique bien que d'autres supports non conducteurs aient été utilisés [LI 04b]. La viscosité du jet peut varier un peu selon les paramètres de la déposition, cependant le jet est quasiment solide lorsqu'il entre en contact avec le collecteur. Les fibres obtenues peuvent être « mouillées » si la distance entre le collecteur et l'aiguille est petite, le solvant n'ayant pas le temps de s'évaporer, ce qui influera sur la morphologie et les propriétés mécaniques des membranes.

Pour résumer cette section, l'*electrospinning* est un procédé issu de l'*electrospraying* qui en diffère de par l'utilisation de solutions de polymère assez concentrées. Il permet ainsi, sous l'effet des forces électrostatiques créées par l'application d'un champ électrostatique, de déposer des fibres ayant un diamètre pouvant varier de la centaine de nanomètres à plusieurs micromètres.

Le principe de l'*electrospinning* étant désormais présenté, il est nécessaire d'étudier les paramètres qui vont influencer sur ce procédé et sur la morphologie et le diamètre des fibres.

3.1.2 Paramètres influençant le procédé

Il convient, avant d'aborder cette partie, de dire un mot concernant les fibres qui peuvent être obtenues par l'*electrospinning*. Ces fibres peuvent posséder un grand ou un petit diamètre, ce sont généralement des cylindres pleins, mais elles peuvent aussi être creuses (ce sont alors des nanotubes), être poreuses, adopter une configuration hélicoïdale, avoir des embranchements, etc. Ainsi, il convient de clarifier sur quels aspects les paramètres du procédé vont influencer. Les deux principales propriétés des fibres sont, d'une part, le diamètre, et d'autre part, la présence de gouttes de polymères reliées par des fibres (figure 3.4). Ces gouttes sont appelées *beads* en anglais (dénomination qui sera utilisée dans le reste du mémoire afin de bien distinguer les gouttes obtenues après déposition de celles qui se forment en sortie de l'aiguille).

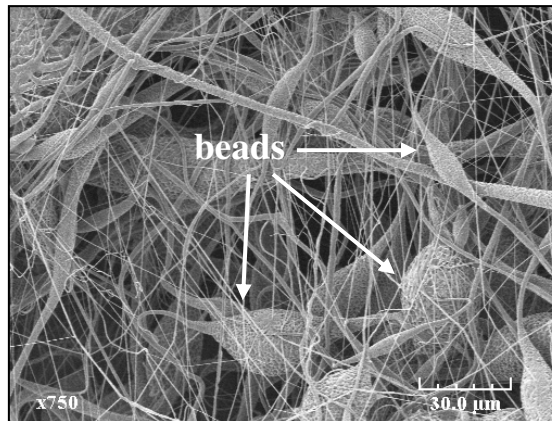


Figure 3.4 : Membrane de PCL obtenue par *electrospinning* avec présence de *beads* (flèches blanches). LEMTA.

Pour notre application, la présence de *beads* est un phénomène indésirable. Ainsi, les paramètres du procédé seront évalués par rapport à la propension qu'ils ont à modifier le diamètre des fibres et à éviter la formation de *beads*.

3.1.2.1 Propriétés de la solution de polymère

Les paramètres de la solution ont une influence primordiale sur le diamètre des fibres et la formation de *beads*. Ils peuvent avoir un impact sur des aspects secondaires tels que la stabilité du cône de Taylor, la stabilité du jet au cours du temps, etc.

3.1.2.1.1 Masse molaire du polymère et viscosité de la solution

Masse molaire et viscosité sont intimement liées puisque la dissolution d'un polymère de haute masse molaire donnera une solution visqueuse alors que la dissolution de ce même polymère ayant une masse molaire plus petite donnera une solution peu visqueuse dans un même solvant.

➤ Diamètre de fibres et formation de *beads*

De nombreuses publications traitent de l'impact de la viscosité de la solution sur le procédé. Fong et al. [FON 99] se sont intéressés à la relation entre la viscosité d'une solution aqueuse d'oxyde de polyéthylène (PEO) ($M_w = 90\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) et la formation de *beads*. Ces chercheurs ont montré que la densité de *beads* diminue avec l'augmentation de la viscosité de la solution électrospinnée. Pour les solutions ayant une concentration élevée ($> 4\%$ (m/vol)) les *beads* ont disparu. La même tendance est observée lors de la déposition de solutions de polyuréthane dans de la DMF ayant des concentrations allant de 2,5 à 12,8% (m/vol) [DEM 02]. A faibles concentrations, le procédé n'est pas stable et le jet se brise en gouttelettes. Cependant, à partir d'une valeur de concentration seuil, un jet continu est formé. Plus récemment, Bölgen et al. [BÖL 05] ont effectué une étude systématique de déposition de poly- ϵ -caprolactone (PCL) ($M_w = 80\,000 \text{ g.mol}^{-1}$) en solution dans un mélange de chloroforme/diméthylformamide (DMF) de rapport volumique 30/70. En faisant varier la concentration de PCL, ils ont mis en évidence qu'à partir de 13% (m/vol) les fibres obtenues ne comportent peu ou plus de *beads*. Conjointement, le diamètre des fibres déposées a été mesuré et il en ressort qu'il augmente avec la concentration. Cette observation est corroborée pour un grand nombre de polymères [MEG 02] [INA 05] [KWO 05] [YAN 05]. Une explication de ce phénomène peut être avancée. Lorsqu'une solution visqueuse est électrospinnée, la résistance viscoélastique de la solution est plus importante, ainsi les charges auront plus de difficulté à étirer le jet produisant ainsi des fibres de diamètre plus grand. Il est probable que l'apparition de jets secondaires lors de l'emploi d'une solution peu visqueuse entraîne une augmentation du diamètre des fibres avec la viscosité. Des jets secondaires, apparaissant fréquemment pour des solutions peu concentrées, sont plus petits et vont ainsi produire des fibres de diamètre inférieur, ce qui diminuera la taille moyenne des fibres.

La déposition des polyesters a été largement étudiée, et selon les résultats de la littérature, il est possible de rassembler les tenants et les aboutissants de ces différents travaux (tableau 3-1).

Le tableau 3-1 permet de visualiser les solvants et les concentrations les plus couramment employés pour ce procédé. Il constitue une base de données à laquelle nous pourrions nous référer pour la déposition de fibres dont les caractéristiques (diamètre, présence de *beads*, etc.) sont connues. Par exemple, l'obtention de fibres de PCL sans *beads* est possible à une concentration de 13% (m/vol) dans les solvants chlorés, bien que certaines exceptions soient présentes pour des polymères de plus faible masse molaire.

L'effet de la masse molaire est néanmoins clairement visualisé. En effet, à la lecture du tableau 3-1, on remarque que l'augmentation de la masse molaire du PLLA permet de diminuer la concentration des solutions tout en conservant la formation de fibres sans *beads*.

Tableau 3-1 : Paramètres de l'*electrospinning*.

Polymère <i>M_w</i> [g.mol ⁻¹]	Solvant % <i>, vol/vol</i>	Conditions de déposition					Propriétés des fibres		Référence
		Concentration [% <i>, m/vol</i>]	Distance [cm]	Tension [kV]	Débit [mL.h ⁻¹]	Aiguille	Diamètre	<i>Bead</i>	
PCL 40 000	DCM	7,5	30	12,5	10	-	5,6 μm	non	[KWO 05]
PCL 67 000	CF/MET 75/25	9	20	20	0,5	20G	559 ± 300 nm	non	[SCH 07]
PCL 80 000	CF/DMF 30/70	4	10	13	-	1 mm	52 ± 10 nm	+++	[BÖL 05]
		6					59 ± 10 nm	+++	
		8					66 ± 10 nm	+++	
		10					80 ± 10 nm	++	
		13					93 ± 10 nm	+	
	15	250 ± 10 nm	non						
	CF/DMF 10/90 30/70 60/40 70/30 100/0	13	10	13	-	1 mm	196 ± 15 nm 250 ± 15 nm 300 ± 20 nm 689 ± 30 nm 1297 ± 35 nm	+ + + + non	
CF/DMF 30/70	13	10	13 20 25 30	-	1 mm	93 ± 10 nm 99 ± 5 nm 105 ± 5 nm 115 ± 5 nm	+ ++ ++ +++		
TFE	12	10,5	6,4	0,2 0,4 0,6	1,25 mm	277 ± 140 nm 330 ± 167 nm 378 ± 149 nm	non	[ZHA 06]	
	10	-	0,5 kV/cm	-	-	0,1 - 1 μm	non	[ZHA 05]	

PCL	80 000	DCM	13					4,5 μm	non	[LEE 04]
			15					5,5 μm		
		DCM/DMF 85/15	10					390 nm	++	
			13					480 nm	non	
		75/25	10				1 mm	400 nm	++	
			13					300 nm	non	
		40/60	15	-	-	-		190 nm	non	
			10					550 nm	non	
			13					> 10 μm		
		DCM/Tol 85/15	13					> 10 μm	non	
		75/25						pas de fibres		
		40/60								
		DCM/DMF 75/25	8						++	
			9				0,5 mm	$\approx 1 \mu\text{m}$	non	
		50/50	8						++	
	9						++			
THF/DMF 50/50	14	20	12	-	18G	$\approx 1 \mu\text{m}$	non	[LI 06]		
CF/DMF 50/50	11	15	14	0,8	25G	600 nm	non	[PHA 06]		
CF/MET 87,5/12,5	8	18,5	27	3,5	22G	3 μm	non			
86/14	9	15	19	4,5	18G	4 μm				
84/16	10	16,5	20	8	18G	5 μm				
	12	19,5	22	8	18G	6 μm				
	13	23,5	22,5	8	18G	7 μm				
	14	28	24	8	16G	8 μm				
		33	27	10	16G	10 μm				
		33	25,5	18	16G					
CF/MET 75/25	7,5	13	12,5	0,75	0,84 mm	310 nm	non	[ZHA 05]		

PDLA	109 000	THF/DMF 50/50	35	20	10	-	18G	> 1 µm	non	[LI 06]	
PLLA	50 000	CF/DMF 91/9	14,5	20	16	-	18G	> 2 µm	non		
	100 000	HFIP	10	15	30	6	-	1 µm	non	[ZON 05]	
	650 000	DCM/DMF 85/15	3,8	-	-	0,6	0,5 mm	500-800 nm	non	[BHA 06]	
	450 000	DCM	4	30	12,5	10	-	4,5 µm	non	[KWO 05]	
PGA	150 000	HFIP	10	20	15	-	18G	< 1 µm	non		
PLGA 50/50	79 000	THF/DMF 50/50	35	20	12	-	18G	< 1 µm	non	[LI 06]	
	85/15 123 000	75/25	30						≈ 1 µm		
			10						-	pas de fibre	
			15						270 nm	++	
			20	20	20	-	20G	340 nm	non		
	50/50 56 000	THF/DMF 75/25	25						1 µm	non	
30								1,5 µm	non		
PLCL 70/30	200 000	DCM	20		20	-	16G	250 nm	non	[KAT 04]	
							18G	150 nm	non		
							20G	140 nm	non		
		7,5	20					865 nm			
		10						440 nm			
50/50 260 000	HFIP	15			-	20G	380 nm	non			
		20					340 nm				
		25					460 nm				
30/70 150 000	DCM	9	30	12,5	10			4,3 µm		[KWO 05]	
		7	30	12,5	10			7 µm			
		3	20	30	5			320 nm	non		
		3	20	15	10			1,2 µm			
			11	30	12,5	10		≈ 10 µm			

Abréviations :

PCL	poly(ε-caprolactone)	PLCL	acide poly(L-lactique-co-caprolactone)	MET	méthanol
PLLA	acide poly(L-lactique)	CF	chloroforme	THF	tétrahydrofurane
PDLA	acide poly(D,L-lactique)	DCM	dichlorométhane	Tol	toluène
PGA	acide polyglycolique	DMF	diméthylformamide		
PLGA	acide poly(L-lactique-co-glycolique)	HFIP	hexafluoroisopropanol		

➤ Effet sur la déposition

Comme il vient d'être mentionné dans le précédent paragraphe, une solution visqueuse est nécessaire pour obtenir des fibres sans *beads*. Cependant, la viscosité de la solution ne doit pas être trop élevée car cela peut engendrer des difficultés pour transporter la solution du réservoir jusqu'à l'aiguille. Lorsque la solution est trop concentrée, elle peut se solidifier très rapidement en sortant de l'aiguille, empêchant le procédé de fonctionner.

Certains auteurs ont remarqué que l'utilisation de solutions visqueuses réduit l'aire de déposition. Une viscosité importante réduit la zone d'instabilité du jet et empêche ainsi la formation du cône inversé, et le jet reste centré sur une zone plus restreinte [SHI 01] [MIT 04].

A l'opposé, une solution trop peu visqueuse provoquera la formation massive de *beads* [KAT 04] (cf. tableau 3-1). Ce procédé s'apparente alors à l'*electrospraying*.

➤ Effet sur les propriétés physiques des fibres

Le procédé de déposition influe sur le caractère cristallin du polymère utilisé. En comparant des membranes de PCL [LEE 03] et de PLLA [YAN 05] fabriquées soit par un casting conventionnel, soit par *electrospinning*, il a été montré que le taux de cristallinité du polymère électrospinné diminue. Cette diminution est attribuée à la solidification rapide du polymère. Les chaînes de polymère sont étirées lors de la déposition, mais la solidification étant rapide, elles n'ont pas le temps de se réorganiser en cristal [ZON 03].

3.1.2.1.2 Tension de surface

La formation et la géométrie du cône de Taylor sont fonction de la tension de surface de la solution de polymère. Lorsqu'elle est faible, la tension seuil nécessaire pour initier la déposition diminue.

La formation de *beads* est aussi dirigée par la tension de surface. En effet, la tension de surface tend à minimiser l'aire surfacique par unité de masse en changeant le jet en sphère. Une faible tension de surface doit conduire à la production de fibres sans *bead*. Cet énoncé théorique est relativement difficile à vérifier expérimentalement. Une des méthodes utilisées pour faire varier la tension de surface est d'utiliser des mélanges de solvants ayant des tensions de surface différentes. En faisant varier la composition du mélange, la viscosité de la solution de polymère varie elle aussi. Fong et *al.* ont montré qu'en abaissant la tension de surface et, par ce fait, en augmentant la viscosité, les fibres obtenues possèdent un diamètre plus important et ne comportent pas de *beads* [FON 99]. Lee et *al.* en utilisant un système PCL/DCM/DMF ont pu, dans une certaine mesure, faire varier la tension de surface des solutions tout en gardant leurs viscosités quasiment constantes [LEE 03]. Ainsi, les fibres fabriquées ne comportent pas de *beads* pour les solutions de plus faible tension de surface.

Cependant, la conductivité des solutions ayant augmenté, il est assez difficile de conclure quand à l'effet unique de la tension de surface.

3.1.2.1.3 Conductivité de la solution

Comme il a été mentionné au paragraphe 3.1.1, la formation de fibres, durant le procédé d'*electrospinning*, est essentiellement due aux interactions entre les charges contenues dans la solution de polymère. On comprend alors aisément que la conductivité de la solution joue un rôle prépondérant sur le procédé. En effet, si la conductivité d'une solution augmente, plus de charges vont être transportées par le jet et celui-ci subit un étirement plus grand produisant ainsi des fibres plus petites. La conductivité d'une solution peut être contrôlée par l'apport d'ions mais aussi par l'utilisation d'un mélange de solvants. Les données de la littérature s'accordent presque toutes à montrer que l'ajout de sel, ou de polyélectrolyte dans la solution permettant d'augmenter la conductivité, a pour conséquence de diminuer le diamètre des fibres [FON 99] [ZEN 03]. La taille des ions ajoutés dans la solution peut elle aussi faire varier la taille des fibres. Zong et *al.* [ZON 02] ont montré que les ions possédant un faible rayon ionique produisent des fibres de diamètre plus petit que les ions ayant un rayon plus grand. Ceci peut être attribué à la meilleure mobilité des petits ions, ce qui augmente ainsi les forces d'élongation du jet engendrant au final des fibres plus petites.

L'augmentation de la conductivité de la solution a aussi pour effet de diminuer la densité de *beads* formés et de produire des fibres plus uniformes [QUY 06].

3.1.2.1.4 Effet du solvant

La viscosité de la solution n'est pas entièrement dirigée par la masse molaire ou la concentration du polymère mais aussi par le choix du solvant. Pour un bon solvant, la viscosité de la solution peut être élevée, alors que pour un mauvais solvant elle est faible. Le choix du solvant influence en outre la morphologie des fibres, la vitesse d'évaporation du solvant étant principalement responsable de la formation de pores au sein des micro- ou nanofibres.

Comme il a été montré dans les précédents paragraphes, de nombreux paramètres influant sur la morphologie des fibres proviennent des propriétés physiques ou rhéologiques de la solution employée. C'est pourquoi il n'est pas toujours aisé de déterminer leurs effets propres tant ils sont liés. A cela s'ajoutent les conditions dites du procédé, qui concernent les facteurs extérieurs à la solution tels que la tension appliquée, la température, l'humidité. Nous allons aborder ces paramètres environnementaux dans la section suivante.

3.1.2.2 Conditions du procédé

3.1.2.2.1 Tension appliquée

La tension qui est appliquée lors de la déposition a une importance cruciale, puisqu'à partir d'une valeur seuil elle va initier la formation du cône de Taylor et le début de la déposition.

Différents auteurs ont étudié l'effet de la tension sur le diamètre des fibres [FON 99] [MEG 02]. Il semblerait que l'augmentation de la tension, donc de la force électrostatique, tende à diminuer le diamètre des fibres. En effet, lorsque la valeur du champ électrostatique augmente, les charges vont subir une accélération plus grande, ce qui va étirer plus le jet d'où la réduction du diamètre des fibres. En outre, l'emploi de tensions plus importantes semble favoriser la formation de jets secondaires de diamètres plus faibles qui produisent des fibres de dimension plus petite, l'augmentation de la tension de déposition produisant un cône de Taylor moins stable. Cependant, le contrôle du diamètre des fibres par la valeur du champ appliqué se heurte à plusieurs limites. La première est pratique et concerne la tension de claquage dans l'air. En augmentant la tension, on augmente le risque de formation et de propagation d'un arc électrique, ce qui peut s'avérer dangereux pour l'expérimentateur. En outre, le temps de vol du jet est un paramètre à prendre en compte : pour les mêmes conditions de déposition, un plus haut champ produit une accélération du jet plus grande. Le temps de parcours entre le cône de Taylor et le collecteur (temps de vol) est d'autant plus réduit et les charges, bien qu'ayant une tendance à étirer plus le jet, ont moins de temps pour le faire. Lorsque les temps de vol restent du même ordre de grandeur bien que les tensions soient différentes, le diamètre des fibres se verra réduit [ZHA 04].

Il est aussi possible de trouver dans la littérature des auteurs affirmant que la tension de déposition n'a pas d'effet sur le diamètre des fibres [LI 04] [BÖL 05].

Bien que cela ne soit pas encore tout à fait établi, il semble que l'augmentation de la valeur de champ engendre une augmentation de la densité de *beads* déposés [FON 99] [DEM 02] [LI 04]. Théoriquement, le jet devrait être plus étiré si une tension plus grande est employée, et la formation de *beads* devrait être évitée. Cependant, une plus grande instabilité du cône de Taylor est obtenue à des tensions plus importantes. Le jet initié n'est alors plus continu, engendrant alors la formation de *beads*.

3.1.2.2.2 Débit de la solution

Le débit de la solution affecte le volume du cône de Taylor. Pour des paramètres de déposition constants, l'augmentation du débit provoque l'augmentation du volume du cône de Taylor. Conséquemment, le jet formé possède un diamètre plus grand, formant ainsi des fibres de dimensions

plus importantes [PHA 06] [ZHA 06]. Parallèlement, en augmentant le débit d'une solution peu visqueuse avec laquelle des *beads* sont obtenus, leurs tailles et leurs formes vont évoluer pour être plus grosses et passer d'une géométrie conique à une configuration plus sphérique.

La morphologie du tapis fibreux est aussi affectée par l'augmentation du débit. En effet, le jet formé nécessite plus de temps pour sécher. Le solvant n'a pas le temps de s'évaporer complètement. Les fibres déposées peuvent fusionner aux points de contact formant ainsi une membrane dont les propriétés mécaniques sont accrues. Ce même phénomène peut également être obtenu en utilisant une solution plus diluée [LAN 06] ou bien en diminuant la distance entre le collecteur et l'aiguille comme il est expliqué dans le paragraphe suivant.

3.1.2.2.3 Distance collecteur/aiguille

La distance entre le collecteur et l'aiguille est liée au temps de vol du jet et à la force électrostatique résultante. Lorsque la distance est petite et le champ constant, le temps de vol est plus faible, le jet est moins étiré, et les fibres déposées sont de diamètre plus grand. Cependant, cette dernière observation est aussi fonction des propriétés de la solution. Demir et *al.* [DEM 02] ont montré que, pour une solution de polyuréthane-urée dans de la DMF, l'augmentation de la distance de déposition ou bien la diminution de la valeur du champ aboutit à une diminution de la densité de *beads* formés. Ces auteurs ne concluent pas sur l'effet de la distance de déposition sur le diamètre des fibres bien que la formation de *beads* soit généralement accompagnée par une diminution du diamètre des fibres. Fong et *al.* en utilisant une solution aqueuse de PEO ont observé la formation de *beads* en diminuant la distance de travail, et d'après les clichés présentés dans leur article, il semble y avoir une diminution significative du diamètre des fibres [FON 99]. Des données contradictoires peuvent néanmoins être trouvées dans la littérature [MEG 02] [BÖL 05] montrant que l'unique effet de la diminution de la distance est de favoriser la formation de *beads* et n'a pas d'impact significatif sur le diamètre des fibres.

Un autre phénomène, qui peut être observé lorsque la distance de déposition est réduite, est la fusion des fibres soit entre elles, soit aux points de contact, du fait que le solvant n'a pas le temps de s'évaporer.

3.1.2.2.4 Diamètre de l'aiguille

Lorsque le diamètre de l'aiguille est petit, le jet initié devient par conséquent petit. Ainsi les fibres obtenues sont de diamètre faible [KAT 04]. Le contrôle du diamètre des fibres par ce paramètre se heurte toutefois aussi à une limitation pratique, puisqu'une aiguille trop petite ne permettra pas à la

solution visqueuse de s'écouler au travers. De même, la densité de *beads* semble être réduite par l'emploi d'aiguille plus petite [RAM 05b].

3.1.2.2.5 Type de collecteur

En fonction du type de collecteur, et s'il est conducteur ou non, la morphologie des membranes peut varier. Pour un collecteur non conducteur, la densité de compacité des fibres est plus faible que pour un collecteur conducteur. En effet, le substrat ne pouvant évacuer les charges, elles s'accumulent et finissent par engendrer des interactions répulsives. Ce phénomène est aussi observé pour des collecteurs conducteurs lorsque la membrane déposée possède une épaisseur importante, elle agit alors comme un isolant.

3.1.2.2.6 Facteurs environnementaux

➤ Température

Le taux d'évaporation du solvant dépend de la température à laquelle la déposition est effectuée. Zeng et *al.* [ZEN 03] ont observé que leur procédé fonctionnait de manière satisfaisante à 25°C alors qu'à 7°C le procédé n'était pas efficace. Demir et *al.* ont électrospinné une solution de polyuréthane dans de la DMF, à température ambiante et à 70°C [DEM 02]. L'augmentation de la température permet de déposer des solutions plus concentrées puisque la viscosité diminue. La température affecte, en outre, le nombre de jets qui sont formés en sortie de l'aiguille, plus elle est élevée plus le nombre de jet est important. De plus, lorsque la température de déposition augmente, il a été observé que la vitesse de déposition est augmentée, engendrant des membranes plus épaisses et plus rapidement. La distribution des fibres est plus uniforme à haute température. Ces phénomènes peuvent s'expliquer par la plus grande mobilité des charges. Cependant, une température proche, ou bien supérieure à la température d'ébullition du solvant, engendre des difficultés de déposition. Si le solvant s'évapore trop vite, l'initiation du jet ne peut avoir lieu puisque le polymère est déjà sous forme solide en sortie de l'aiguille.

➤ Humidité

Casper et *al.* ont fait varier le pourcentage d'humidité lors de la déposition de polystyrène [CAS 04]. Il s'avère qu'à haut pourcentage d'humidité, des pores sphériques sont observés sur les fibres. Lorsque le taux d'humidité augmente, les pores sont plus gros et finissent par se relier entre eux. Il est probable que l'eau se condense sur les fibres formant ainsi ces cavités.

Pour résumer cette partie, il est possible, dans une certaine mesure, de contrôler la morphologie des fibres, leurs diamètres et la présence de *beads*. Les principaux paramètres pour l'expérimentateur sont dans un ordre d'importance :

- La concentration de la solution, liée à sa viscosité.
- Le choix du solvant ou du mélange de solvant, influant sur la viscosité et la conductivité de la solution.
- Le débit de la solution de polymère.
- La distance de déposition qui permet d'ajuster la fusion des fibres au points de contact.
- Le champ appliqué, qui doit être assez fort pour initier la formation du jet sans toutefois favoriser la formation de *beads*.

Pour apporter plus de clarté au lecteur, le tableau 3-2 regroupe les différents paramètres que l'expérimentateur peut faire varier pour changer le diamètre et la morphologie des fibres. L'importance d'impact de ces mêmes paramètres ainsi que leurs effets sur le procédé de façon plus générale y sont présentés.

Tableau 3-2 : Paramètres permettant d'ajuster le diamètre des fibres.

	Degrés de contrôle		
	Diamètre des fibres	Formation de <i>beads</i>	Procédé
Concentration	++++	++++	Si trop concentrée, déposition impossible
Solvant	+++	+++	Solvant à grande conductivité, procédé plus stable
Débit	+++	- +	Permet la fusion des fibres aux points de contact Si débit important, stabilité amoindrie
Distance de déposition	--	++	Impact sur la taille de la zone de déposition (petite distance, petite aire de déposition)
Champ électrique	--	+	Risque de formation d'arc électrique pour des champs trop importants

Comme on l'aura compris, la plupart de ces paramètres sont liés entre eux. Aussi il convient de trouver un compromis afin de déposer des fibres possédant la morphologie et le diamètre désirés. Le tableau 3-1 présente une liste non exhaustive de conditions de déposition de polyesters aliphatiques qui peuvent être trouvées dans la littérature.

L'*electrospinning* permet de fabriquer des membranes dont les fibres structurantes sont réparties de manière aléatoire. Il est cependant possible d'arranger spatialement ces fibres et c'est le thème du paragraphe suivant.

3.1.3 Orientation des fibres

La modification des fibres intervient à plusieurs niveaux. Au niveau macroscopique, les fibres peuvent être orientées de manière à obtenir une membrane où elles sont alignées. Il existe deux principales méthodes pour obtenir ce résultat qui sont explicitées dans les paragraphes suivants. Au niveau moléculaire, il est possible de greffer des groupements d'intérêt sur la surface des fibres. On peut en outre encapsuler des molécules bioactives afin d'obtenir une libération retardée de ces substances. La fonctionnalisation des nanofibres ne sera pas abordée dans ce manuscrit, puisque cela ne concerne pas directement l'étude qui a été réalisée.

3.1.3.1 Alignement mécanique

Un intérêt découlant de l'alignement des fibres obtenues par *electrospinning*, est d'obtenir une membrane aux propriétés anisotropes. Ce n'est que très récemment que des chercheurs ont réussi à aligner les fibres. Theron et *al.* [THE 01] furent parmi les premiers, en utilisant un disque rotatif de 15 cm de diamètre et de 0,5 mm d'épaisseur, à aligner des fibres de PEO. Le disque est relié à l'alimentation haute-tension. Sa circonférence forme un coin de demi-angle $26,6^\circ$ permettant la convergence du potentiel électrique pendant la déposition. Une vitesse de rotation assez élevée (1070 tr.min^{-1} soit une vitesse linéaire de 22 m.s^{-1}) est nécessaire afin d'engendrer un alignement des fibres dont le diamètre varie entre 100 et 400 nm. L'utilisation d'un cylindre ne comportant pas d'angle sur la circonférence permet aussi de déposer des fibres alignées [LEE 05]. Usuellement, le diamètre des fibres récoltées sur un cylindre rotatif est plus petit par comparaison à la déposition sur un collecteur statique. La grande vitesse de rotation du cylindre exerce une force tangentielle sur le jet de polymère étirant les fibres et conduisant à une diminution de leur diamètre [YAN 05].

Il est possible aussi d'aligner les fibres en disposant un cylindre rotatif entre l'aiguille et le collecteur chargé. Les fibres sont attirées vers le collecteur mais rencontrent le cylindre rotatif avant de pouvoir se déposer sur la surface chargée. La géométrie du cylindre peut varier, le tambour de déposition peut être en effet constitué de barreaux alignés qui tournent autour d'un même axe. On obtient alors un collecteur à cage ouverte et les fibres sont alignées entre les différentes barres [SUN 07].

La déposition de fibres sur le cylindre est limitée par leur répulsion entre elles mais aussi par la vitesse de rotation. En effet, en tournant à grande vitesse, le cylindre produit des mouvements d'air qui peuvent altérer, voire empêcher totalement la déposition des fibres. Les fibres sont alors éjectées et se retrouvent sur les parois de l'enceinte de déposition. La technique du collecteur à cage ouverte permet semble-t-il de limiter les mouvements d'air provoqués par la rotation à haute vitesse du collecteur [SUN 07].

Un étirement mécanique des fibres après la déposition permet d'orienter celles-ci [ZON 05]. Cependant, ce procédé tend à diminuer les propriétés mécaniques des membranes puisqu'elles auront déjà subi une déformation importante.

Le tableau 3-3 rassemble les conditions utilisées par plusieurs Groupes de recherche afin de fabriquer des membranes de polyesters aliphatiques dont les fibres sont alignées en utilisant un tambour rotatif. Il permet de déterminer la vitesse de rotation adéquate afin d'obtenir un alignement des fibres. L'alignement des fibres est dépendant du diamètre du cylindre. Ainsi, il convient de se rapporter à la vitesse linéaire du cylindre, celle-ci doit être d'au moins 5 m.s^{-1} afin d'obtenir un arrangement parallèle entre les fibres.

La plupart du temps, des cylindres de diamètre important sont employés, car ils permettent d'atteindre une vitesse linéaire assez élevée ($10\text{-}15 \text{ m.s}^{-1}$) tout en maintenant une vitesse de rotation à une valeur intermédiaire ($1000\text{-}2000 \text{ tr.min}^{-1}$). Aussi, lorsqu'une structure de petit diamètre est nécessaire, comme c'est le cas pour l'ingénierie tissulaire des vaisseaux, il convient d'utiliser des moteurs plus puissants afin d'augmenter la vitesse de rotation et ainsi la vitesse linéaire [BAS 06] [NER 07].

Tableau 3-3 : Paramètres pour la déposition de fibres alignées.

Polymère <i>M_w</i> [g.mol ⁻¹]	Solvant % vol/vol	Conditions de déposition					Cylindre		Propriétés des fibres		Référence
		Concentration [% , m/vol]	Distance [cm]	Tension [kV]	Débit [mL.h ⁻¹]	Aiguille	Géométrie [cm]	Rotation [tr/min ; m/s]	Diamètre	Alignement	
PLLA 300 000 250 000 250 000	DCM/DMF 70/30	1-3 5	10	12	1	18G 22G	-	1000	150-500 nm 800-3000 nm	+++	[YAN 05]
	DCM	7,5-10	20-25	17,5	3-5	22G	-	80 800	2-10 μm	--- ++	[SUN 07]
	HFIP	~ 12	11,5	18	3	0,7 mm	-	-		--	[CHI 07]
PLCL 75/25	Acétone	5	8	12	-	-	h > r	830	~ 1 μm	+	[MO 04]
		5	15	20	1	0,4 mm	r = 10	11 m/s	550 ± 120 nm	++	[XU 04]
PCL 80 000	THF/DMF 50/50	7	20	12	-	18G	r = 1,3	7500 ; 10 m/s	300-750 nm	++	[NER 07]
		14	20	15	-	18G	-	1,3 m/s 4 m/s 8 m/s	250-800 nm 250-800 nm 300-750 nm	--- -- +++	[LI 07]
PLGA 75/25	-	10	10-15	10-15	0,6-1,2	0,8 mm	h = 20, r = 1,5	-	> 5 μm	++	[JEO 07]
PCL 80 000	DCM/DMF 50/50	12	10	21	1	20G	h = 14 , r = 7,5	50 ; 0,4 m/s	950 nm	---	[WUT 06]
PLGA 75/25 0,55-0,75 dL/g	HFIP	5	12	15	-	22G	r = 3,1	580 ; 1,0 m/s 1110 ; 3,3 ms 1450 ; 4,7 m/s	130 nm 150 nm 160 nm	--- ++ +++	[BAS 06]
		11			580 1010 1450			760 nm 660 nm 520 nm	--- ++ +++		

Abréviations :

PCL	poly(ε-caprolactone)	DCM	dichlorométhane
PLCL	acide poly(L-lactique-co-caprolactone)	DMF	diméthylformamide
PLGA	acide poly(L-lactique-co-glycolique)	HFIP	hexafluoroisopropanol
PLLA	acide poly(L-lactique)	THF	tétrahydrofurane

3.1.3.2 Alignement par la géométrie du collecteur

L'utilisation de deux collecteurs rectangulaires et disposés parallèlement et de façon à laisser un espace entre eux, allant de la centaine de micromètres à plusieurs millimètres, permet d'orienter et d'aligner les fibres [LI 04b]. Plusieurs conditions doivent être réunies pour obtenir un alignement :

- 1) la dimension des collecteurs doit être plus petite que celle de l'espace les séparant, sinon les fibres se déposent sur les collecteurs.
- 2) les fibres doivent posséder un diamètre supérieur à 150 nm afin d'empêcher leur rupture pendant la déposition.

Cet inconvénient (rupture des fibres) peut être surmonté en introduisant un substrat hautement isolant entre les collecteurs prévenant ainsi la rupture des fibres de diamètre inférieur à 150 nm. Li et *al.* ont modifié leur procédé afin de pouvoir déposer couche par couche des fibres dont l'orientation est ajustable [LI 04b]. La disposition des collecteurs, en croix, ou en étoile comme le montre la figure 3.5, permet de varier l'angle de déposition des fibres.

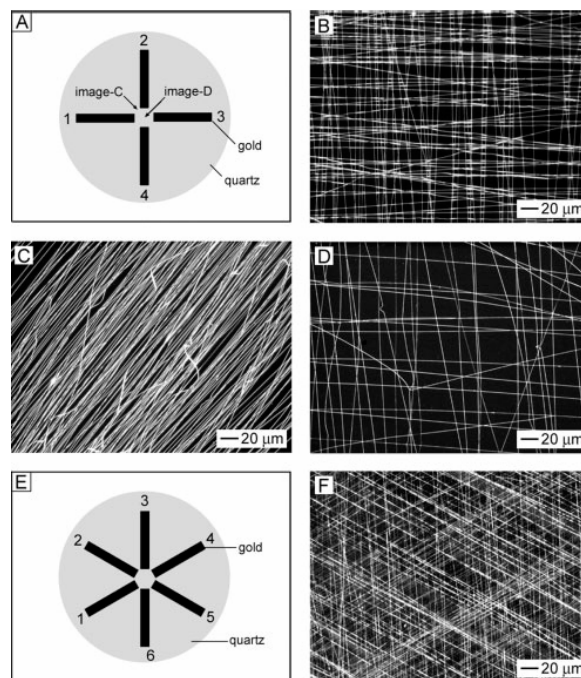


Figure 3.5 : Modification de l'angle d'alignement des fibres. Tiré de [LI 04b].

La raison pour laquelle les fibres s'alignent spontanément lorsqu'on introduit un espace, ou un matériau, non conducteur entre le collecteur n'a pas été encore clairement explicitée, mais une explication peut être avancée. Lorsque les fibres arrivent aux environs proches du

collecteur, le champ, dans le plan du collecteur, n'a pas de direction préférentielle, et les fibres se déposent aléatoirement. En revanche, lorsqu'un espace non conducteur est présent, la structure du champ électrostatique externe est modifiée. Aussi, la fibre est plus fortement attirée et de manière simultanée par les électrodes que par l'espace non conducteur, ayant pour résultat l'alignement des fibres [LI 04b].

L'inconvénient de ce procédé provient de la manipulation des membranes, rendue difficile par leur forte adhérence à la surface des collecteurs. Teo et *al.* [TEO 05] ont résolu ce problème en contrôlant le champ externe qui est appliqué, ainsi que la géométrie des électrodes. En utilisant, un champ de 12 kV vertical et un autre champ horizontal de -8 kV, les fibres se déposent en s'alignant entre les deux électrodes. Cette technique de déposition permet de fabriquer des paquets de fibres [TEO 05] [SCH 07] qui peuvent être manipulés et post-procédés. Ainsi, ces paquets de fibres alignées ont pu être tressés entre eux formant des structures possédant des propriétés mécaniques accrues. Cependant, peu ou pas d'information n'est disponible concernant l'épaisseur des membranes fabriquées. Il semblerait que cette technique d'alignement des fibres ne puisse produire des membranes que de faibles épaisseurs (de l'ordre de la dizaine de micromètres).

Comme nous venons de le voir dans ces paragraphes précédents, l'*electrospinning* est une technique très intéressante dès lors que la fabrication de nano- micro-fibres est nécessaire. Cependant, elle se heurte à certaines limitations qui sont explicitées dans le paragraphe suivant.

3.1.4 Limites de l'*electrospinning*

Il existe deux principales limitations de ce procédé pour l'ingénierie tissulaire. La première concerne les dimensions spatiales des scaffolds fabriqués, la seconde provient du manque de contrôle de la taille et de la géométrie des « pores » qui sont formés par l'enchevêtrement des fibres.

Dans les paragraphes précédents, il a été souvent question de membrane. Le terme de membrane est employé à bon escient puisqu'il est très difficile d'obtenir des structures réellement tridimensionnelles, comme c'est le cas avec les procédés présentés dans la seconde partie de ce mémoire. L'*electrospinning* permet uniquement de fabriquer des structures bidimensionnelles. En effet, après un certain temps de déposition, la couche fibreuse se trouvant sur le collecteur empêche l'évacuation des charges, les fibres sont donc chargées ce qui provoque des interactions répulsives entre elles. Cela a pour effet un élargissement de la

zone de déposition. Il est quasi impossible de fabriquer une membrane de plusieurs millimètres d'épaisseur. Ainsi, son utilisation, en l'état, en ingénierie tissulaire est limitée. Il est par exemple peu probable qu'à terme, on puisse traiter des comblements osseux de grande dimension (> à plusieurs millimètres) par des membranes produites par ce procédé. Ceci nous amène à une des conséquences de cette « bidimensionnalité », c'est-à-dire la faible résistance à la rupture de ces membranes. En prenant l'exemple du ligament croisé antérieur humain, la force de rupture varie entre 2000 et 3000 N. Les membranes quant à elles auront presque invariablement une résistance brute beaucoup plus petite (de 10 à 100 N). Matthews et *al.* ont testé mécaniquement des membranes de collagène fabriquées par *electrospinning* [MAT 02]. L'épaisseur de ces membranes étant relativement faible (~ 200 µm), la force à rupture se situe à 1 N, ce qui est extrêmement faible comparé aux performances des tissus collagéniques humains.

La taille des pores est un paramètre important pour l'ingénierie tissulaire puisqu'elle va promouvoir ou non la migration cellulaire. Aussi, si les pores sont trop petits, les cellules ne pourront pas coloniser l'épaisseur de la membrane. On estime communément que le diamètre minimal requis pour permettre une migration tissulaire est de l'ordre de la dizaine de micromètres [ZHA 05b]. Bien que le contrôle du diamètre des fibres soit une propriété qui peut être ajustée assez facilement, il est difficile de contrôler la taille des pores formés par l'enchevêtrement des fibres.

En dernier lieu, l'utilisation de solvant pour dissoudre les polymères est un désavantage de cette technique. En effet, un polymère en solution dans un solvant organique ne peut être électrospinné directement sur le corps humain si ce solvant est toxique. Cependant, ce désavantage est commun avec un nombre important de procédés de fabrication de scaffold.

Néanmoins, l'*electrospinning* est une technique hautement attractive pour les applications en ingénierie tissulaire de par sa relative facilité de mise en œuvre, de par le grand nombre de polymères, et naturels, et synthétiques pouvant être électrospinnés. L'*electrospinning* offre la possibilité d'ajuster la morphologie et les diamètres des fibres fabriquées.

Dans un premier temps, une étude modèle a été réalisée afin de mieux comprendre le fonctionnement du procédé. La poly-ε-caprolactone, un polymère classique dans l'ingénierie tissulaire, a été utilisée afin de déposer des membranes et de vérifier l'impact de différents paramètres. Dans un deuxième temps nous avons testé la biocompatibilité de ces membranes. En dernier lieu, une méthode permettant de contrôler la charge des fibres déposées a été développée.

3.2 Une étude de cas

Le but de ce paragraphe est d'illustrer clairement l'impact de certains paramètres (types de solvant, concentration, distance aiguille/collecteur, tension appliquée) sur la déposition des fibres. La PCL a été choisie comme polymère type car elle est classiquement utilisée en ingénierie tissulaire et en raison de son coût peu élevé.

Deux types de membranes ont été fabriqués, l'un où les fibres sont déposées de façon aléatoire et l'autre où elles sont alignées.

3.2.1 Matériels et méthodes

3.2.1.1 Déposition aléatoire

3.2.1.1.1 Matériel

La poly- ϵ -caprolactone (PCL) ($M_w = 80\,000 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$) provient de chez Sigma-Aldrich ainsi que tous les solvants utilisés, à savoir : tétrahydrofurane (THF), diméthylformamide (DMF), chloroforme (CF).

3.2.1.1.2 Procédé

La machine d'*electrospinning* est composée d'une alimentation haute-tension Heizinger 0-20 kV (Allemagne), d'un pousse-seringue et de seringues en verre de 10 mL (VWR, France). Le tuyau, connectant la seringue à l'aiguille de déposition, est un tuyau classique de transport de gaz. Nous utilisons une aiguille 19G dont l'extrémité pointue a été limée puis poncée afin d'obtenir un cylindre creux. Un bras en matière plastique, dont une des extrémités est percée afin de pouvoir y insérer l'aiguille, a été utilisé afin de pouvoir régler la distance de déposition. Le collecteur est constitué d'une plaque non-conductrice en plastique recouverte d'une feuille ($120 \times 120 \text{ mm}^2$) d'aluminium. La haute-tension est appliquée en connectant le câble haute-tension à l'aiguille et au collecteur à l'aide de pinces crocodiles. La tension appliquée est fixée à 15 ou 20 kV pour les solutions dans THF/DMF et à 10 ou 15 kV pour les solutions dans CF/DMF. Comme le montre la figure 3.6, la déposition s'effectue sous sorbonne afin de prévenir les éventuels arcs électriques et afin d'aspirer les solvants s'évaporant pendant la déposition. Toutefois, pour ne pas porter atteinte à la stabilité du procédé, la ventilation de la sorbonne n'est pas enclenchée, l'aspiration des solvants se faisant par la ventilation résiduelle, ce qui est suffisant étant donné le faible débit de la solution de polymère.

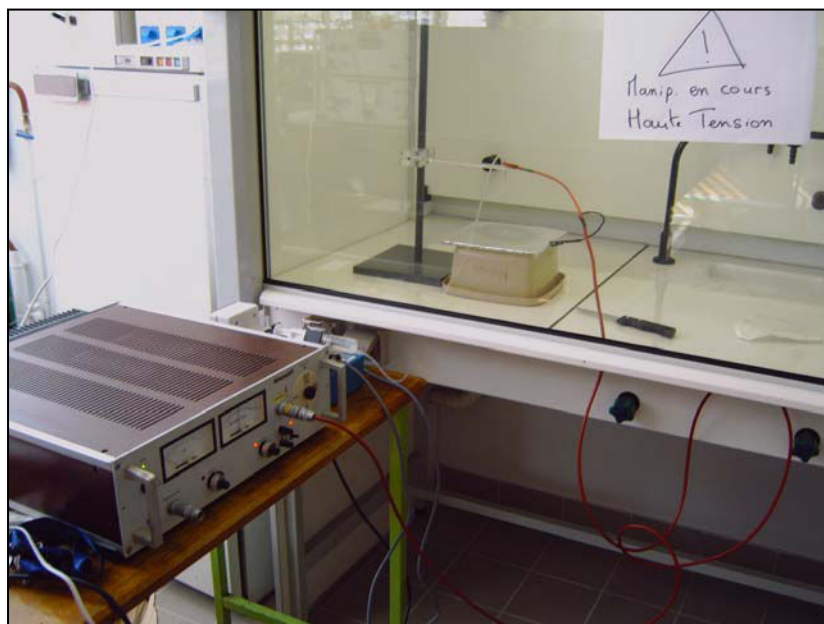


Figure 3.6 : Photographie de la machine d'*electrospinning*.

3.2.1.1.3 Solutions de polymère

Deux types de solvants ont été testés afin de déterminer lequel serait le plus facile d'utilisation pour la déposition. Nous utilisons un mélange THF/DMF (70/30), et un mélange CF/DMF à deux teneurs (70/30) et (90/10) (vol/vol).

La concentration des solutions utilisées pour le mélange THF/DMF (70/30) sont 5, 7 et 10% (m/vol). Pour le mélange CF/DMF (70/30) deux solutions à 10 et 12% (m/vol) ont été employées. Un essai, pour la solution à 12% (m/vol) avec un mélange CF/DMF (90/10) a été réalisé pour évaluer l'impact de la diminution de la teneur en DMF sur le procédé.

De même, nous avons fait varier la distance de déposition (10, 15, 20, 25 et 30 cm) et la tension en vue de vérifier les principes qui ont été énoncés dans les paragraphes précédents. Le débit des solutions de polymère a été fixé à 2 mL.h⁻¹.

Ces différentes expériences permettront de sélectionner les conditions de déposition adéquates pour la suite des travaux.

3.2.1.2 Déposition alignée

3.2.1.2.1 Matériel

La déposition pour obtenir des fibres alignées s'effectue sur un tambour rotatif. Un moteur transmet le mouvement de rotation à un axe relié au tambour. Celui-ci est constitué de deux parties distinctes, l'une en plastique et l'autre en aluminium (figure 3.7). La partie centrale isolante est connectée mécaniquement à l'axe, cela permet de ne pas appliquer directement la haute-tension sur le moteur. La zone de déposition est constituée par un anneau métallique (190 mm de diamètre, 50 mm de largeur, 5 mm d'épaisseur) emboîté et fixé à l'aide de vis sur le tambour en plastique. Les côtés extérieurs de l'anneau sont régulièrement perforés afin de fixer des petites barres ($7 \times 50 \times 1 \text{ mm}^3$) permettant d'attacher des structures ou bien des feuilles d'aluminium. Afin de délivrer la haute-tension au collecteur, un disque d'aluminium est vissé au centre du tambour en plastique et trois câbles électriques, soudés au disque, sont connectés à l'anneau extérieur.

Ce dispositif permet de réguler la vitesse de rotation de 0 à 1500 tr.min^{-1} (soit une plage de vitesse linéaire de 0 à 15 m.s^{-1}). La vitesse de rotation a été déterminée et calibrée en utilisant un tachymètre (Bioblock scientific, France).

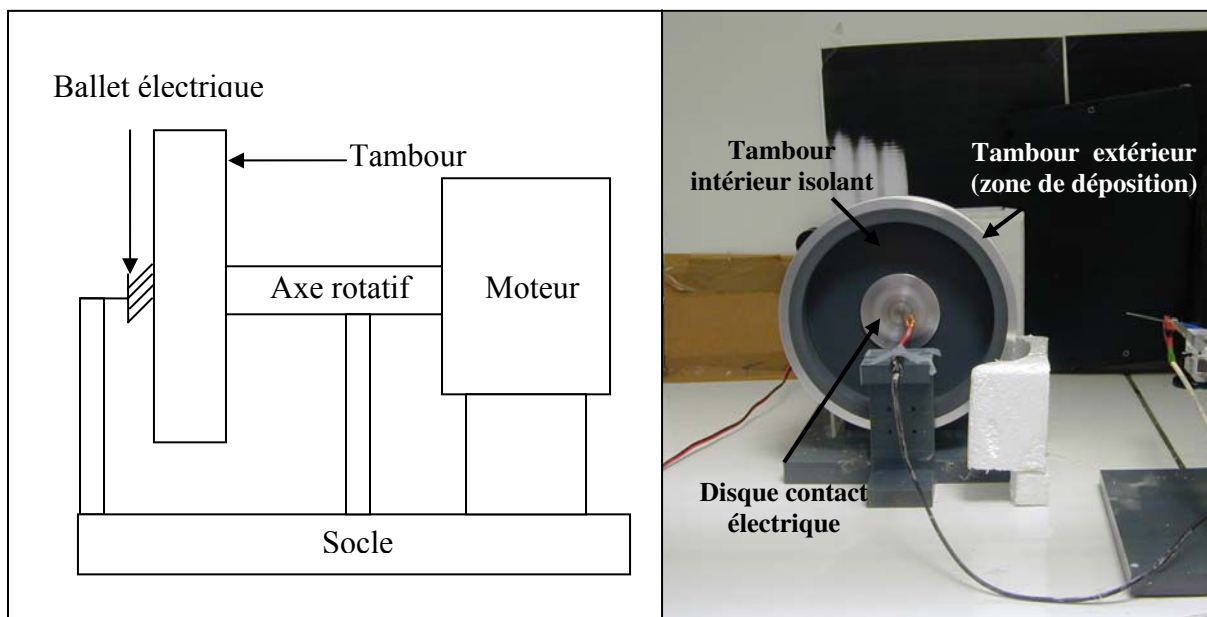


Figure 3.7 : Description du tambour rotatif.

3.2.1.2.2 Solution de polymère

On utilise une solution de PCL à 12% (m/vol) dans un mélange de CF/DMF (90/10) (vol/vol).

3.2.1.3 Observation morphologique

L'observation morphologique a été réalisée par microscopie électronique. Une couche d'or-palladium est déposée sur les membranes préalablement à leur observation. Un microscope Cambridge J210S, à une tension d'accélération de 20 kV, a été utilisé pour les observations.

Le diamètre des fibres et des *beads* a été mesuré à partir des clichés obtenus pendant les séances d'observation et ce pour chaque condition de déposition. Afin d'obtenir des données statistiques, 20 mesures au minimum sont effectuées par membrane.

3.2.1.4 Evaluation biologique

3.2.1.4.1 Prélèvement et culture des cellules

Des cellules souches de lapins de Nouvelle Zélande (Cégav, France) ont été utilisées pour caractériser la biocompatibilité des membranes de PCL (conditions de déposition : 12% dans un mélange de CF/DMF (90/10), 8 kV, 15 cm, 2 mL.h⁻¹). 3 lapines différentes ont été employées. Le protocole de prélèvement et de culture des cellules souches mésenchymateuses du lapin est décrit dans la partie 2, paragraphe 2.2.4.4.1.

3.2.1.4.2 Stérilisation des membranes

Des membranes (1,2 x 1,2 cm²) sont immergées pendant 30 min dans de l'alcool à 75%. Une irradiation UV est ensuite réalisée pendant 20 min de chaque côté. Les membranes sont alors rincées 3 fois dans du milieu de culture afin d'éliminer la quantité résiduelle d'alcool mais aussi, afin de « mouiller » les fibres. Les membranes sont placées dans les puits de culture d'une plaque de 48 puits. La dimension des membranes est plus grande que celle du puits, cela permet de bloquer la structure au fond de celui-ci.

3.2.1.4.3 Ensemencement des membranes

Des CSM à passage 3 sont décrochées du support de culture par l'action d'une solution de trypsine à 2,5% dans de l'HBSS pendant environ 5 min. L'action de la trypsine est stoppée par l'ajout d'un même volume de milieu. La solution cellulaire ainsi formée, est centrifugée à 1200 tr.min⁻¹. Après centrifugation, le surnageant est éliminé et les cellules sont suspendues dans 2 mL de milieu. La concentration de la solution cellulaire est déterminée par comptage dans une cellule de Thoma. 2,5 x 10⁵ CSM dans 500 µL sont ensemencées par sédimentation sur chaque membrane. Pour les besoins du test, des puits témoins sont ensemencés avec la même densité cellulaire.

3.2.1.4.4 Test de viabilité Alamar Blue

L'Alamar Blue est un test de viabilité cellulaire décrit dans la partie 1, paragraphe 1.2.4.2. Ici, 9 échantillons ($n = 3 \times 3$, pour chaque série d'expérience, des cellules provenant d'une lapine différente, ont été employés) ont été utilisés pour mesurer la viabilité cellulaire à J1, J7, J14, J21 et J28. 500 μ L d'une solution d'Alamar Blue à 10% dans du DMEM sans rouge de phénol sont versés dans chaque puits. Les plaques de culture sont placées à 37°C pendant 120 min. Le calcul du pourcentage de réduction suit la formule (1.3) (paragraphe 1.2.3.2).

Un test de student sur les valeurs de la réduction d'Alamar Blue a été réalisé afin de déterminer les différences significatives entre les moyennes. $p < 0,05$ est considéré comme le seuil de significativité.

3.2.1.4.5 Observation des membranesensemencées

L'observation des membranes a été effectuée par microscopie électronique. Les membranes sont fixées dans du glutaraldéhyde et subissent le même traitement que précédemment décrit dans la partie 2, paragraphe 2.2.4.4.1.

3.2.2 Résultats

3.2.2.1 Déposition aléatoire

3.2.2.1.1 Impact de la concentration

La figure 3.8 présente la morphologie des membranes obtenues pour les solutions de PCL et pour le mélange THF/DMF (70/30). Les conditions de déposition étant similaires, on peut alors apprécier l'influence de la concentration sur le procédé comme le montrent le tableau 3-4 et la figure 3.8.

Tableau 3-4 : Diamètre des fibres et des *beads* en fonction des paramètres de déposition.

	Concentration [% (m/vol)]	Diamètre des fibres [nm]	Diamètre des <i>beads</i> [nm]
THF/DMF (70/30)	5	135 \pm 30	1760 \pm 420
	7	170 \pm 40	1600 \pm 2000
	10	330 \pm 80	peu de <i>beads</i>
CF/DMF (70/30)	10	400 \pm 80	6600 \pm 1300
	12	820 \pm 330	pas de <i>beads</i>
CF/DMF (90/10)	12	2800 \pm 300	pas de <i>beads</i>

Comme attendu, la solution la moins concentrée (5%) présente une forte densité de *beads* (figure 3.8 a)) alors que la solution la plus concentrée (10%) n'en possède pas ou peu (figure 3.8 d)). Le diamètre des *beads*, pour le mélange de solvants THF/DMF, ne varie pas de façon significative avec la concentration alors que celui des fibres augmente. Cet effet est observé pour les autres mélanges de solvants. La concentration de la solution permet aussi d'ajuster la densité de *beads* formés.

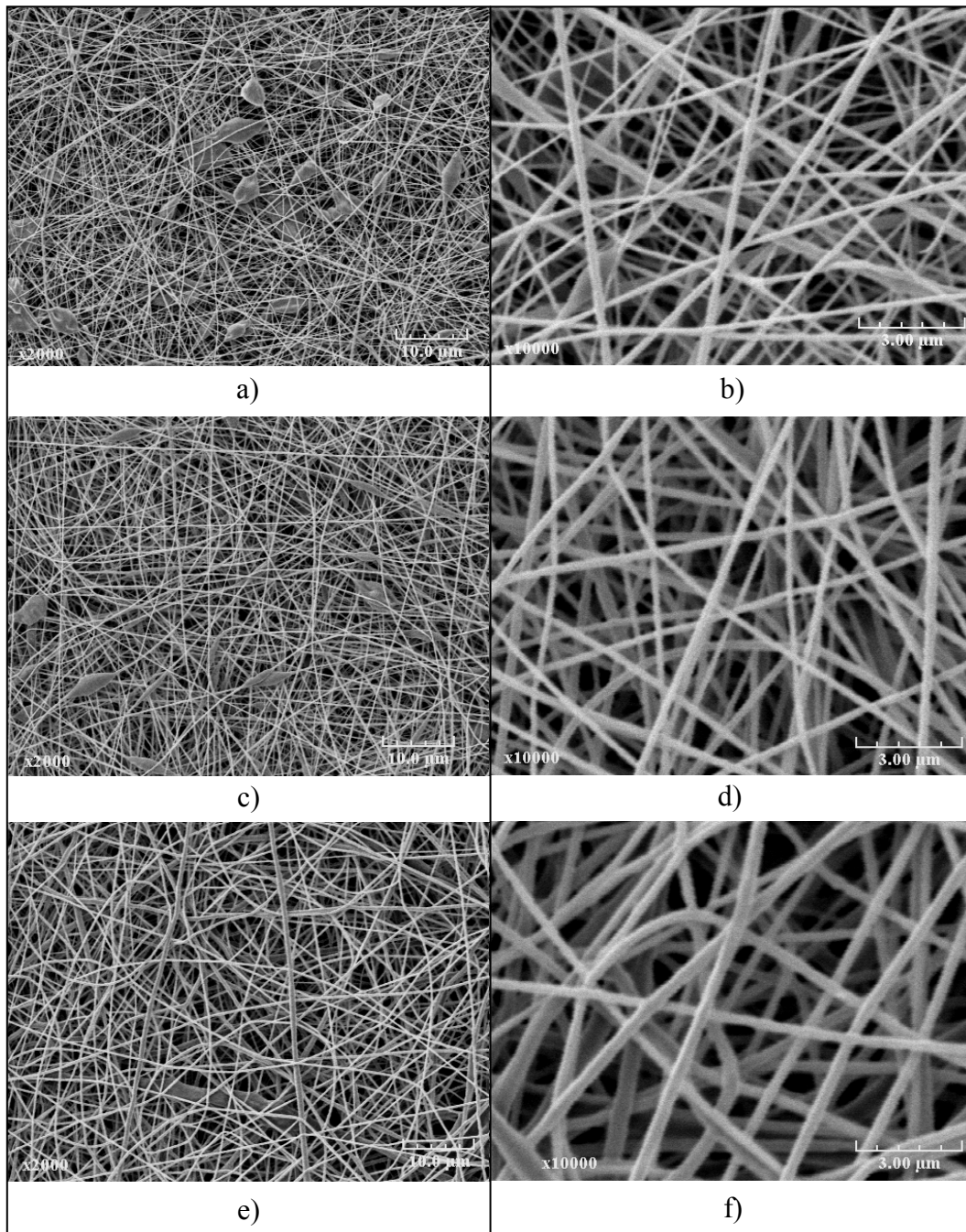


Figure 3.8 : Morphologie des fibres de PCL déposées à différentes concentrations (m/vol).

a), b) 5%, c), d), 7%, e), f), 10%. PCL en solution dans THF/DMF (90/10),

20 kV, 20 cm, 2 mL.h⁻¹.

3.2.2.1.2 Effet de la distance de déposition

La distance de déposition a varié de 15 à 30 cm pour les solutions de PCL à 10 et 12% dans un mélange CF/DMF (70/30), pour une tension constante de déposition de 15 kV et un débit de 2 mL.h⁻¹. La concentration de 10% permet d'étudier l'évolution de la morphologie de la membrane en termes de taille et de dimension des *beads* alors que la solution de 12% permet elle d'étudier la variation du diamètre des fibres.

La figure 3.9 présente les morphologies des membranes obtenues avec la solution à 10%. Pour l'ensemble des distances de déposition, les membranes formées comportent une forte densité de *beads*. Il semble que, pour cette solution, la distance de déposition n'influe que peu sur la densité de formation de *beads*. Une densité de *beads* par mm² a été calculée. Elle reste, pour toutes les distances de déposition, autour de 1800 *beads*/mm². La géométrie des *beads* varie quelque peu selon la distance de déposition comme il est possible de l'observer sur la figure 3.9. Les *beads* possèdent une forme elliptique pour les plus petites distances alors que ce sont quasiment des sphères pour les distances les plus grandes (25 et 30 cm).

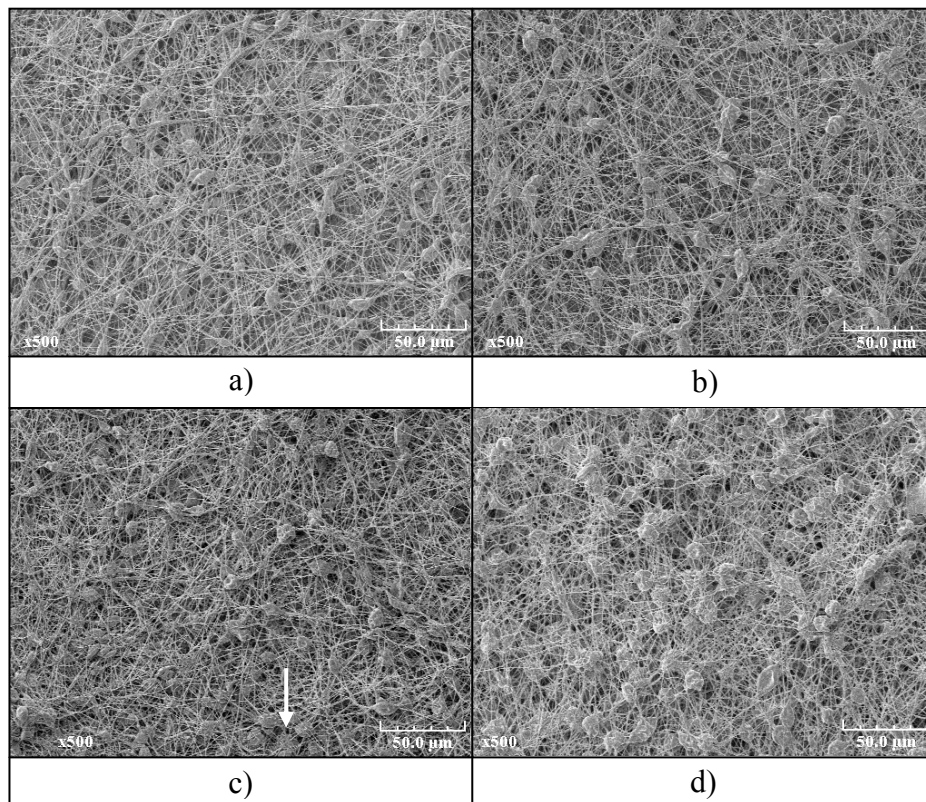


Figure 3.9 : Influence de la distance de déposition sur la formation de *beads*. PCL en solution à 10% (m/vol) dans CF/DMF (70/30). Conditions de déposition : 2 mL.h⁻¹, 15 kV. a) 15 cm, b) 20 cm, c) 25 cm, d) 30 cm. La flèche blanche montre la présence de *beads* sphériques.

La tension étant de 15 kV pour toutes les distances, il est probable que la tension linéaire pour les grandes distances soit trop faible pour initier un jet constant et régulier. Ainsi, le jet se brise régulièrement aboutissant à la formation de gouttes de polymère similairement à l'*electrospraying*.

La dimension des *beads*, quant à elle, ne reste pas constante. Une nette augmentation du diamètre moyen a été observée comme le montre la figure 3.10. Pour 15 cm de distance de déposition, le diamètre moyen est de $3,7 \pm 1,4 \mu\text{m}$ alors que pour la plus grande distance (30 cm), il est de l'ordre de $9 \pm 1 \mu\text{m}$. Il est important de remarquer la grande dispersion des diamètres des *beads*.

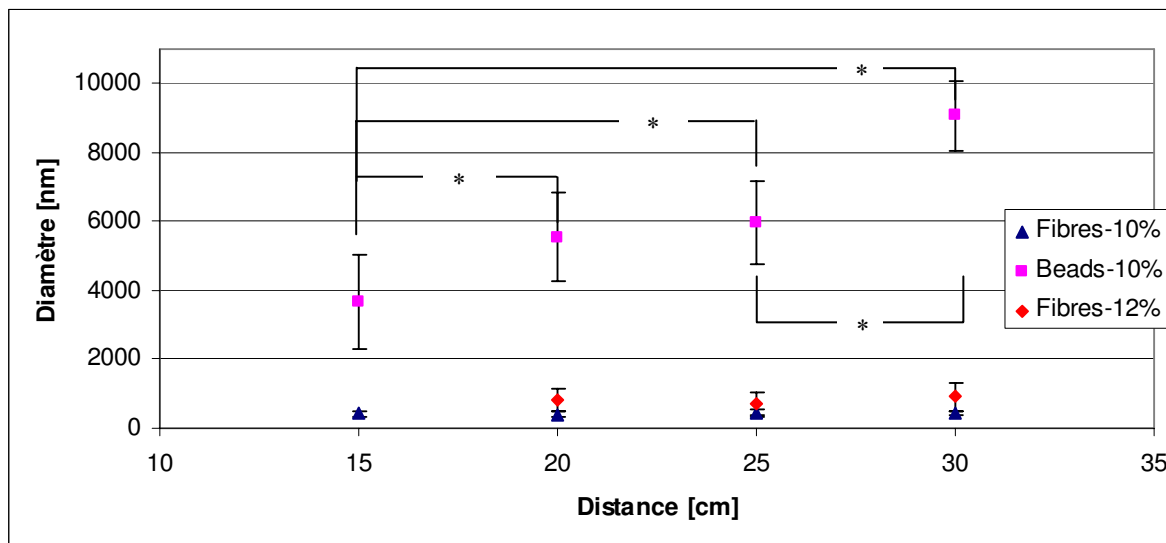


Figure 3.10 : Influence de la distance de déposition sur la taille des fibres et des *beads*.

PCL en solution à 10% (m/vol) dans CF/DMF (70/30).

Conditions de déposition : 2 mL.h^{-1} , 15 kV.

Les « * » représentent les différences significatives entre les mesures.

L'influence de la distance de déposition reste faible quant aux diamètres des fibres. Comme le montre la figure 3.10, le diamètre des fibres pour les différentes distances et concentrations reste constant. Aussi, aucune différence significative n'a été trouvée entre les distances de déposition de 20, 25 ou 30 cm pour les solutions de PCL à 10 et 12% dans un mélange de CF/DMF (70/30). Le diamètre moyen des fibres reste respectivement de l'ordre de 400 et 800 nm.

Ainsi, bien qu'il ne semble pas possible de contrôler le diamètre des fibres par la variation de la distance de déposition, la distance influe sur la dimension des *beads*. La formation de *beads*

n'est pas un phénomène souhaité pour notre application, cependant, son contrôle peut trouver son utilité pour la libération de molécules actives, les *beads* pouvant servir de « réservoirs ».

3.2.2.1.3 Effet de la tension appliquée

L'effet de la tension appliquée a été évalué pour la solution de PCL à 7% dans le mélange (THF/DMF) (70/30). La figure 3.11 présente la morphologie des membranes obtenues pour une déposition à 15 et à 20 kV.

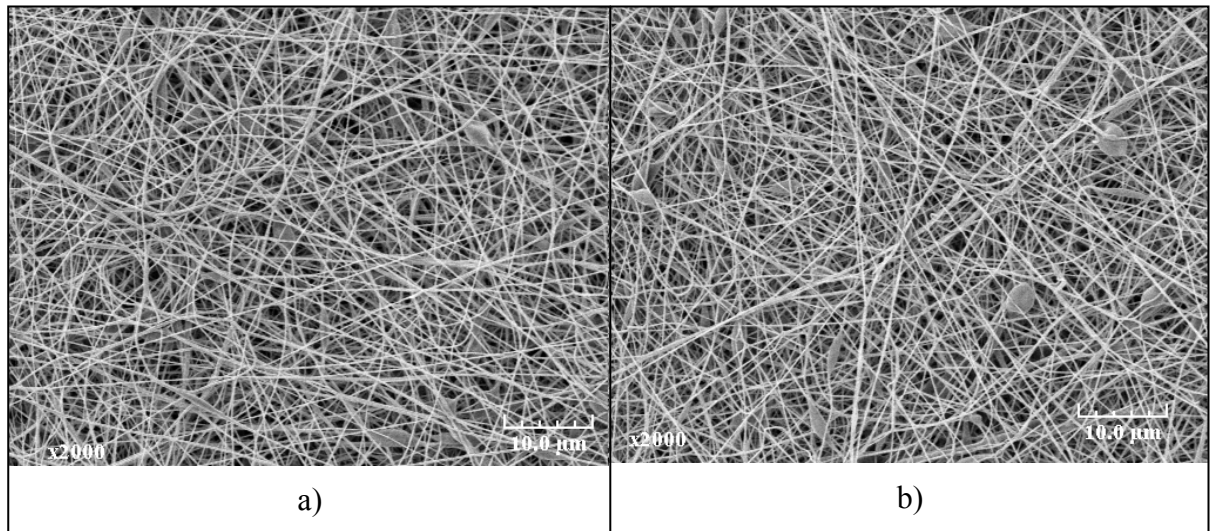


Figure 3.11 : Effet de la tension sur le procédé. PCL en solution à 7% (m/vol) dans THF/DMF (70/30). Conditions de déposition : 2 mL.h^{-1} , 20 cm. a) 15 kV, b) 20 kV.

Peu de différences sont observables entre ces deux conditions de déposition. La densité de *beads* reste la même et bien que le diamètre des *beads* soit légèrement plus grand pour la déposition à 20 kV, ce n'est pas significativement différent. De même, le diamètre des fibres reste inchangé.

3.2.2.1.4 Effet du solvant

Comme nous l'avons déjà mentionné, le solvant est un paramètre important pour l'*electrospinning*. En effet, les propriétés physiques de la solution dépendent du solvant, ou du mélange de solvants utilisé. L'utilisation d'un mélange THF/DMF permet d'électrospinner des fibres plus petites en comparaison à un mélange CF/DMF. Pour une concentration constante de 10%, le mélange THF/DMF donne des fibres de diamètre inférieur (300 nm) à celles obtenues par le mélange CF/DMF (400 nm) (cf. tableau 3-4).

De même, lorsque la teneur en DMF est diminuée dans le mélange CF/DMF et qu'elle passe de 70/30 à 90/10 (vol/vol), le diamètre des fibres augmente drastiquement de 800 à 2800 nm.

La DMF qui est un non-solvant de la PCL diminue la viscosité de la solution lorsqu'elle est ajoutée en grande proportion. Ainsi, les solutions plus pauvres en DMF possèdent une viscosité plus importante et produisent des fibres de diamètre plus gros. Une autre action de la DMF est de stabiliser le procédé. En effet, l'ajout de ce non-solvant permet d'obtenir des jets très stables dans le temps et de diminuer, voire d'empêcher la formation de jets secondaires en raison de sa conductivité. Ainsi, avec un jet stable, des dépôts de longue durée peuvent être envisagés.

3.2.2.1.5 Biocompatibilité

250 000 cellules souches mésenchymateuses ont étéensemencées sur les membranes. La viabilité des cellules a été mesurée par le test Alamar Blue. La figure 3.12 présente les résultats obtenus sur 28 jours. La valeur du pourcentage de réduction du contrôle reste toujours supérieure à celle de la membrane de microfibres de PCL. Cependant, le pourcentage de réduction reste relativement constant sur 28 jours. Les cellules à J1 sont déjà à confluence. La différence à J1 entre la valeur du contrôle et celle de la membrane de microfibre provient de l'hydrophobie de la PCL. Cependant, on peut remarquer que les cellules, sur la membrane de PCL, augmentent de façon significative leur métabolisme cellulaire entre J1 et J7. Sur les trois semaines qui suivent, le pourcentage de réduction, c'est-à-dire le métabolisme cellulaire des CSM, reste quasi constant, bien que la mesure à J21 soit significativement différente. A partir de J7, les CSM sont à confluence et ont colonisé l'ensemble de la surface de la membrane micro-fibreuse. Ainsi, n'ayant plus de place pour croître, le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue n'évolue plus.

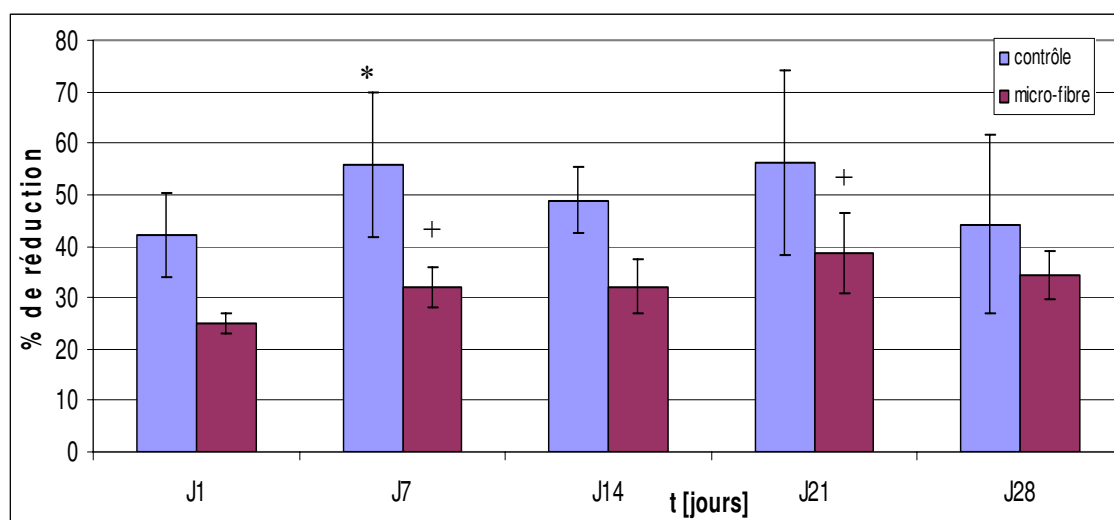


Figure 3.12 : Pourcentage de réduction de l'Alamar Blue des CSM du lapin sur 28 jours. * et + représentent une différence significative en comparant à la mesure précédente.

La figure 3.13 montre que les cellules ont adhéré à la membrane et ont survécu pendant une période de culture *in vitro* de 28 jours.

L'observation en microscopie électronique apporte plusieurs informations. Comme le présente la figure 3.13, à J1 les CSM ont adhéré sur la membrane bien que celle-ci ne soit pas entièrement colonisée (figure 3.13 a) et b)). A J7, l'ensemble de la membrane est recouvert d'un tapis cellulaire dense. Ce tapis cellulaire se densifie encore à J14, J21 et J28.

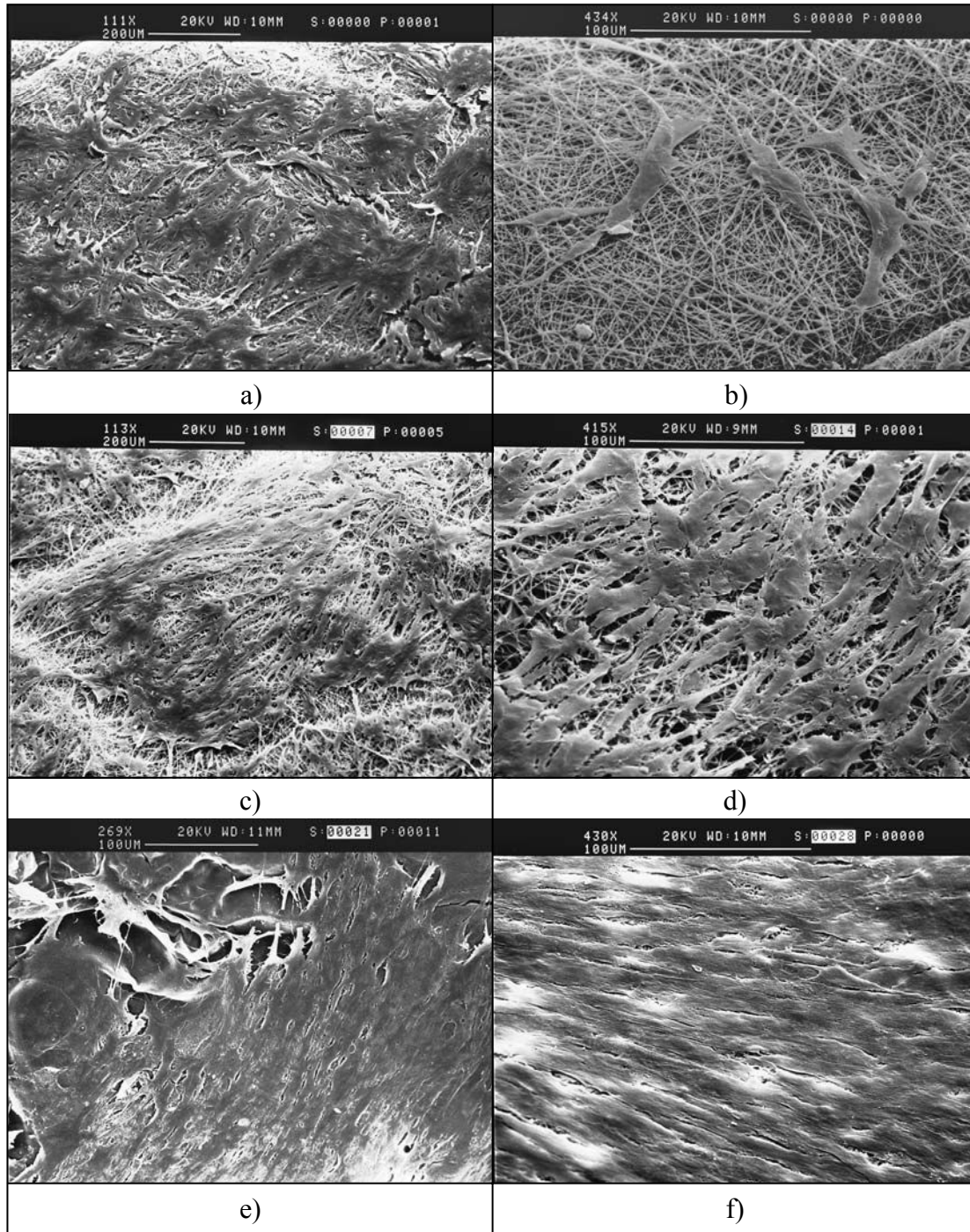


Figure 3.13 : Morphologie des cellules cultivées sur les membranes micro-fibreuses de PCL.

a) et b) 24 h, c) 7 jours, d) 14 jours, e) 21 jours, f) 28 jours.

En effet, il n'est plus possible d'observer les microfibrilles de la membrane ; elles sont occultées par le tapis cellulaire qui s'est développé (figure 3.13 e) et f)). Pour toutes les observations, les cellules présentent une morphologie de cellules saines. Elles sont bien étalées sur les microfibrilles, et la présence de cellules nécrotiques n'a pas été observée. Les membranes des cellules ne présentent pas de rugosité excessive. Ainsi, aucun indice de mort cellulaire due à une éventuelle toxicité de la membrane n'a été observé.

En conclusion, cette étude de biocompatibilité a montré que les membranes permettent une adhésion et une prolifération cellulaire. De plus, il semble que l'interaction CSM-microfibrilles soit tout à fait correcte puisque la morphologie des cellules ne présente pas de symptômes caractéristiques de souffrance cellulaire.

3.2.2.2 Déposition alignée

L'obtention de fibres alignées a été réalisée avec une solution de PCL à 12% dans un mélange CF/DMF (90/10). Cette solution permet d'obtenir un jet stable dans le temps et par conséquent un procédé continu. Plusieurs essais, à différentes vitesses de rotation, distances aiguille-tambour, positions et inclinaisons de l'aiguille, ont été effectués afin de déterminer les conditions adéquates de déposition. Sans toutefois entrer dans les détails de la mise au point de la déposition, il est nécessaire d'en dire quelques mots. Le principal problème lié à la rotation du tambour provient de la circulation d'air qui est ainsi engendrée. La géométrie du cône de Taylor est affectée par le mouvement de l'air dans les 20 cm autour du tambour. Ainsi, un panneau en polystyrène a été placé entre l'aiguille et le tambour. Cela a pour but de stopper, ou du moins de diminuer la force du courant d'air. Grâce à ce panneau, l'évaporation du solvant en sortie de l'aiguille est diminuée permettant une déposition stable.

La position et l'inclinaison de l'aiguille sont aussi des paramètres importants pour permettre des dépositions sur de longues durées sans que le jet de polymère ne soit perturbé ou bien ne se rompe. Lorsque l'aiguille est située au-dessus du tambour, la circulation d'air est trop importante et la déposition est quasi impossible. C'est pourquoi l'aiguille est positionnée latéralement au tambour. Une inclinaison de 45-60° par rapport à un axe horizontal est nécessaire pour augmenter le nombre de fibres déposées sur la partie métallique du tambour. En effet, de par sa rotation rapide, les fibres ont tendance à être éjectées sur les parois de la sorbonne avant qu'elles ne puissent se déposer sur le tambour. La position plus tangentielle de l'aiguille par rapport au tambour (45-60° par rapport au plan de travail) semble limiter ce phénomène.

La distance de déposition a elle aussi son importance. Plusieurs distances ont été testées, il s'avère que des distances supérieures à 20 cm ne sont pas souhaitables en raison de la forte proportion de fibres se retrouvant sur les parois de la hotte aspirante. La distance de déposition a été fixée à 14 cm.

Concernant la vitesse de rotation, celle-ci a été réglée à 1500 tr.min⁻¹ c'est-à-dire que la vitesse linéaire du tambour est de 15 m.s⁻¹. Cette vitesse est plus importante que celles relevées dans la littérature (cf. tableau 3-3). Cependant, lorsque des vitesses de rotation plus petites (< 1200 tr.min⁻¹) ont été testées, l'alignement des fibres n'était pas optimal.

La valeur de la tension de déposition a été fixée comme étant la valeur pour laquelle un cône de Taylor se forme, c'est-à-dire 6,5 kV. Par la suite, il convient d'augmenter quelque peu cette valeur pour maintenir la stabilité du cône de Taylor. Celui-ci a tendance à grossir, aussi est-il nécessaire d'augmenter la tension pour qu'il garde un volume à peu près constant. La tension ne doit pas être augmentée trop brutalement pour éviter la formation de jets secondaires. Au bout de quelques minutes, la tension de déposition est aux alentours de 9 kV, le procédé reste relativement stable par la suite.

La durée de déposition influe sur l'épaisseur de la membrane formée. Des temps de déposition courts (< 60 min) ont engendré des membranes très fines dont la manipulation est difficile car elles sont très électrostatiques. Une déposition de 10 h a permis la fabrication de membranes ayant une épaisseur de l'ordre du millimètre. Cependant, au bout d'un certain temps de déposition, les fibres isolent électriquement le tambour réduisant l'efficacité de la déposition.

En conclusion, les conditions de déposition ont été les suivantes :

- Vitesse de rotation du tambour : 1500 tr.min⁻¹
- Distance : 14 cm
- Position latérale de l'aiguille : inclinaison de 45-60°
- Tension : 6,5 kV puis augmentée graduellement jusque 9 kV
- Débit : 2 mL.h⁻¹
- Durée de déposition : 10 h

La morphologie des membranes ainsi obtenues est présentée dans la figure 3.14. La photo a) montre des fibres alignées bien que certaines se situent en diagonale par rapport aux autres. Les fibres sont donc principalement alignées dans le sens de la rotation du tambour. On peut néanmoins remarquer que ces fibres sont ondulées. En effet, lorsqu'elles se déposent sur le cylindre, elles sont précontraintes et sont donc des tiges droites. Cependant, en enlevant la

membrane du tambour, cette précontrainte ne s'applique plus, et, afin de minimiser leur énergie, elles adoptent cette configuration ondulée. Il a été possible de faire disparaître cette ondulation en appliquant une légère tension sur un réseau de fibres comme le présente la figure 3.14 b). Les fibres sont droites et parallèles entre elles.

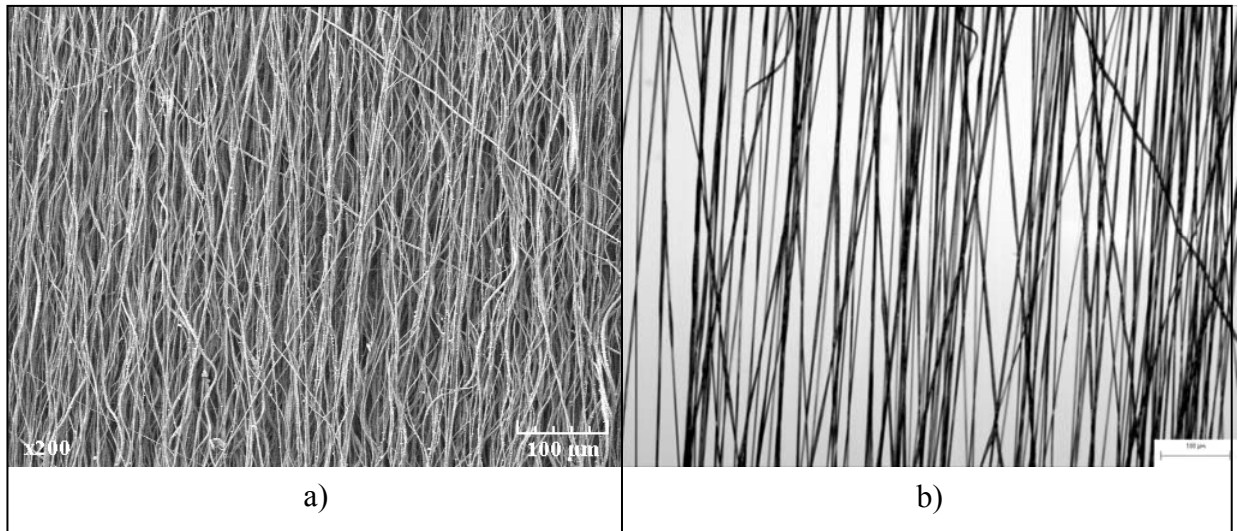


Figure 3.14 : Morphologie des fibres de PCL alignées. Solution de PCL à 12% (m/vol) dans un mélange CF/DMF (90/10), 1500 tr.min^{-1} , 9 kV, 14 cm, 2 mL.h^{-1}
a) observation MEB, b) observation au microscope optique.

Le diamètre des fibres alignées a été mesuré, et est de $1100 \pm 160 \text{ nm}$. Ce diamètre moyen de fibre est plus faible que celui des fibres non alignées, soulignant ainsi l'étirement appliqué par la rotation du cylindre que subissent les fibres lors de la déposition. En effet, le diamètre des fibres alignées est 2,5 fois plus petit que celui des fibres en déposition aléatoire.

Il est en outre possible de fabriquer des membranes comportant deux couches de fibres alignées et dont l'orientation des fibres de la première couche est perpendiculaire à celles de la seconde couche. En fixant, grâce aux barres prévues à cet effet, une feuille de papier d'aluminium sur le tambour, on peut déposer des fibres alignées. En faisant pivoter à 90° la feuille d'aluminium, il est possible de déposer une nouvelle couche de fibres qui sont perpendiculaires à celles de la première couche (figure 3.15). On obtient une structure bicouche.

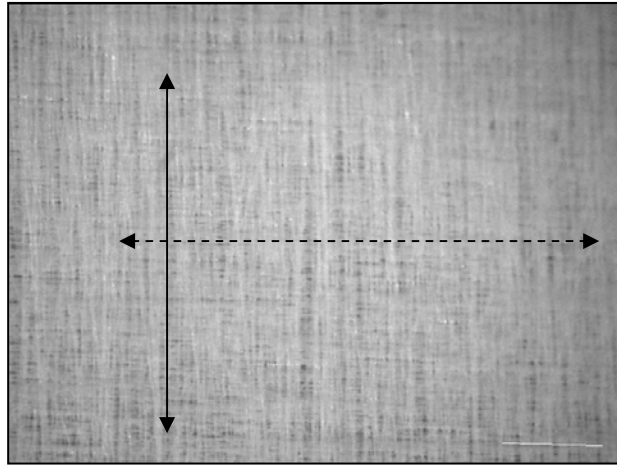


Figure 3.15 : Membrane de fibres alignées en bicouche. La double flèche en pointillé indique l'orientation des fibres de la première couche alors que la double flèche pleine indique l'orientation des fibres de la seconde couche.

Ces expériences ont montré que, bien que se heurtant à certaines difficultés, la déposition de fibres et leur alignement grâce à un tambour rotatif est une méthode permettant d'obtenir les résultats escomptés. De plus, nous pouvons envisager de fabriquer des structures plus complexes comme les structures bicouches.

3.2.3 Discussion

3.2.3.1 Effet des paramètres de déposition

L'effet de la concentration de la solution sur le diamètre des fibres a été largement étudié pour un grand nombre de systèmes [FON 99] [DEM 02] [MEG 02] [BÖL 05] [INA 05] [KWO 05] [YAN 05]. L'expérimentateur, en changeant la concentration de la solution, fait principalement varier la viscosité de celle-ci. La viscosité de la solution est le paramètre clé afin de régler le diamètre et la morphologie des fibres. Pham et *al.* ont ajusté de façon précise le diamètre des fibres de PCL en variant la concentration, le type de solvant et le ratio du mélange [PHA 06]. La viscosité de la solution est liée essentiellement à ces paramètres. Ainsi, leur contrôle précis est nécessaire pour maîtriser le procédé d'*electrospinning* et diminuer l'impact des facteurs de perturbations amoindrissant la reproductibilité du système.

Lorsque dans un mélange CF/DMF, la teneur en DMF, non-solvant de la PCL, est diminuée, la viscosité augmente ce qui a pour impact d'augmenter le diamètre moyen des fibres. Il existe aussi une autre explication à ce phénomène. L'emploi de DMF permet d'obtenir une solution possédant une conductivité et une constante diélectrique beaucoup plus élevées que

la même solution sans DMF. La conductivité étant accrue, la quantité de charges dans le jet est plus importante ce qui provoquera un plus grand étirement de ce dernier, engendrant alors des fibres de petits diamètres. Lorsqu'on diminue la teneur en DMF, l'effet inverse est obtenu. A titre d'exemple, on peut comparer les conductivités des solvants couramment employés. La conductivité de la DMF est $1,090 \text{ mS.m}^{-1}$ alors que celle du dichlorométhane est de $0,034 \text{ mS.m}^{-1}$. Un mélange à (75/25) possède une conductivité de $0,273 \text{ mS.m}^{-1}$ [RAM 05a]. L'impact du solvant a été bien mis en évidence par Lee et *al.* [LEE 03] et Bölggen et *al.* [BÖL 05]. Ils ont montré que l'incorporation de DMF dans les solutions de polymère a pour effet de diminuer la tension de surface de la solution et d'augmenter la conductivité. Ils ont obtenu des fibres de diamètres plus petits lorsque la teneur en DMF est grande.

Le contrôle de la viscosité de la solution passe par la maîtrise de différentes conditions : le choix du solvant ou du mélange de solvants, la masse molaire du polymère, la concentration de la solution. On peut ajuster assez précisément le diamètre des fibres déposées. Dans ce travail, en changeant les concentrations des solutions, il a été possible d'obtenir des fibres dont le diamètre s'échelonne de 100 nm à plusieurs micromètres.

L'impact de la viscosité ayant été démontré, il convient désormais de discuter les effets des paramètres qui peuvent être qualifiés de secondaires pour le procédé. La variation de la distance de déposition permet uniquement, dans nos expériences, d'ajuster le diamètre des *beads* mais elle n'a pas d'effet significatif sur le diamètre des fibres. Ce phénomène a été reporté par plusieurs Groupes de recherche. Cependant, ces auteurs ont observé une augmentation de la densité de *beads* formés, ce qui n'est pas le cas ici. En théorie, plus la distance de déposition est élevée, plus le temps de vol des fibres est grand pour une même accélération. Ainsi, les fibres obtenues devraient avoir un diamètre plus petit. Expérimentalement, il a été observé que lorsque la tension est de 15 kV et que la distance de déposition est augmentée, il arrive qu'à partir de 25 et 30 cm, la tension ne soit plus assez importante pour qu'un cône de Taylor se forme. Aussi, le procédé est fortement perturbé, le jet est discontinu. L'augmentation du diamètre des *beads* s'explique par ce phénomène, le jet de polymère n'étant plus étiré de façon homogène, les *beads* formés sont plus gros, et possèdent une géométrie plus sphérique. Ces observations semblent *a priori* être contraires à un certain nombre de publications [DEM 02] [KAT 04]. En effet, il est généralement considéré que l'augmentation de la distance de déposition diminue la formation de *beads*.

En augmentant la distance tout en gardant la tension constante, l'accélération du jet n'est plus la même en fonction des différentes distances, elle est plus grande pour les faibles distances.

De la même façon, le temps de vol augmente alors avec l'augmentation de la distance de déposition. Le jet pour les faibles distances subit d'une part, une forte accélération qui devrait étirer plus le jet et produire des fibres petites et d'autre part, un temps de vol court qui limite son étirement. Pour les plus grandes distances, le jet subit une accélération plus petite donc un jet plus gros mais puisque le temps de vol est plus grand, le jet a le temps d'être plus étiré. Ainsi ces deux phénomènes se retrouvent en concurrence et leurs effets semblent se moyennner puisque le diamètre des fibres est constant.

Nos expériences n'ont pas mis en évidence un réel effet de la tension bien que de nombreuses publications s'accordent à dire que l'augmentation de la tension favorise la formation de *beads* [DEM 02] [BÖL 05]. En effet, Bölgen et *al.*, en utilisant la PCL à 13% (m/vol) en solution dans un mélange DCM/DMF (30/70) (vol/vol), ont montré que la densité de *beads* est fortement affectée par l'augmentation de la tension de déposition [BÖL 05]. Cependant, dans leurs travaux, la tension de déposition varie dans une gamme beaucoup plus importante (de 13 à 30 kV). Aussi entre 13 et 15 kV, ils ne reportent que peu de changements en terme de densité de *beads*, et pas de changement significatif en terme de diamètre des fibres. L'effet de la tension semble être plus marqué pour des tensions plus fortes, ces auteurs ont observé une forte augmentation de la densité de *beads* pour une tension de 30 kV. Bien que le diamètre des fibres subisse une légère augmentation, celui-ci reste assez proche du diamètre obtenu pour les tensions plus basses. Ce résultat est quelque peu étrange puisque la formation de *beads* est généralement associée à une diminution de la taille des fibres.

En travaillant avec du collagène de type I en solution dans de l'hexafluoropropanol (HFIP), Kidoaki et *al.* ont montré que, dans un domaine de 9 à 25 kV, le diamètre des fibres ne change pas de façon significative [KID 05]. Aussi, avec leurs conditions de déposition, l'augmentation de la tension n'a pas provoqué de formation de *beads*.

Katti et *al.* [KAT 04] ont, quant à eux, montré que l'augmentation de la tension de déposition diminue le diamètre des fibres. En passant de 7,5 à 15 kV, le diamètre moyen des fibres est divisé par deux. Cependant, en augmentant encore la tension aucun effet n'est plus observé. La rapide diminution du diamètre des fibres provient éventuellement de la formation de plusieurs jets secondaires (bien que ces auteurs ne mentionnent pas ce phénomène) durant la déposition ce qui a pour effet de diminuer fortement la dimension des fibres. Durant les différentes phases de mise au point du procédé d'*electrospinning*, il a été fréquemment observé l'apparition de jet secondaire pour des tensions assez importantes, ou bien pour des distances de déposition petites.

Ramakrishna et *al.* ont reporté un phénomène intéressant lié à l'augmentation de la tension de déposition [RAM 05b]. D'après ces auteurs, l'augmentation de la tension favorise la formation de *beads* jusqu'à un point où la densité est tellement importante que les *beads* finissent par se toucher et forment ainsi une fibre de diamètre plus gros.

La tension et la distance de déposition influent essentiellement sur le temps de vol des fibres. Ainsi, lorsque les temps de vols restent proches, peu d'effets sont observables. Néanmoins, l'influence de ces paramètres reste assez difficile à mettre en évidence et aucune règle n'a été clairement établie.

3.2.3.2 Evaluation biologique

De nombreuses publications relatent la biocompatibilité des membranes qui a été largement étudiée pour plusieurs matériaux (collagène [MAT 02], différents polyesters [XU 04] [HE 05] [KWO 05] [YAN 05] [LI 06], Polyuréthane (PU) [LEE 05], des mélanges collagène/polymères synthétiques [ZHA 05b]).

3.2.3.2.1 Adhésion cellulaire

En règle générale, ces travaux ont mis en évidence la forte interaction matrice/cellules. Des structures fibreuses extracellulaires, caractérisant une forte adhésion cellulaire, ont été observées. Partant des cellules, ces composants de la matrice extracellulaire entourent parfois les fibres [XU 04]. Il est généralement considéré que les structures fibreuses permettent une adhésion cellulaire plus importante, puisqu'elles présentent aux cellules une aire surfacique décuplée lorsqu'on la compare à celle d'un film. C'est en effet le cas lorsqu'on étudie par exemple des nanofibres de PLCL. En analysant le nombre de cellules adhérentes sur les nanofibres et sur un film issu du *solvent casting*, Xu et *al.* ont montré que l'adhésion cellulaire est supérieure pour les nanofibres que pour les films [XU 04]. Bien que la cinétique d'adhésion suive la même tendance, après 8 h de culture, deux fois plus de cellules adhèrent sur les nanofibres que sur les films. Cette tendance a été observée par d'autres Groupes de recherche [LEE 05] [YAN 05].

La figure 3.13 montre que dans nos expériences après 24 h de culture, l'adhésion cellulaire du contrôle, c'est-à-dire sur le plastique du puits de culture, est plus importante que sur les nanofibres. Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la PCL est un matériau hydrophobe, rendant l'adhésion cellulaire plus difficile. Une observation similaire a été effectuée par Zhang et *al.* [ZHA 05c].

3.2.3.2.2 *Migration cellulaire*

Le paragraphe 3.1.4 a mis en évidence les limitations de l'*electrospinning*. Le manque de contrôle de la taille des pores est un réel problème pour permettre la colonisation et la migration cellulaire dans l'épaisseur de la membrane. Si les pores sont trop petits, les cellules ne peuvent pas physiquement se frayer un chemin vers le centre de la structure.

De nombreux travaux traitent cependant de la migration cellulaire sur des membranes micro- ou nano-fibreuses. Schnell et *al.* [SCH 07] ont analysé la migration cellulaire sur une membrane de nanofibres de collagène alignées. Ces auteurs ont observé une migration des cellules le long des fibres sur des distances relativement importantes (~ 1,5 mm). Les structures fibreuses utilisées dans ce travail induisent elles aussi une migration cellulaire dans le plan de la membrane. Bien que ces données n'aient pas été quantifiées, il a été observé que des cellules arrivées à confluence commencent à coloniser le second côté de la membrane. Cependant, rares sont les travaux qui abordent l'infiltration cellulaire dans les matrices nanofibreuses. Matthews et *al.* ont été parmi les premiers à rapporter le phénomène d'infiltration cellulaire dans une matrice de nanofibres de collagène après 7 jours de culture dans un système rotatif [MAT 02]. De même, Pham et *al.* ont observé une infiltration cellulaire sur une épaisseur de 1 mm dans une membrane nano- et microfibreuse de PCL [PHA 06]. Après 300 s de culture dans une chambre de perfusion, les coupes histologiques présentent une distribution cellulaire assez homogène sur l'ensemble de l'épaisseur de la matrice. Cependant, l'infiltration cellulaire dans les deux cas n'est pas spontanée. En effet, il est nécessaire d'utiliser un bioréacteur à perfusion afin d'obtenir une pénétration des cellules dans la profondeur de la matrice. Il est en effet considéré que les cultures en environnements dynamiques (comme la perfusion) favorisent la pénétration cellulaire dans les structures. Zhang et *al.* ont cependant observé une petite infiltration cellulaire en conditions statiques [ZHA 05c]. En utilisant une technique d'*electrospinning* coaxiale, ils ont fabriqué des fibres de PCL-collagène, la PCL étant au centre de la fibre et le collagène enveloppant cette fibre. L'infiltration cellulaire, qui a été observée, se limite à une pénétration de certaines cellules en dessous des premières fibres de PCL-collagène. Ces auteurs proposent une explication de la pénétration cellulaire liée au caractère hydrophile des fibres permettant une circulation des fluides nutritifs plus aisée, à cela s'ajoute la présence de collagène qui augmente le niveau de signal biologique induisant une plus forte affinité des cellules pour le collagène que pour les fibres de PCL. Il semblerait, d'après ces auteurs, que les cellules puissent déformer les nanofibres possédant les propriétés mécaniques les plus faibles, afin de se frayer un chemin dans l'épaisseur de la structure. Cependant, la présence de collagène est probablement la

principale raison qui permet une légère pénétration cellulaire. Aussi, aucune pénétration cellulaire n'a été observée dans nos expériences bien que les cellules aient proliféré dans le plan de la membrane.

Cette étude préliminaire a permis de montrer notre aptitude à fabriquer des membranes micro- et nano-fibreuses. Il a été mis en évidence la possibilité de contrôler dans une certaine mesure le diamètre des fibres et la taille des *beads*. Pour la suite des travaux, une solution de polymère a été sélectionnée dans l'optique de concevoir des fibres dont le diamètre est de l'ordre de plusieurs micromètres. La solution de PCL à 12% (m/vol) dans un mélange CF/DMF (90/10) (vol/vol) a été choisie.

3.2.3.3 Déposition alignée

La déposition de fibres alignées a été effectuée à partir d'une solution de PCL à 12% (m/vol) dans un mélange CF/DMF (90/10) (vol/vol). Le tambour rotatif permet d'obtenir des membranes dont les fibres sont orientées majoritairement de façon tangentielle au cylindre. Le diamètre des fibres alignées est en général plus faible que celui obtenu en déposition aléatoire pour les mêmes conditions. Ce phénomène a déjà été évoqué par d'autres Groupes de recherche [YAN 05] [LI 07] et provient de l'étirement supplémentaire exercé par la rotation du cylindre sur les fibres. Aussi, ces Groupes ont observé une diminution relativement importante du diamètre comme dans notre cas. En effet, pour une solution de PLLA à 5% (m/vol) dans un mélange de DCM/DMF (70/30) (vol/vol) le diamètre des fibres passe de 3,5 μm pour une déposition statique à 1,5 μm pour la déposition alignée. Lorsque les fibres atteignent le collecteur, elles sont déformées par la rotation de ce dernier. De façon similaire à un essai de traction classique, lorsqu'un matériau est déformé, sa section diminue en réponse à son allongement dans le sens de la déformation. L'étirement des fibres, durant l'alignement, est donc un paramètre à prendre en compte pour pouvoir maîtriser leurs tailles. De même, cet étirement semble avoir un impact sur la cristallinité des fibres. Mo et *al.* ont montré que des fibres de PLCL présentent une structure totalement différente du matériau brut. Ils ont observé que presque toutes les séquences cristallines de l'acide lactique (LA) ont disparu alors que les séquences cristallines de la caprolactone (CL) ont augmenté [MO 04].

L'étirement ou la déformation nécessaire pour obtenir l'alignement des fibres change les propriétés mécaniques des membranes. Lee et *al.* ont montré que des membranes constituées par des fibres alignées de PU possèdent un module d'élasticité plus grand que les membranes

issues d'une déposition aléatoire [LEE 05]. Il en est de même pour la contrainte de rupture qui augmente lorsque les fibres sont alignées alors que la déformation à rupture reste sensiblement la même [LEE 05]. Aussi, le fait d'aligner les fibres permet de contrôler l'anisotropie de la structure. Li et *al.* ont ajusté le module d'élasticité de membranes de PCL en variant le degré d'orientation des fibres [LI 07], en appliquant différentes vitesses de rotation du tambour. En effet, une vitesse de rotation faible produit des fibres peu alignées alors qu'une vitesse élevée induit un alignement plus conséquent. Le degré d'alignement des fibres peut varier de 30 à 90%. Dans une autre publication [NER 07], ce même groupe a montré l'évolution non linéaire du module d'élasticité en fonction de l'angle d'orientation majoritaire des fibres de PCL. Il en résulte que plus les fibres sont alignées, plus le module d'élasticité est important. Ainsi, l'anisotropie de la structure peut être contrôlée.

L'alignement des fibres permet en outre d'influer sur le comportement cellulaire. Ce point sera abordé ultérieurement dans la partie traitant de l'ingénierie du tendon et du ligament.

3.3 Contrôle de la charge des fibres

La charge de surface des biomatériaux a une grande importance au niveau de l'interaction avec les protéines et les cellules. Les protéines et les cellules sont globalement chargées négativement. Il est généralement accepté qu'une surface positivement chargée permet une meilleure adhésion cellulaire et plusieurs travaux, plus ou moins anciens en font état [HEL 85] [SHE 88] [LEE 97], même si des travaux tendent à démontrer que la charge importe peu sur l'adhésion cellulaire [MAR 75]. Les techniques de modification de la charge surfacique des biomatériaux sont nombreuses et pour la plupart bien établies, passant du traitement plasma, à l'immobilisation des espèces chargées, ou bien à la déposition de polyélectrolytes. Nous n'entrerons pas dans les détails de ces techniques qui sont bien souvent un post-traitement des biomatériaux. Nous présentons, ici, une méthode innovante, en une seule et unique étape, permettant la fabrication de microfibres positivement chargées.

3.3.1 Matériels et méthodes

Le schéma global de cette étude est le suivant : nous avons fabriqué des fibres et des membranes positivement chargées à partir d'un mélange de deux polymères. Des fibres et des membranes des deux polymères pris individuellement ont aussi été préparées et nous avons comparé le tout en termes de morphologie, de valeur du potentiel zêta et de mouillabilité par des mesures d'angle de contact.

3.3.1.1 Matériel

- PCL, $M_w = 80\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Sigma-Aldrich, France.
- Eudragit RS (figure 3.16), polyméthylméthacrylate, $M_w = 150\,000\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$, Degussa GmbH, Allemagne.

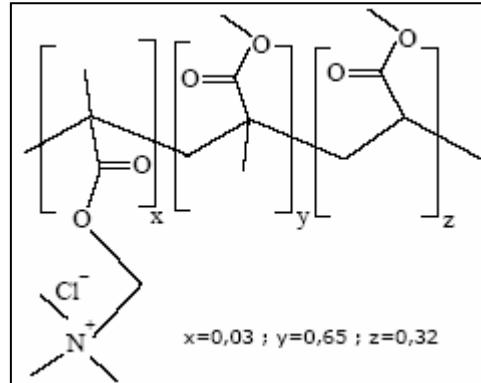


Figure 3.16 : Formule de l'Eudragit RS.

- Eudragit-Rhodaminé, fourni par la Faculté de Pharmacie de Nancy.
- Dichlorométhane (DCM), Sigma-Aldrich, France.

3.3.1.2 Préparation des solutions

Une solution de PCL à 14% (m/vol) a été préparée dans du DCM. Un mélange de PCL et d'Eudragit à un rapport massique de (96/4) (PCL/Eudragit) a été employé pour préparer une solution à 16% (m/vol). Une solution de PCL/Eudragit-Rhodaminé dans les mêmes conditions a été préparée. Une solution d'Eudragit possédant une concentration de 50% (m/vol) toujours dans du DCM a été aussi élaborée.

3.3.1.3 Fabrication des membranes

Les membranes ont été préparées en versant 5 mL de chaque solution dans un moule en verre (cf. chapitre 1 paragraphe 1.2.1.2). Les moules ont ensuite été placés dans une enceinte saturée en DCM pendant 48 h. Cette étape a pour but de diminuer la vitesse d'évaporation du DCM afin d'obtenir des membranes peu rugueuses.

3.3.1.4 Electrospinning

Les conditions de déposition sont les suivantes :

- Débit de la solution $2\text{ mL}\cdot\text{h}^{-1}$
- Distance de déposition 15 cm
- Tension de déposition 10 kV

3.3.1.5 Morphologie des fibres

La morphologie des fibres a été observée par microscopie électronique. La structure interne des fibres a été évaluée par microscopie confocale de fluorescence, microscope Leica TCS SP2-AOBS (Leica Microsystems, Allemagne) équipé d'une tête confocale (beamsplitter) optico-acoustique, d'un laser Argon 100 mW (457 nm, 476 nm, 488 nm, 514 nm), d'un laser Hélium (543 nm et 633 nm) et d'un laser Verdi 8 W (VERDI laser - MIRA 900F (de 600 à 1100 nm, Coherent, France)). Ces sources lumineuses ont été utilisées avec un objectif à immersion-eau x 40/0,8. A une excitation de 543 nm, la largeur de bande des longueurs d'onde de la fluorescence détectée a été optimisée pour la rhodamine (582-651 nm). Les émissions de fluorescence ont été enregistrées avec un disque d'Airy complètement fermé (1 A) et les images, avec une taille de pixel (x,y) de 0,238, ont été obtenues dans des matrices 512x512.

3.3.1.6 Mesure du potentiel zêta

Le potentiel zêta a été mesuré exclusivement pour les microfibres. Ces mesures ont été effectuées en utilisant un zêta-mètre ZETACAD (CAD Inst., France) qui emploie une cellule en verre cylindrique élaborée spécifiquement pour l'investigation d'échantillons fibreux ou granulaires.

Le potentiel zêta est calculé par la formule de Smoluchowski :

$$\zeta = \frac{\Delta\phi_s}{\Delta P} \frac{\eta\lambda_0}{\varepsilon_0\varepsilon_r} \quad (3.1)$$

où ΔP est la pression appliquée, $\Delta\phi_s$ est le *streaming potential*, η est la viscosité dynamique du fluide utilisé pour la mesure, λ_0 est sa conductivité, et ε_r la constante diélectrique et ε_0 est la permittivité du vide. Le potentiel du fluide de mesure a été mesuré dans une solution aqueuse de KCl à 10^{-3} M à $\text{pH} = 5,7 \pm 0,1$.

3.3.1.7 Mesure de l'angle de contact

La mesure des angles de contact a été effectuée en déposant délicatement 5 μL d'eau distillée sur les membranes fibreuses préalablement tendues. Une image de cette goutte a été enregistrée par caméra (Imasys PXC200 AL) et un logiciel de mesure des angles, Goutana2, développé au laboratoire, a été utilisé pour le calcul des angles. Pour chaque type de fibres et de membranes, un minimum de 5 mesures a été réalisé.

3.3.2 Résultats

3.3.2.1 Morphologie des fibres

La morphologie des fibres est présentée dans la figure 3.17.

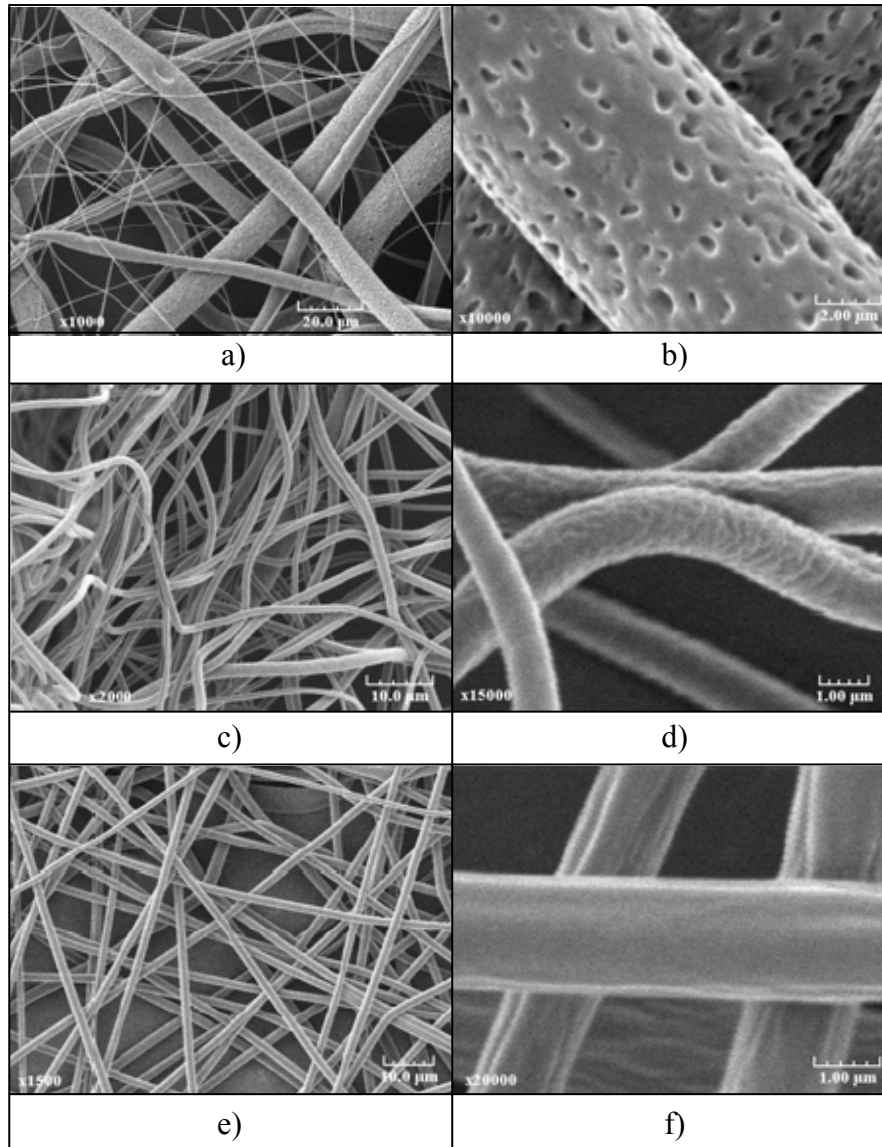


Figure 3.17 : Morphologie des fibres. a) et b) PCL, c) et d) PCL/Eudragit, e) et f) Eudragit.

Les fibres de PCL présentent une distribution bimodale, des fibres de gros diamètres ($\sim 5 \mu\text{m}$) jouxtent des nanofibres. Ce phénomène est dû à la formation de jets secondaires à partir du cône de Taylor. Les fibres de PCL proposent une surface macrorugueuse en raison de la présence de trous formés par l'évaporation du solvant (figure 3.17 a) et b)). Les fibres du mélange de PCL/Eudragit (96/4) sont beaucoup plus petites, avec un diamètre de l'ordre du micromètre. La surface de ces fibres est totalement différente des fibres de PCL. La présence

des trous d'évaporation du solvant n'est plus observée. En revanche, nous pouvons remarquer des plis sur la surface des microfibrilles. Ces plis forment une structure semblable à l'arrangement du cerveau. Cette morphologie semble indiquer qu'une séparation de phase entre la PCL et l'Eudragit a eu lieu. Ce point sera traité plus en détail dans la discussion. Les fibres d'Eudragit sont, quant à elles, très lisses et de diamètre similaire aux fibres du mélange. La distribution de l'Eudragit au sein des fibres a été visualisée par microscopie confocale. La figure 3.18 présente ces résultats.

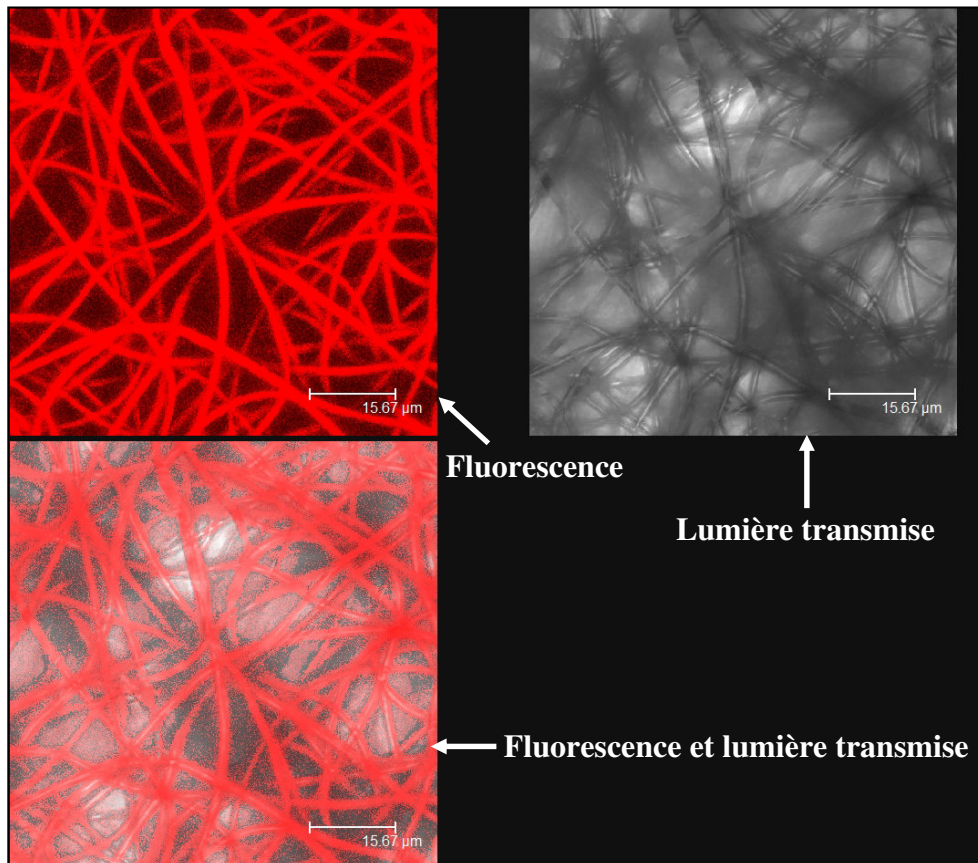


Figure 3.18 : Distribution de l'Eudragit dans les fibres PCL/Eudragit, microscopie confocale, $\nu_{\text{exc}} = 549 \text{ nm}$.

L'étude en microscopie confocale a montré que l'Eudragit est distribué de façon homogène sur la surface des fibres. Une séparation de phase était attendue comme nous l'expliquons plus loin mais nous n'avons pas pu mettre en évidence le fait que l'Eudragit forme une écorce autour des fibres et que la PCL constitue le centre des fibres en raison des limitations optiques de l'appareillage.

3.3.2.2 Mesure du potentiel zêta

La figure 3.19 présente la mesure du potentiel en fonction de la pression appliquée pour les trois types de fibres.

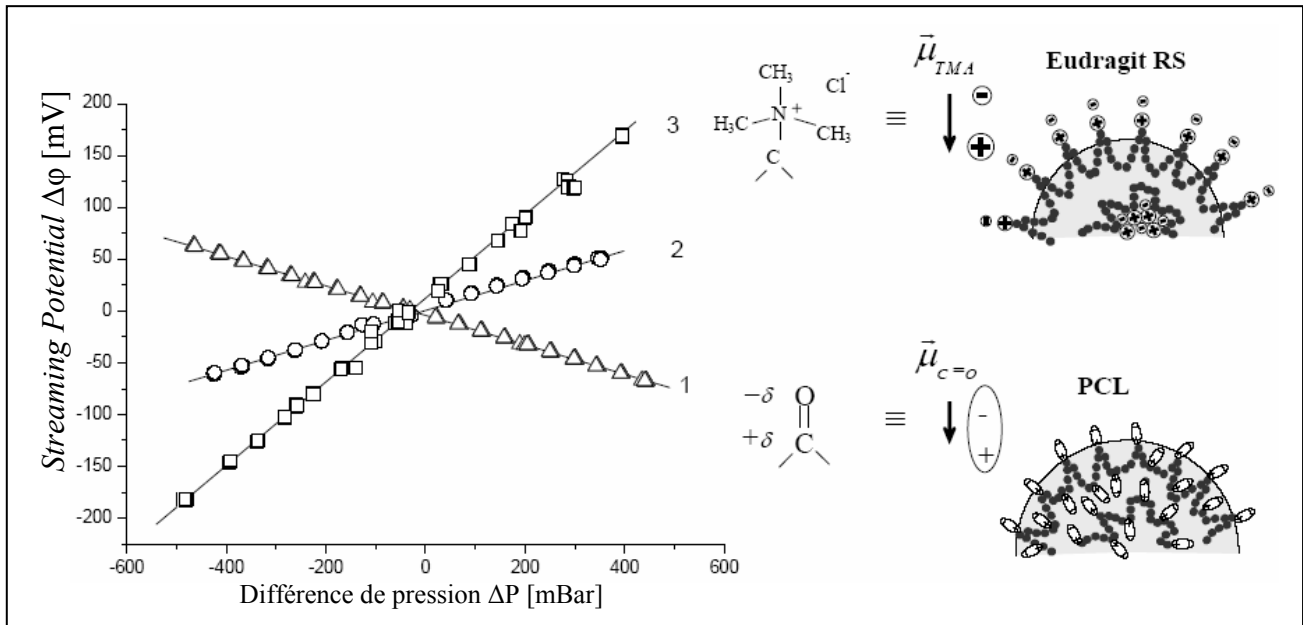


Figure 3.19 : *Streaming Potential* en fonction de la pression appliquée.

1, PCL, 2, PCL/Eudragit (96/4), 3, Eudragit.

La pente de ces courbes permet de calculer le potentiel zêta des fibres. Nous remarquons que les pentes des droites obtenues pour les fibres d'Eudragit et de PCL/Eudragit sont positives alors celle des fibres de PCL est négative.

Le potentiel zêta des fibres est donné dans le tableau 3-5.

Tableau 3-5 : Potentiel zêta des fibres de PCL, Eudragit et PCL/Eugragit (96/4).

	Potentiel Zêta [mV]
PCL	-28 ± 1
PCL/Eudragit	$+24 \pm 3$
Eudragit	$+75 \pm 2$

Le potentiel zêta des fibres de PCL est négatif, alors que celui des fibres d'Eudragit est positif. En incorporant 4% d'Eudragit nous avons observé une drastique variation du potentiel, les fibres du mélange possèdent alors un potentiel de +24 mV. Nous passons de fibres fortement chargées négativement à des fibres qui sont elles aussi fortement chargées

mais positivement. Cette technique permet d'obtenir des fibres positives sans étapes de post-traitement additionnelles. La charge positive de l'Eudragit provient de la présence de groupements triméthylammonium. Cette hybridation quaternaire permet d'obtenir un dipôle électrique dont la composante positive se retrouve en surface des fibres.

3.3.2.3 Mesure de l'angle de contact

Les mesures des angles de contact des membranes et des fibres des différents matériaux sont rassemblées dans le tableau 3-6.

Tableau 3-6 : Angles de contact des membranes et des fibres.

	Angles de contact [°]	
	Membranes	Fibres
PCL	81,5 ± 3,6	140,9 ± 6,6
Eudragit	82,5 ± 2,1	127,9 ± 2,8
PCL/Eudragit (96/4)	79,5 ± 4,8	131,3 ± 2,6

Les angles de contact des différentes membranes restent constants, aux environs de 80°. Les mouillabilités de la PCL, de l'Eudragit et du mélange sont similaires. Les angles de contact des fibres ont une valeur beaucoup plus élevée. Les fibres de PCL possèdent l'angle de contact le plus grand avec 140°. Ce matériau est connu pour son hydrophobie. L'angle de contact des fibres d'Eudragit est plus faible (128°), et celui des fibres du mélange est à une valeur intermédiaire de 131°. Les valeurs d'angles de contact des fibres sont beaucoup plus élevées car l'aire surfacique est bien plus grande pour les membranes fibreuses que pour les membranes pleines. Nous obtenons donc pour les fibres des angles obtus. Il est intéressant de noter que les angles semblent constants quel que soit le type de membranes alors qu'ils varient selon le type de fibres. De même, il est important de remarquer que les angles obtenus pour le mélange PCL/Eudragit et Eudragit sont semblables, semblant indiquer de ce fait que l'Eudragit se retrouve en surface pour les fibres PCL/Eudragit.

3.3.3 Discussion

3.3.3.1 Morphologie des fibres

La différence des diamètres des fibres peut s'expliquer par plusieurs raisons. En premier lieu, il est possible de classer les solutions dans un ordre croissant de viscosité :

$$V_{\text{Eudragit}} < V_{\text{PCL/Eudragit}} < V_{\text{PCL}}$$

La viscosité de la solution de PCL étant la plus haute, les fibres de PCL ont un diamètre plus important (cf. paragraphe 3.1.2.1). Une autre explication provient du fait que l'Eudragit possède une charge importante, il augmente ainsi la conductivité de la solution provoquant un plus grand étirement du jet formant ainsi des fibres plus petites [FON 99] [ZEN 03].

3.3.3.2 Séparation de phase

La structure en « plis du cerveau » des fibres du mélange tend à démontrer qu'une séparation de phase a lieu entre l'Eudragit et la PCL. Dans des résultats non publiés, Babak et *al.* ont observé ce phénomène lors de la déposition de microbilles de PCL/Eudragit par *electrospraying* [BAB 06]. Ces billes de 10 µm de diamètre ont un noyau interne riche en PCL et une écorce externe riche en Eudragit. Cette séparation de phase a été attribuée à la plus faible solubilité de l'Eudragit dans le DCM comparé à la PCL. Aussi durant l'évaporation du solvant, des nanoparticules d'Eudragit se forment dans les couches superficielles de la microbille, et sous l'effet du flux de solvant s'échappant des billes, les nanoparticules sont entraînées à la surface de la microsphère [BAB 06]. En utilisant une sonde fluorescente greffée sur l'Eudragit, il est possible d'observer, en microscopie confocale, une nette séparation entre les deux polymères. Cet effet n'a pas été directement observé pour les fibres de notre étude pour des raisons techniques mais peut-être aussi parce que cette séparation n'est pas totale et a lieu probablement sur une épaisseur très fine de la surface des fibres. Aussi, la vitesse d'évaporation du solvant lors de la déposition des fibres est beaucoup plus importante que celle observée pour des billes de 10 µm de diamètre. En effet, les fibres sont très fines et surtout très longues, la surface en contact avec l'air est donc extrêmement grande, ce qui augmente la vitesse d'évaporation. Lorsque les fibres atteignent le collecteur, elles sont « sèches » empêchant ainsi une séparation totale des deux polymères.

Nous avons ici avancé le concept de séparation de phase sans pour autant en apporter la preuve. En effet, chaque résultat de cette étude pris séparément ne constitue pas un argument irréfutable. En revanche, si on considère l'ensemble des expériences, cela constitue un faisceau de présomptions semblant indiquer que la séparation de phase entre les deux polymères a vraisemblablement eu lieu. Analysons désormais le changement de signe du potentiel zêta. En négligeant toutes les interactions entre les deux polymères et les solvants, nous pouvons calculer un potentiel zêta prédictif du mélange PCL/Eudragit grâce à la formule des mélanges :

$$A_{total} = \frac{(A_1 * f_1 + A_2 * f_2)}{f_1 + f_2} \quad (4.1)$$

où A_1 , A_2 et A_{total} représentent respectivement une caractéristique des espèces 1, 2 et du mélange et f est la fraction des espèces en présence. Ce calcul très sommaire nous donne un potentiel zêta prédictif de -24 mV. Le potentiel expérimental est de +24 mV. De plus, l'angle de contact des fibres du mélange est quasiment égal à celui des fibres d'Eudragit, ce qui tend à montrer que l'Eudragit se retrouve en surface et qu'il y a bien séparation de phase.

Les avantages de cette technique de déposition par *electrospinning* d'un mélange PCL/Eudragit sont nombreux. Le contrôle de la charge des fibres et leur fabrication sont effectués en une seule étape, c'est donc un gain de temps. Les techniques de déposition couche par couche de polyélectrolytes nécessitent en effet un temps assez conséquent pour obtenir une adsorption suffisante des espèces en solution [GAR 04] [CRO 06]. De plus, l'incorporation de petite quantité d'Eudragit engendre la déposition de fibres positivement chargées sans altérer de façon significative les propriétés mécaniques des fibres.

3.4 Conclusion et perspectives

L'*electrospinning* est une technique nouvelle au laboratoire qui a été développée durant mes deux dernières années de thèse. Cette étude expérimentale de l'*electrospinning* a permis de mettre en évidence l'influence de plusieurs paramètres sur le diamètre des fibres et la présence de *beads* au sein des membranes. Aussi, il est désormais possible de fabriquer, de manière reproductible, des fibres possédant différents diamètres. De plus, la non-toxicité des membranes micro-fibreuses a été prouvée validant ainsi ces membranes pour une utilisation en ingénierie tissulaire. Il a été néanmoins mentionné les limitations de cette technique qui proviennent majoritairement de la dimension des structures fabriquées qui ne dépasse que rarement le millimètre d'épaisseur. Cependant, l'*electrospinning* reste une technique très attrayante pour le domaine biomédical.

La mise au point d'un tambour rotatif pour permettre un alignement des fibres est une réelle avancée pour le projet d'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament de notre laboratoire puisque cette morphologie est similaire à celle du ligament. Il a été montré la faisabilité de fabrication de structures d'une épaisseur proche du millimètre constituées de fibres alignées.

Une étude mécanique serait nécessaire pour mieux caractériser ces membranes. Cette étude n'a pu être réalisée en raison du manque de sensibilité des capteurs de force des machines de traction disponibles au laboratoire.

La possibilité de contrôler la charge des fibres ouvre de nombreuses perspectives pour améliorer l'adhésion cellulaire mais aussi en terme de filtration de toutes espèces

négativement chargées. Des études concernant l'évolution du potentiel zêta pour des fibres de diamètre supérieur à 1 μm sont en cours. Aussi, il convient d'évaluer l'adhésion cellulaire sur ces membranes.

De manière générale, le savoir-faire acquis ici sera utilisé dans la suite des travaux afin de développer des structures pour l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament.

Partie 4

4 Ingénierie tissulaire du tendon et du ligament

L'ingénierie tissulaire du tendon ou du ligament a pour objectif le développement de tissus collagéniques, pour pouvoir à terme remplacer les tissus naturels. Cette 4^{ème} partie traite de la fabrication des structures qui peuvent éventuellement être utilisées pour cette stratégie. Avant d'aborder les techniques de fabrication, il convient de s'intéresser, à la fonction, à la composition, à la structure et à la biomécanique des tissus conjonctifs. Nous nous intéressons plus particulièrement au ligament croisé antérieur (LCA) et aux tendons.

4.1 Ligament et tendons

4.1.1 Fonction

4.1.1.1 Le ligament croisé antérieur

La fonction du ligament croisé antérieur, outre d'assurer la stabilité du genou, permet la transmission du mouvement et des efforts mécaniques entre le fémur et le tibia. Il possède des attaches osseuses à chaque extrémité. Il subit des efforts de traction, torsion et aussi de flexion lors du mouvement. Ce tissu permet le maintien de l'intégrité de l'articulation lors des appuis en pivot, ce qui explique le fait qu'il est le ligament le plus fréquemment lésé chez les sportifs. Il est important de noter que le LCA n'est pas cicatrisable pour des raisons qui seront abordées dans le paragraphe 4.1.3.3.

4.1.1.2 Les tendons

Les tendons sont des cordons fibreux cylindriques ou aplatis reliant les muscles au squelette. Ils possèdent donc une attache osseuse et une attache musculaire. Les tendons participent essentiellement à la transmission des efforts des muscles vers les os. Contrairement au LCA, les tendons sont, dans la plupart des cas, des tissus possédant une capacité d'auto-cicatrisation.

4.1.2 Composition des tissus conjonctifs

Les tissus conjonctifs, et plus particulièrement les tendons et les ligaments, sont constitués essentiellement d'eau (jusqu'à 60% de la masse humide pour les ligaments) et de cellules fibroblastiques entourées d'une importante matrice extra-cellulaire. On considère que les cellules occupent un volume d'environ 20%, la matrice extra-cellulaire occupant les autres 80% [LAU 99]. Cette matrice est composée en majorité de collagène. Les collagènes font partie de la famille des protéines fibreuses. Ils sont sécrétés principalement par les cellules des tissus conjonctifs et sont les protéines les plus abondantes chez les mammifères constituant

environ 25% des protéines totales [ALB 89]. Il existe plus de 20 types de collagène dénommés collagènes des types I, II, III, etc. Les collagènes des types I, II et III font partie des collagènes fibrillaires en raison de leur capacité à former des fibres. La structure basique de ces fibres est longtemps restée inconnue de par l'impossibilité de les solubiliser. Cependant, en utilisant des tissus provenant d'animaux assez jeunes où le collagène n'est pas encore trop réticulé, il a été possible d'isoler l'unité structurale des collagènes, le tropocollagène.

Le tropocollagène est constitué de trois chaînes polypeptidiques appelées chaînes α (environ 1000 acides aminés) qui s'enroulent les unes par rapport aux autres pour former une triple hélice. La formation de cette triple hélice a lieu dans la cellule. Le procollagène est ensuite sécrété et ses N-terminaux et C-terminaux sont coupés par l'action d'une protéase spécifique appelée peptidase procollagène. On obtient alors une molécule de tropocollagène. Cette molécule mesure 300 nm de long et 1,5 nm de diamètre.

Des fibrilles de tropocollagène sont formées par l'auto-réticulation des résidus de lysine, un acide aminé présent en grande quantité dans les molécules de collagène. Cette réticulation permet d'obtenir des unités de tropocollagène alignées et solidaires entre elles. Typiquement, ces fibrilles ont une longueur de plusieurs micromètres et un diamètre de 50 nm. Les fibrilles vont de nouveau s'assembler entre elles par le même mécanisme formant ainsi des fibres de collagène qui elles mêmes s'insèrent dans une structure plus grosse appelée fascicule. Plusieurs fascicules forment ensemble un faisceau de collagène puis un tendon ou un ligament (figure 4.1).

Les tissus conjonctifs, tels que le ligament croisé antérieur (LCA) ou le tendon, sont composés de collagène de type I à hauteur de 90% de la masse sèche, de collagène de type III (de 5 à 10%), d'élastine à hauteur de 1% et de collagène des types II et V [BIR 97] [LAU 99] [SIL 03] [DUT 06]. D'autres types de protéines (glycoprotéines, glycosaminoglycanes, etc.) entrent aussi dans la composition du ligament croisé antérieur. Il n'y a globalement pas de différence morphologique entre les ligaments et les tendons si ce n'est que les cellules ligamentaires ont un métabolisme plus élevé et une plus grande quantité d'ADN. Les teneurs en eau et en collagène des types I et III varient quelque peu. Le ligament possède un plus grand nombre de fibres de collagène réticulées que le tendon [GOH 03].

La figure 4.1 résume schématiquement les étapes de formation des fibres de collagène.

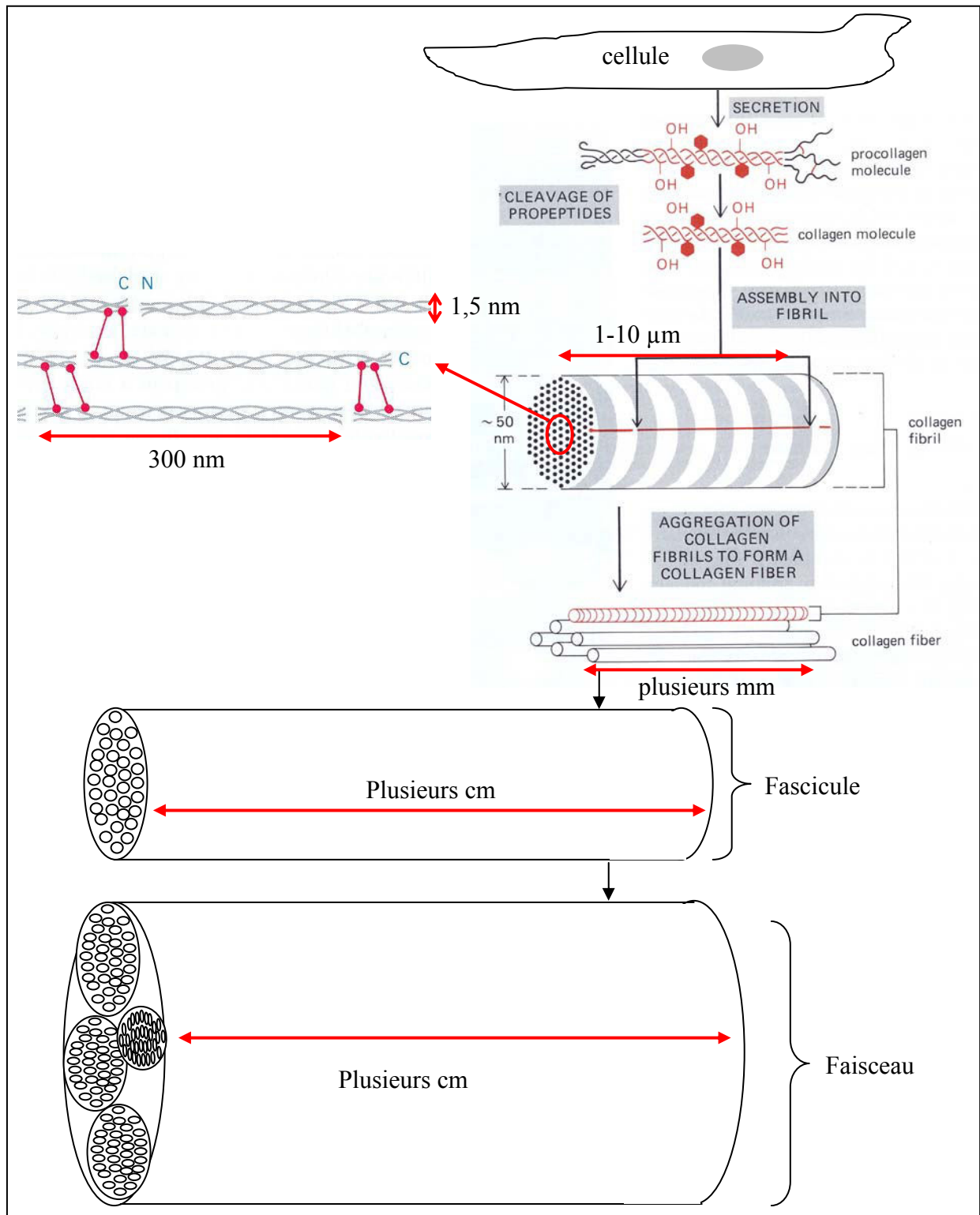


Figure 4.1 : Organisation des tissus collagéniques. Tiré de [ALB 89] et de [STR 89].

4.1.3 Structure

Les tissus ligamentaires et tendineux sont constitués de fibres de collagène alignées les unes par rapport aux autres dans lesquelles s'insèrent des cellules responsables de la sécrétion de collagène. Comme nous l'avons décrit précédemment, le tissu est formé par un assemblage de fibrilles de collagène qui forme peu à peu un tissu dont le diamètre et la longueur augmentent en passant par le stade de fascicules, puis de faisceaux.

4.1.3.1 Structure macroscopique

Le ligament croisé antérieur est un tissu composé de fibres de collagène en grande quantité. Il relie dans l'articulation du genou le plateau tibial et le plateau fémoral et permet la stabilisation de ladite articulation. Chez l'homme, les dimensions du ligament croisé antérieur varient selon l'âge et la personne considérée. Sa longueur s'échelonne entre 22 et 41 mm avec une valeur moyenne de 32 mm. La section du ligament croisé antérieur est irrégulière, elle est ni circulaire, ni elliptique ou semblable à toute autre forme géométrique simple. Sa forme change en fonction de l'angle de flexion du genou. Son diamètre, si tant est qu'on puisse parler de diamètre, varie entre 7 et 12 mm, et est centré sur une valeur moyenne de 10 mm [DUT 06]. La figure 4.2 présente l'anatomie macroscopique d'un ligament croisé antérieur humain. L'aire de la section du ligament évolue en fonction de l'éloignement du plateau tibial ou fémoral. Le LCA est composé de deux faisceaux parallèles (figure 4.2 b)) appelés faisceau antéro-médial et faisceau postéro-latéral. Certains auteurs distinguent un troisième faisceau, le faisceau intermédiaire. Les faisceaux possèdent une géométrie un peu plus cylindrique et leurs longueurs et sections varient en fonction de l'angle de flexion durant le mouvement [DUT 06].

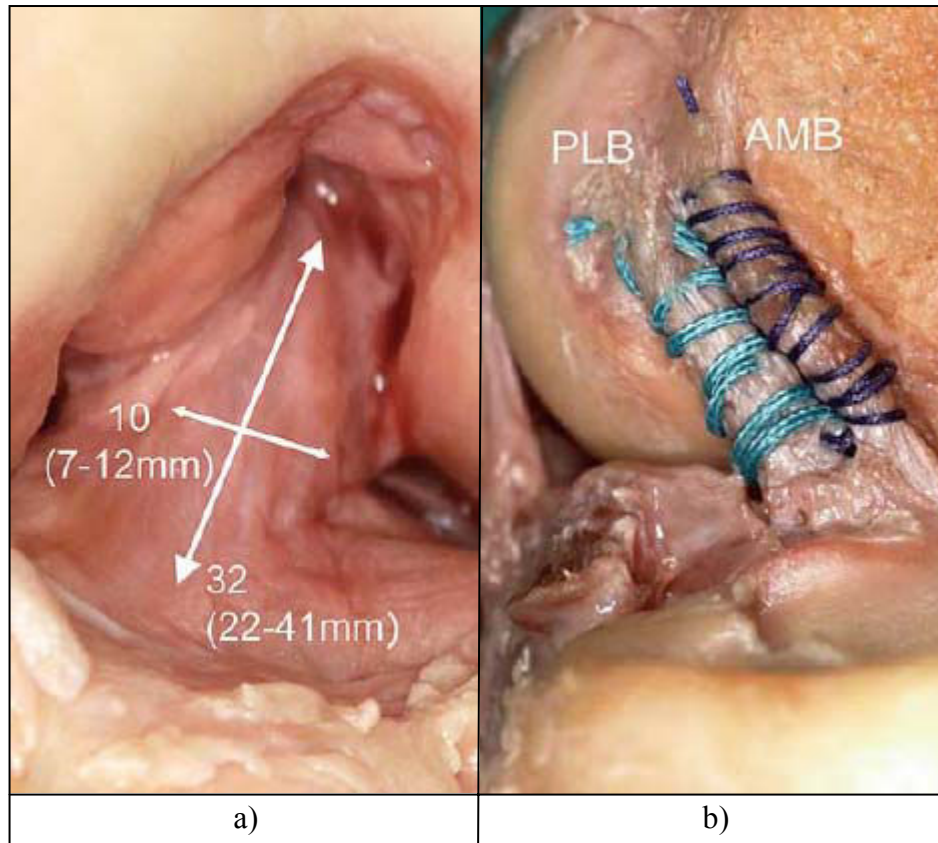


Figure 4.2 : Morphologie macroscopique du ligament croisé antérieur. a) vue intra-articulaire, b) morphologie des faisceaux antéro-médial et postéro-latéral. Tiré de [DUT 06].

4.1.3.2 Structure microscopique

4.1.3.2.1 Microstructure générale

Un tissu conjonctif, le paraténon, entoure plusieurs fascicules dont le diamètre varie entre 250 μm et plusieurs millimètres. Chaque fascicule est englobé et séparé des autres par un autre tissu conjonctif appelé l'épiténon. Ces fascicules sont constitués de 3 à 20 sous-unités fasciculaires de 100 à 250 μm de diamètre qui elles-mêmes sont englobées dans l'endoténon. Les sous-unités fasciculaires n'ont pas une morphologie rectiligne. Elles possèdent une structure ondulée formant ce qu'on peut qualifier de vague. Les sous-unités proviennent de l'assemblage de fibres de collagène dont le diamètre s'échelonne entre 1 et 20 μm [DUT 06]. Bien évidemment, ces fibres sont formées par plusieurs fibrilles de collagène (cf. figure 4.1).

Provenzano et *al.* ont montré que dans les ligaments et tendons du rat, ces fibrilles de collagène sont en grande majorité alignées et que certaines fibrilles s'enfoncent dans la profondeur du tissu et s'enchevêtrent ainsi avec les autres fibrilles des couches inférieures [PRO 06]. De même, ces auteurs ont observé la présence de fibrilles obliques formant ce qu'on peut qualifier de nœud avec les fibrilles alignées comme le montre la figure 4.3.

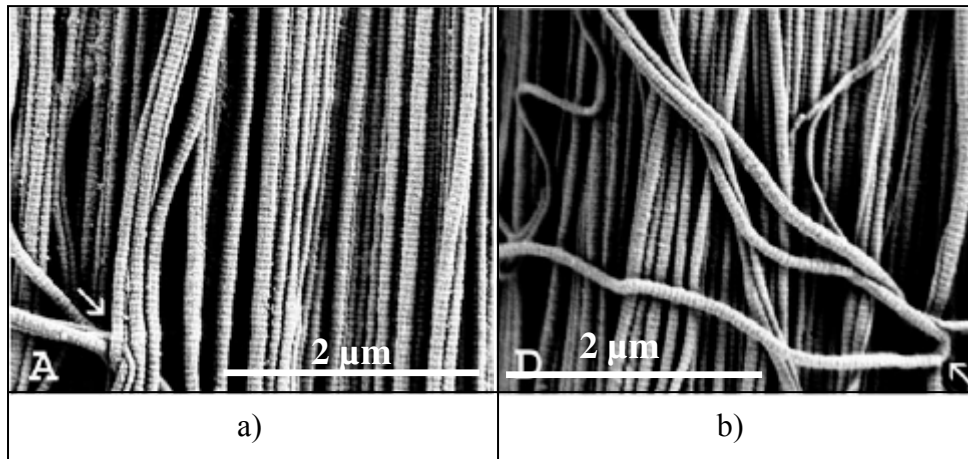


Figure 4.3 : Enchevêtrement des fibrilles de collagène. a) formation de « nœud »,
b) présence de fibres obliques [PRO 06].

Cet enchevêtrement a vraisemblablement une forte implication dans la transmission des efforts dans la structure ligamentaire.

On distingue trois zones dans la microstructure du LCA décrites ci-après [DUT 06] [ZAN 06a].

4.1.3.2.2 La zone proximale

La zone proximale est située près de la zone d'ancrage dans le fémur. Cette zone est hautement cellularisée et les cellules sont rondes ou ovales, bien que la présence de fibroblastes fusiformes ait été observée. La zone proximale est riche en collagène de type II et en glycoprotéines.

4.1.3.2.3 La zone intermédiaire

La zone intermédiaire est la zone où la densité de fibres de collagène des types I et III est importante et où la densité cellulaire est la plus faible. Des fibroblastes fusiformes sont insérés au cœur des fibres. Dans cette zone, le cytoplasme des cellules semble intimement lié au collagène.

4.1.3.2.4 La zone distale

La zone distale, proche de l'attache tibiale, est une zone solide, riche en chondroblastes et en fibroblastes dont la forme est ovale. La densité de fibres de collagène est moins importante que dans les deux autres zones [DUT 06].

4.1.3.3 Vascularisation

Il est coutume de dire que le LCA est un tissu peu ou pas vascularisé, ce qui constitue un raccourci quelque peu erroné. Le LCA est, comme tout autre tissu, vascularisé sinon il ne pourrait, ni se développer pendant la croissance des mammifères, ni rester viable, mais sa vascularisation est hautement hétérogène [DUT 06]. Une artère achemine le sang vers certaines parties du LCA. Ainsi, la zone proximale est largement irriguée, alors que la zone intermédiaire (c'est-à-dire les fibres de collagène) est quasiment avascularisée. La zone distale est, quant à elle, moins bien vascularisée que la zone proximale. Il a été montré que la vascularisation de la zone distale est hétérogène et que la présence de zones complètement avasculaires a été observée [ZAN 06]. La mauvaise irrigation de certaines zones du LCA ne permet pas l'apport des cellules nécessaires à une cicatrisation naturelle. C'est la raison pour laquelle un LCA lésé ne cicatrise jamais à la différence d'un tendon, qui lui, est mieux vascularisé.

4.1.4 Propriétés mécaniques

4.1.4.1 Propriétés macroscopiques

Les tissus conjonctifs et de manière générale les tissus collagéniques possèdent une anisotropie très élevée. Ils sont généralement caractérisés par une zone plus ou moins large de déformation sans élévation de la contrainte. Cette caractéristique est retrouvée pour l'ensemble des tissus comportant du collagène (peau, tendon, ligament, cavité interne du pénis [GEF 06]).

La courbe de traction du ligament obéit à cette règle et il est possible d'observer une première zone où la déformation augmente sans élévation de la contrainte. La figure 4.4 propose une illustration schématique de la courbe de traction obtenue pour un ligament.

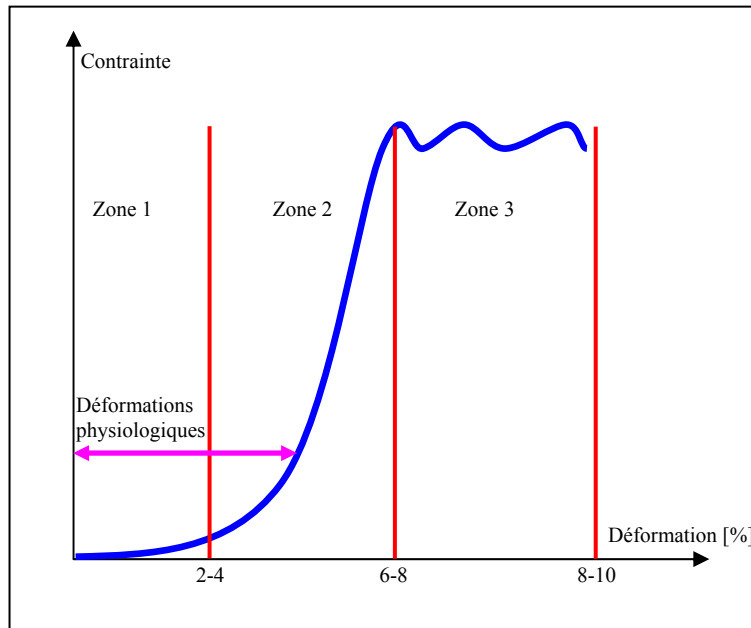


Figure 4.4 : Courbe de traction contrainte-déformation d'un ligament.

Cette courbe, appelée courbe en « J », peut-être divisée en trois zones principales. La première est une zone de déformation sans contrainte. Cette zone correspond à l'alignement des fibres et des fascicules de collagène. Celles-ci ont une morphologie ondulée, et lorsqu'on les étire, elles commencent à s'aligner sans subir d'effort. La zone 2 est caractérisée par une rapide augmentation de la contrainte. Après une zone transitoire, la contrainte évolue de façon linéaire avec la déformation. Les fibres et les fascicules du tissu sont presque tous alignés et participent à la réponse du ligament en réaction à sa déformation. Des micro-ruptures surviennent dans le tissu pour des déformations de l'ordre de 6-8%. Ce phénomène s'amplifie pour aboutir à la rupture totale du ligament vers 10% de déformation. La zone de déformation physiologique s'étend sur 4 à 5% de déformation. Dans cette zone, le ligament possède un comportement parfaitement élastique [GOH 03].

Les caractéristiques les plus considérées pour ces tissus sont la résistance à la rupture, le module d'élasticité (déterminé la plupart du temps comme étant la pente de la partie linéaire de la zone 2) et la raideur.

Woo et *al.* ont montré que pour des spécimens âgés de 22 à 35 ans, la force à la rupture est de 2 200 N et la raideur de 250 N.m^{-1} [WOO 91]. Ces valeurs tiennent compte des propriétés de l'articulation entière. En effet, les sites d'insertion dans le plateau tibial et le condyle fémoral sont aussi pris en compte dans la réponse mécanique. Le module d'élasticité est compris entre 50 et 100 MPa [YAN 01]. Le ligament croisé antérieur étant un tissu mou et de géométrie non

régulière, il est difficile de pouvoir calculer une aire de sa section proche de la réalité. Ainsi, le calcul de la contrainte (contrainte $S = F(t) / A(t)$) reste approximatif et ne reflète pas entièrement la réalité, d'autant plus que les efforts ne sont pas répartis de façon homogène dans le ligament.

Le ligament est un tissu mou, faisant preuve d'élasticité pour les faibles déformations et possédant une résistance à la traction très importante. Ces propriétés proviennent de la microstructure et de l'arrangement des fibres de collagène comme nous allons le voir dans le paragraphe suivant.

4.1.4.2 Propriétés microscopiques

4.1.4.2.1 Structure de la molécule de collagène

Silver et *al.* ont intensivement étudié la relation entre la structure de la molécule de collagène et ses propriétés mécaniques [SIL 03]. Ils ont montré que, dans l'assemblage des acides aminés ou de leur dérivés, certaines séquences sont plus importantes que d'autres. Par exemple, des régions ne comportant pas de proline et d'hydroxyproline sont capables de former des boucles internes conférant ainsi une plus grande flexibilité à la molécule. Ainsi, il est possible de considérer la molécule de collagène comme étant un composite où certaines régions sont très flexibles alors que d'autres régions riches en proline, glycine et hydroxyproline, sont plus rigides. Ces auteurs suggèrent que la variation de la flexibilité moléculaire affecte l'auto-assemblage des fibrilles et ainsi influe sur les propriétés mécaniques macroscopiques du ligament. Ils suggèrent aussi que l'élasticité, dont font preuve les tendons et les ligaments, provient de la présence de fibres de collagène de type III, cette molécule étant plus flexible que le collagène de type I [SIL 03].

Ainsi, l'élasticité des ligaments prend son origine dans la structure intra-moléculaire des molécules de collagène, mais aussi dans le type de collagène.

4.1.4.2.2 Arrangement spatial des fibrilles

A une échelle microscopique et non plus moléculaire, Provenzano et *al.* ont montré que contrairement à d'anciennes théories, les fibrilles de collagène ne sont pas discontinues [PRO 06]. Ceci rend caduque le concept de ponts chimiques, dus en grande partie aux protéoglycanes, entre les fibrilles. Ces mêmes auteurs avancent l'hypothèse que la transmission des efforts de fibrilles en fibrilles ne s'effectue pas par des ponts, mais par le biais de l'enchevêtrement des fibrilles.

La raison pour laquelle le ligament possède une élasticité pour les petites déformations provient de l'ondulation périodique des fibres et des sous-unités fasciculaires qui permettent une déformation sans élévation de la contrainte.

En résumé, le ligament est un tissu collagénique formé de molécules de collagène, qui en s'assemblant les unes aux autres, permet la construction d'une structure à multi-échelles partant du tropocollagène, passant par la formation de fibrilles et de fibres pour arriver à la création de faisceaux ligamentaires. L'origine des propriétés mécaniques de ce tissu se situe tant à l'échelle moléculaire, tant qu'aux échelles micro- et macroscopique, de par l'arrangement spatial des fibrilles et des fibres de collagène.

4.1.5 Pathologies et traitements

Dans le paragraphe 4.1.3.3 nous avons évoqué l'incapacité d'auto-cicatrisation du LCA. Ainsi lorsqu'il est gravement lésé ou bien rompu, il n'y a pas d'autres alternatives que l'intervention chirurgicale pour le reconstruire.

Les greffes du LCA peuvent être décomposées en deux groupes bien distincts. Le premier groupe, qui est historiquement le plus ancien, rassemble les greffes provenant de tissus biologiques. Le second groupe réunit les prothèses en matériaux synthétiques qui furent testées à partir des années 1980. Ce paragraphe se propose d'exposer les principaux types de greffes utilisés pour la reconstruction du ligament croisé antérieur. Avant cela, il convient de dire quelques mots sur les techniques chirurgicales.

D'une manière générale la reconstruction du LCA a fait un énorme progrès depuis la technique opératoire dite d'arthroscopie. Des « voies » arthroscopiques (généralement au nombre de 2, voies antéro-latérale et antéro-médiale) sont préparées en incisant sur quelques centimètres de long les tissus recouvrant l'articulation. Cette technique diminue le caractère traumatique et invasif de l'opération. Les cicatrices laissées par cette technique sont donc très petites (quelques centimètres) surtout en comparaison avec d'autres techniques qui peuvent laisser une cicatrice de plus de 30 cm [DES 87].

4.1.5.1 Greffes biologiques

4.1.5.1.1 Allogreffe

L'allogreffe du LCA, c'est-à-dire le prélèvement d'un LCA ou d'un tendon d'Achille sur un donneur, se heurte bien évidemment à la disponibilité des greffons. Ces tissus doivent subir des traitements de décellularisation et de stérilisation pour les rendre immunocompatibles.

Shino et *al.* ont montré que cette technique produit des résultats assez satisfaisants en termes des propriétés biomécaniques. Ces mêmes auteurs n'ont pas observé de rejet immunitaire après plus de 30 mois d'implantation chez l'homme [SHI 90].

4.1.5.1.2 Autogreffe

Les autogreffes reposent sur le principe de prélever au patient un ou plusieurs tissus collagéniques et de les réimplanter pour la reconstruction du LCA. Cette technique pose le problème des tissus à prélever, leur accessibilité, et la cicatrisation à l'endroit de prélèvement. La greffe de référence est le tiers du tendon patellaire (ou tendon rotulien). Ce tissu est prélevé avec une petite barre osseuse à chaque extrémité et fixé généralement en position anatomique du LCA [LAU 99]. Cette greffe donne de bons résultats et la pratique du sport peut être reprise après 5-6 mois. Cependant, elle occasionne fréquemment des douleurs et une certaine morbidité des tissus au niveau du site de prélèvement [KAR 01].

Il est possible de réaliser cette même opération en utilisant les tendons de la patte d'oie. Ces tendons (gracilis et semi-tendineux) relient la face interne de la cuisse (muscles droit interne et demi-tendineux) et le tibia. Ces muscles ne participant que peu à la stabilité du genou ou à la transmission du mouvement, le prélèvement des tendons ne présente pas de conséquences néfastes sur l'articulation. Les deux tendons sont pliés en deux, ligaturés et réimplantés en position anatomique du faisceau postéro-latéral pour le gracilis et en position anatomique du faisceau antéro-médial pour le semi-tendineux [BEL 03].

Certains chirurgiens utilisent aussi le *facia lata*, une membrane fibreuse se trouvant à la face externe de la cuisse. Cette opération a le désavantage de laisser une cicatrice de plusieurs centimètres à l'endroit du prélèvement contrairement aux autres techniques où le prélèvement se fait par arthroscopie.

Des études comparent ces différentes greffes autologues, chacune ayant ses avantages et ses limitations, il en ressort que la reconstruction utilisant les tendons de la patte d'oie semble être la méthode engendrant le moins de douleur et de problèmes post-opératoires.

Le succès de ces greffes est généralement dirigé par le taux de revascularisation du greffon [LAU 99] et par la résistance des points d'attache des tissus [FRA 97]. Frank et *al.*, dans une intéressante revue, rapporte que la cicatrisation des attaches des greffes est plus rapide et meilleure dans le cas de la greffe du tiers du tendon patellaire par comparaison aux autres types de greffes.

Comme nous venons de le voir, les greffes biologiques fonctionnent, dans leur ensemble, assez bien. Cependant, elles sont associées à des douleurs dans le cas des greffes autologues et

les chirurgiens sont confrontés au manque de donneurs dans le cas des greffes allogènes. Ainsi, durant les années 80, de nouvelles prothèses en matériaux synthétiques ont été développées pour surmonter les limitations rencontrées avec les greffes de tissus biologiques.

4.1.5.2 Greffes synthétiques

Les structures des greffes synthétiques sont essentiellement des tresses possédant des forces à rupture supérieures ou égales à 2 000 N. En fonction des fabricants, les structures possèdent des architectures plus ou moins complexes. Les matériaux utilisés pour la fabrication des prothèses sont des plastiques de consommation courante tels que le polyéthylène téréphtalate (PET) utilisé notamment dans la fabrication des bouteilles d'eau minérale, le polytétrafluoroéthylène (PTFE) plus connu sous le nom commercial de Gore-Tex[®], le polyéthylène ultra haute densité (UHMPE) servant à la fabrication des têtes et des cotyles des prothèses de hanche. Le polypropylène (PP) a été aussi employé dans l'élaboration des prothèses ligamentaires [OLS 88].

Ces prothèses donnent de bons résultats à court terme [GLO 88]. Glousman et *al.* ont montré la rapide récupération de la mobilité chez les patients qui ont subi une reconstruction employant une prothèse en Gore-Tex [GLO 88]. 3 mois après implantation, près de 80% des patients peuvent descendre et monter les escaliers. De plus, la sensation de douleur est atténuée pour l'ensemble des patients. Ces auteurs, ayant effectué une étude sur 24 mois, montrent que l'emploi de prothèses synthétiques permet une amélioration de la mobilité et du confort des patients en comparaison avec leurs performances pré-opératoires. Cependant, ils concluent qu'une étude à long terme est nécessaire pour confirmer les améliorations observées.

C'est un autre Groupe de recherche qui publie quelque temps après une étude sur 48 mois [PAU 92]. Ces auteurs révèlent un taux de succès de 44% pour ces greffes en Gore-Tex ce qui est faible comparé aux taux de réussite des prothèses biologiques se situant entre 75 et 85% [GLO 88]. Les prochains paragraphes s'attachent à expliquer les raisons de ces mauvais résultats à long terme.

4.1.5.2.1 Propriétés mécaniques

La résistance à la fatigue semble être le premier facteur du manque de réussite des greffes synthétiques. Paulos et *al.* ont publié que le taux de laxité de l'articulation classé comme inacceptable est de 34%. A ce pourcentage s'ajoute celui des patients ainsi subi une effusion (33% dont 32% ont subi une rupture partielle ou totale de la prothèse) [PAU 92]. Ces auteurs

concluent leur publication en insistant sur le fait que le nombre des ruptures de prothèses augmente encore depuis la fin de leur étude et que l'utilisation des prothèses en Gore-Tex pour la reconstruction de LCA est inappropriée.

Une autre étude, concernant 89 patients ayant subi une reconstruction avec différents types de prothèses qui ont dû être retirées, montre que la rupture des ligaments synthétiques s'initie dans les proches endroits des canaux tibiaux et fémoraux. Ces canaux sont nécessaires pour la fixation, à l'aide de vis, des prothèses. Durant le mouvement, la prothèse frotte sur l'os provoquant des dommages irréversibles [POD 94]. Dans cette étude, les particules engendrées par ce frottement n'ont pas été étudiées, elles jouent cependant un rôle important comme il est abordé dans le paragraphe suivant.

4.1.5.2.2 Abrasion et particules d'abrasion

L'abrasion conduit souvent à une chute irréversible des propriétés mécaniques des prothèses. Dans la plupart des cas, des fibres rompues engendrent une réaction d'inflammation plus ou moins importante [PAU 92] [MAR 95]. Olson et *al.* ont montré que des particules d'abrasion, injectées dans le genou du lapin provoque une inflammation et une infiltration de macrophages dans la cavité synoviale [OLS 88]. Ces mêmes auteurs ont prouvé que ces débris d'usure s'accumulent dans l'articulation et ne sont pas du tout éliminés. Nous pouvons ainsi conclure qu'à plus ou moins long terme ces prothèses, subissant de l'abrasion, conduisent à une réaction inflammatoire.

4.1.5.2.3 Pénétration tissulaire

Un autre inconvénient de ces prothèses est la mauvaise intégration cellulaire et tissulaire. Poddevin et *al.* ont observé qu'un tissu fibreux encapsule les prothèses [POD 94]. L'épaisseur et la quantité de tissu n'évoluant pas avec le temps d'implantation, il est raisonnable de penser qu'il empêche la pénétration tissulaire. Ces auteurs ont montré aussi que des fibres de collagène pénètrent uniquement les couches superficielles des prothèses.

Des résultats encourageants concernant des prothèses synthétiques en termes de pénétration tissulaire et limitation de la réaction inflammatoire, ont été récemment publiés. Trieb et *al.* ont montré que des cellules sont capables de pénétrer totalement des ligaments synthétiques en PET (LARS ligament) et d'encapsuler les fibres de la prothèse par une couche de tissu collagénique [TRI 04]. Ces auteurs estiment que l'encapsulation des fibres permet de limiter les réactions inflammatoires observées pour les autres types de prothèses. Cependant des résultats à plus long terme sont nécessaires pour pouvoir définitivement conclure sur le

caractère inerte de cette nouvelle génération de prothèses. Plus récemment, Pavon-Djavid et *al.* ont développé une technique de greffage de poly(styrène sodium sulfonate) sur des ligaments synthétiques permettant d'améliorer l'adhésion cellulaire [CIO 06] [PAV 07]. Ces auteurs ont montré que les fibroblastes sont très fortement adhérents sur ces structures et prolifèrent [PAV 07]. Ces résultats tendent à montrer que l'intégration biologique de ces prothèses synthétiques, peut être grandement améliorée.

En résumé, les différentes prothèses utilisées dans la reconstruction du LCA, qu'elles soient biologiques ou artificielles, présentent des avantages et des inconvénients. L'ingénierie tissulaire, tendant à développer des prothèses biologiques, semble pouvoir s'affranchir des problèmes rencontrés pour les anciennes générations de prothèses, en utilisant des matériaux intégrables par le corps ou bien biodégradables afin de ne plus provoquer de réaction inflammatoire importante. Bien que ce domaine soit en plein essor, il n'y a pas, à notre connaissance, d'essai clinique concluant. La fabrication des prothèses biologiques reste encore au niveau du laboratoire, et n'a pas franchi ce cap important que représente l'implantation humaine. Les prochains paragraphes présentent les différents scaffolds utilisés pour l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament.

4.2 Structures tridimensionnelles en ingénierie tissulaire du tendon et du ligament

Il existe plusieurs stratégies de fabrication de scaffold. La première stratégie utilise des matériaux d'origine naturelle alors que la seconde emploie des matériaux synthétiques dégradables à plus ou moins long terme.

4.2.1 Emploi de structures d'origine naturelle

4.2.1.1 Emploi de tissus collagéniques d'origine animale

Une des stratégies assez récente dans l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament consiste à utiliser des tissus collagéniques déjà formés et à les réimplanter. Concernant le LCA et le tendon d'Achille, ces études, bien que certaines soient déjà assez avancées sont encore au stade de recherche, et aucune étude clinique, à ma connaissance, n'a été effectuée.

Les tissus employés peuvent avoir différentes origines, ce sont soit des xéno greffes [MUS 04] [LIA 06] [ZAN 06b] soit des allogreffes [CAR 04]. D'une manière générale, l'utilisation d'une telle matrice extracellulaire présente des avantages conséquents puisqu'elle offre une structure où les fibres de collagène sont matures et possèdent donc des propriétés mécaniques suffisamment élevées pour résister aux contraintes physiologiques permettant ainsi une implantation immédiate. De plus, la structure de ces tissus est similaire à celle du tissu à reconstruire.

4.2.1.1.1 Xéno greffe

Il existe une pléthore de publications concernant l'utilisation de la paroi submucosale intestinale du porc (*Small Intestine Submucosa*, SIS). Ces scaffolds sont résorbés en peu de temps et ne présentent pas de réactions inflammatoires notables [ZAN 06b]. Zantop et *al.* ont montré que 2 semaines après implantation dans le tendon d'Achille, le scaffold ne peut plus être distingué du tissu en reconstruction. Aussi, l'infiltration de cellules dérivées de la moelle osseuse a été observée dans ces scaffolds. Zantop et *al.* rapportent que les tendons d'Achille reconstruits par un SIS n'ont pas subi de rupture pendant les 16 semaines d'implantation. Des résultats, à plus long terme (26 semaines) chez le lapin, étudiant le ligament médial collatéral ont confirmé ces observations [LIA 06]. Liang et *al.* ont aussi montré que la section des ligaments traités par un SIS est semblable à celle du tissu naturel (respectivement 5 et 4 mm²) alors que celle des ligaments lésés et non traités possède une valeur significativement plus importante (6 mm²). Cela prouve la rapide résorption du scaffold engendrant ainsi une inflammation

moindre. Les propriétés mécaniques des ligaments traités avec un SIS sont aussi supérieures à celles du ligament lésé et non traité. Le module tangent d'élasticité étant de 387 ± 100 MPa pour les ligaments traités et de 291 ± 100 MPa pour les non traités, cela démontre le plus rapide remodelage du néo-tissu lorsqu'il est traité par un SIS. Bien que la régénération tissulaire soit meilleure lorsqu'un scaffold SIS est implanté, le module d'élasticité reste tout de même presque 3 fois inférieur à celui d'un ligament sain. Il en est de même pour l'ensemble des propriétés mécaniques [MUS 04].

4.2.1.1.2 Allogreffe

Une autre stratégie utilise des tissus allogènes [CAR 04]ensemencés par des fibroblastes. Cette technique nécessite une décellularisation totale des tendons patellaires utilisés pour cette stratégie. La méthode mise au point par Cartmell et *al.* permet de conserver les propriétés mécaniques des tendons traités. En utilisant un détergent ionique (dodécyle sulfate de sodium) (SDS) ou bien un solvant organique (tri(*n*-butyl)phosphate) (TBP), ces auteurs ont montré que ce traitement permet au tendon de conserver sa force à rupture et sa raideur [CAR 04]. Les cellules sont ensemencées dans les tendons en les plaçant dans de petites incisions pratiquées le long du tissu. Même si les cellules ne sont pas réparties de façon homogène dans le tissu, une infiltration cellulaire a été observée dans une épaisseur allant de 7 à 70 μm après 14 jours de culture *in vitro*. La pénétration cellulaire est meilleure en utilisant le TBP. De même, bien que l'adhésion cellulaire initiale ne semble pas être affectée par le traitement de décellularisation, la prolifération, quant à elle, est quelque peu inhibée par le traitement au SDS. Cette technique permet néanmoins de développer des vecteurs cellulaires mécaniquement fonctionnels pour la reconstruction des ligaments ou des tendons. Malgré tout, des inconvénients, liés aux techniques d'extraction cellulaire, restent présents puisque toutes les cellules ne sont pas enlevées. Le rendement d'extraction se situe entre 70% pour le traitement au SDS et 90% pour celui au TBP. Ainsi, une réaction immunogène n'est pas à exclure lors de l'implantation.

4.2.1.1.3 Autogreffe, technique de la couche de cellules

Il existe une autre possibilité de développer des tissus autologues, c'est la stratégie des couches de cellules (*cell sheet*, en anglais). Cette stratégie se base sur la propension des cellules à s'auto-organiser en tissu par le développement de leur matrice extracellulaire permettant ainsi de s'affranchir de l'utilisation de matériaux synthétiques. Cette technique a

déjà été utilisée pour la reconstruction *in vitro* des vaisseaux [L'HE 06]. Une étude clinique a d'ailleurs récemment débuté.

Calve et *al.* ont développé des tissus semblables structurellement et mécaniquement à des tendons de rats âgés de 2 jours [CAL 04]. La technique de fabrication consiste à porter des cellules à confluence tout en stimulant fortement la synthèse de la matrice extracellulaire par l'ajout périodique d'acide L-ascorbique [GRE 05] ou bien d'acide L-ascorbique 2-phosphate [CAL 04] pour des doses variant entre 50 et 100 $\mu\text{g.mL}^{-1}$. Une fois que les cellules sont à confluence, elles continuent à produire de la matrice extracellulaire formant ainsi une couche cohérente et mécaniquement manipulable. Calve et *al.* ont montré la faisabilité de cette technique et relatent que durant leurs essais ils ont été capables de produire des tissus avec un taux de succès de 60% [CAL 04]. L'acide ascorbique joue un rôle très important dans la stabilité de la matrice naturelle sécrétée puisque la formation de fibrilles de collagène de type I dépend de l'inclusion de cette molécule. Durant tout le temps de la culture, il est nécessaire d'ajouter régulièrement cette espèce dans le milieu de culture. Le tissu formé par cette technique est composé de fibres collagéniques disposées de façon aléatoire. Grenier et *al.* ont réussi, grâce à un stretching mécanique des couches de cellules, à organiser la matrice extracellulaire en un réseau de fibres alignées [GRE 05]. La résistance mécanique des couches « alignées » et « aléatoires » a été testée montrant une meilleure résistance à la traction des premières.

La technique des couches de cellules présente de nombreux intérêts, puisqu'elle s'affranchit de l'emploi de matériaux synthétiques pour l'élaboration des prothèses. Ici, la matrice extracellulaire joue elle-même le rôle de scaffold, permettant d'obtenir bien évidemment une très bonne interaction cellule/scaffold. L'inconvénient majeur de cette technique vient des faibles propriétés mécaniques des tissus fabriqués. La contrainte de rupture des tissus « alignés » est de 3 à 4 MPa [GRE 05], ce qui est 10 fois inférieur à celle du tendon de la queue du rat (42 MPa) [CAL 04].

4.2.1.2 Emploi de collagène

L'emploi de collagène sous différentes formes, gels [YOU 98] [AWA 03] [NÖT 05], fibres [DUN 95], ou les deux [GEN 03] [GEN 06], est assez populaire dans l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament, puisqu'il est un composant majoritaire de ces tissus (cf. paragraphe 4.1.2). Aussi, l'affinité cellule/scaffold est grande pour ces structures.

4.2.1.2.1 Gel de collagène

La formation des gels de collagène permet d'encapsuler les cellules, l'ensemencement est ainsi parfaitement contrôlé.

La figure 4.5 présente la morphologie d'un gel de collagène déshydraté. Il faut bien sûr garder à l'esprit que cet hydrogel forme une structure tridimensionnelle.



Figure 4.5 : Morphologie d'un gel de collagène. Avec l'autorisation de N. Tran, Ecole de Chirurgie, Faculté de Médecine de Nancy.

Les gels de collagène sont composés d'une multitude de fibres possédant un diamètre de 100 à 200 nm et étant orientées de façon aléatoire.

Young et *al.* ont utilisé ce type de gel pour vérifier si l'apport de cellules mésenchymateuses permet une meilleure cicatrisation et régénération du tendon d'Achille du lapin [YOU 98]. En implantant un gel ensemencé par 4 millions de cellules, ces auteurs ont montré que les tendons traités par les gels de collagène présentent une morphologie plus proche du tissu natif que les tendons lésés n'ayant pas subi de traitement. Les cellules, insérées dans les tendons traités, possèdent une forme plus allongée et de manière générale, le tissu régénéré est plus organisé après 4 semaines d'implantation. Les propriétés mécaniques des tendons traités sont supérieures à celles des tendons ayant subi une lésion puis une cicatrisation naturelle sans apport de cellules [YOU 98]. Ce même Groupe de recherche a évalué l'impact, sur les propriétés mécaniques et sur l'organisation de la matrice extracellulaire, du nombre de cellules souches qui est apporté au niveau de la lésion en utilisant différentes densités d'ensemencement cellulaire des gels [AWA 03]. Ces auteurs ont confirmé les résultats

montrant le bienfait de l'apport des cellules souches sur les propriétés des tendons régénérés. Bien que les propriétés mécaniques, comme le module d'élasticité et la force à rupture aient tendance à augmenter avec la densité cellulaire, aucune différence significative n'a pu être observée. Il semble qu'un ensemencement de 3-4 millions de cellules souches soit une valeur optimale en termes de temps de culture et de disponibilité des cellules.

Une autre utilisation des gels de collagène, outre celle d'être un vecteur cellulaire, a été développée par Nöth et *al.* qui utilisent un gel élastique de collagène de type I afin de former *in vitro* un tissu organisé [NÖT 05]. Ces auteurs ont encapsulé des cellules souches humaines dans le gel et ont fixé des attaches osseuses à chaque extrémité du scaffold permettant, après 10 jours de culture en conditions statiques, d'obtenir un composite auquel il est possible d'appliquer de l'étirement cyclique. En réponse à cette stimulation, les fibres de collagène sont orientées dans le sens de la déformation et les cellules incluses dans le gel adoptent une forme allongée. D'un point de vue biochimique, le stretching augmente le niveau d'expression des gènes des collagènes des types I et III, de la fibronectine, et de l'élastine, composants de la matrice extracellulaire du tendon et du ligament.

Le principal inconvénient de ces structures est la faible résistance à traction (de l'ordre du newton). De plus, la contraction du gel, due à l'action des cellules, ne permet pas de fabriquer des scaffolds aux dimensions fixes et de façon reproductible.

D'autres auteurs ont essayé d'augmenter les propriétés mécaniques des scaffolds en collagène en élaborant des fibres collagéniques alignées.

4.2.1.2.2 Fibres de collagène et composite fibres/gel

Dunn et *al.* ont fabriqué, par extrusion, des fibres de collagène de type I possédant un diamètre de 50 à 70 μm [DUN 95]. Ces fibres alignées forment une structure analogue à celle du ligament, bien que les fibres de collagène dans ce dernier possèdent des diamètres beaucoup plus petits. Ces auteurs ont ensemencé les scaffolds par des fibroblastes provenant du LCA et du tendon patellaire. Ces cellules ont fait preuve d'une bonne adhésion et ont proliféré. De même, la synthèse collagénique est supérieure pour les cellules dans les scaffolds de collagène que pour les cellules cultivées dans des puits de culture. Une fois implantés les scaffolds sont toujours viables.

Gentleman et *al.* ont combiné l'emploi de fibres et de gel de collagène pour développer des scaffolds imitant les propriétés mécaniques des ligaments et dont la structure interne permet une réorganisation tissulaire [GEN 03] [GEN 06]. Ces auteurs ont montré que la présence de cellules, cultivées *in vitro*, dans les scaffolds n'affecte pas leurs propriétés mécaniques. Ils ont

toutefois mis en évidence la réorganisation tissulaire qui a lieu dans les scaffolds après 20 jours de culture *in vitro*. La résistance à la traction de ces scaffolds reste tout de même bien inférieure à celle des ligaments natifs.

4.2.1.3 Emploi de polysaccharides

Certains travaux traitent de la fabrication de scaffolds en polysaccharides tels que l'alginate [MAJ 05], le chitosan [FUN 05] [MAJ 05] et l'acide hyaluronique [CRI 05] [FUN 05]. Ces auteurs utilisent différents procédés de mise en forme afin d'élaborer des fibres de polysaccharides puis de les orienter les unes par rapport aux autres selon différents angles comme le présente la figure 4.6.

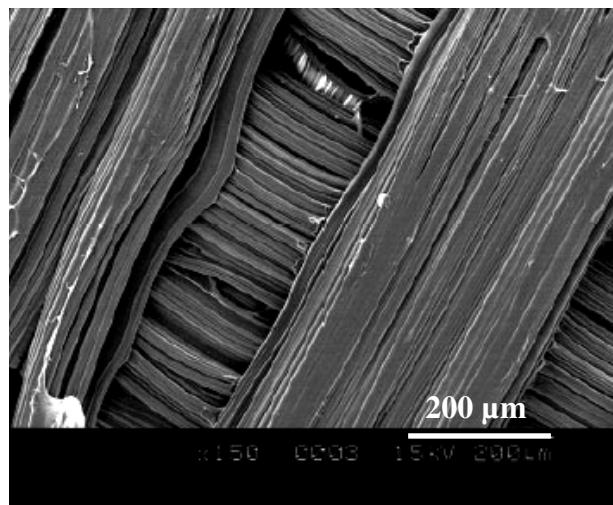


Figure 4.6 : Morphologie des scaffolds fibreux en polysaccharides. Tiré de [FUN 05].

Ces structures permettent un ensemencement cellulaire facile et une prolifération cellulaire est observée. Funakoshi et *al.* ont montré qu'après 28 jours de culture *in vitro*, des fibroblastes patellaires du lapin continuent à proliférer [FUN 05]. Cristino et *al.* ont observé un pic de prolifération après seulement 4 jours de culture [CRI 05]. Les propriétés mécaniques des structures en chitosan/acide hyaluronique et chitosan/alginate ont été évaluées. Bien que la courbe de déformation/contrainte soit similaire à celle du tendon et du ligament, les performances mécaniques chutent très rapidement. La résistance à la traction pour le scaffold chitosan/acide hyaluronique passe de 200 à 50 MPa en l'espace de 2 h pour rester, cependant, constant pendant 28 jours. L'emploi de ces polymères naturels présente l'avantage de pouvoir ajuster les performances mécaniques des scaffolds. Cependant demeurent les risques de contamination bactériologique associés à l'emploi des polysaccharides issus d'une extraction végétale [COS 07].

L'utilisation de matériaux synthétiques permet elle aussi d'ajuster les propriétés mécaniques sans risquer ou tout du moins en limitant les risques de contamination bactériologique.

4.2.2 Emploi de structures d'origine synthétique

Les matériaux employés dans la fabrication de scaffolds pour l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament sont assez nombreux, comme par exemple la soie en raison de sa grande résistance à la traction. Certains polymères comme le poly(uréthane urée), ou le polyuréthane (PU) ont aussi été utilisés [GIS 02] [LEE 05] et la plupart des travaux utilise la gamme des polyesters aliphatiques.

Comme nous venons de le voir dans les parties précédentes, les scaffolds développés pour la reconstruction du ligament tendent à imiter la structure du tissu natif.

Nous distinguerons, dans ce qui suit, les scaffolds tressés et les scaffolds tissés. Avant d'aborder directement cette présentation, nous souhaiterions relater la récente étude effectuée par Cao et *al.*, qui, bien qu'employant des fibres, ne fait pas partie des scaffolds tressés ou bien tissés [CAO 06]. En utilisant des fibres de PGA aléatoirement orientées, ces auteurs ontensemencé des fibroblastes de culture primaire dans ces scaffolds et ont cultivé un néo-tendon *in vitro*. Les scaffolds sont soumis à une force constante pendant la durée de la culture, (10 semaines) et ces auteurs ont observé que le PGA s'est totalement dégradé et qu'un néo-tissu s'est formé. Ce dernier possède une structure intéressante puisque les fibres de la matrice extracellulaire, produites par les cellules, sont alignées. Aucune rupture des néo-tendons n'a été observée montrant ainsi qu'il est possible d'améliorer la résistance à la traction d'un agrégat cellulaire.

4.2.2.1 Scaffolds tressés

Les scaffolds tressés peuvent prendre différentes formes. Nous pouvons les trouver sous forme de corde ou bien de structures possédant une architecture plus complexe comme le présente la figure 4.7.

Les matériaux utilisés pour ces applications sont la soie [ALT 03] ou bien les polyesters aliphatiques tels le PGA, le PLLA et leurs copolymères [COO 05].

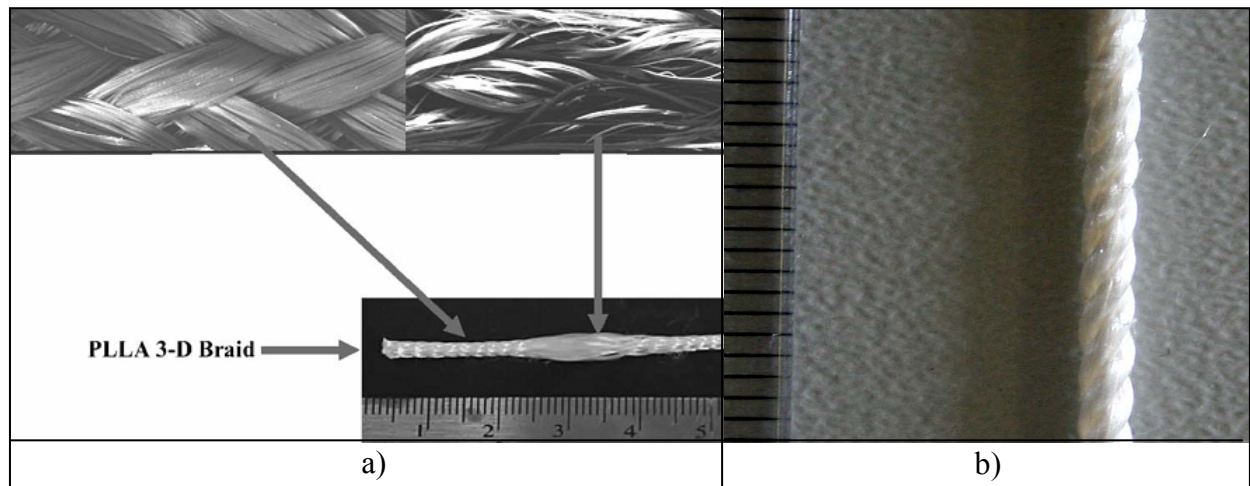


Figure 4.7 : Exemple de structures tressées pour la reconstruction du LCA.
 a) architecture complexe, tiré de [LAU 05], b) tressage en corde, LEMTA.

Ces scaffolds tressés possèdent des propriétés mécaniques similaires à celles du LCA avec des forces à rupture de plus de 2000 N [ALT 02b] ce qui les rend hautement attractifs. La soie est classée comme un biomatériau non dégradabile ce qui peut permettre une culture dans un bioréacteur à long terme. *In vivo* la soie subit une dégradation de type protéolytique engendrée par la réponse du corps à la présence d'un corps étranger. La durée de dégradation de la soie est estimée à environ 1 an, elle perd ensuite son intégrité mécanique. La dégradation totale est estimée à 2 ans [ALT 03]. Les scaffolds en soie développés par le Groupe de Altman, sont constitués par un assemblage de cordes comme nous pouvons l'observer dans la figure 4.7 b). Les tests biologiques réalisés sur ces scaffolds ont montré que les cellules adhèrent et prolifèrent [ALT 02b]. Aussi, la synthèse de collagène des types I et III semble être stimulée. Le désavantage majeur de ce type de structure vient de la faible pénétration cellulaire dans le scaffold. Altman et *al.* ont observé que les cellules forment une couche recouvrant l'extérieur du scaffold [ALT 02b], mais ne pénètrent pas à l'intérieur. La principale raison de ce phénomène provient de la petite taille des pores (10 μm) formés par l'entrelacement des fibres de soie, qui semble empêcher la migration cellulaire vers le centre de la structure.

Cooper et *al.* ont développé des scaffolds tressés possédant 3 zones organisées différemment [COO 05]. En changeant l'angle de tressage il est possible de fabriquer des scaffolds avec une zone dense à chaque extrémité pour les fixations tibiales et fémorales, et où l'angle de tressage est de 31° permettant la formation des pores petits (80 μm). La zone centrale appelée zone ligamentaire est tressée avec un angle plus petit (26°) pour obtenir une partie plus poreuse possédant des pores plus grands (136 μm). Ces auteurs émettent l'hypothèse d'une

meilleure pénétration cellulaire dans la zone la plus poreuse. Le principal problème de ce type de scaffold vient de la forme de la courbe de traction qui possède une zone de déformation sans augmentation de la contrainte de moins de 1% de déformation (elle est de 5-8% pour le LCA).

Il est donc difficile d'allier à la fois propriétés mécaniques et scaffolds permettant la pénétration tissulaire.

4.2.2.2 Scaffolds tissés

Les scaffolds tissés ont été intensivement étudiés par le Groupe de recherche James Goh à Singapour. Ce Groupe a développé des structures tricotées qui présentent des propriétés mécaniques semblables à celles du ligament, puisque ces scaffolds possèdent une courbe de traction en «J». Les matériaux utilisés pour la mise en forme de ces scaffolds sont généralement des bobines de fil de suture en polyesters aliphatiques (PLGA, PLLA, PGA) ou en soie. La figure 4.8 présente la morphologie des scaffolds tissés obtenus par cette équipe.

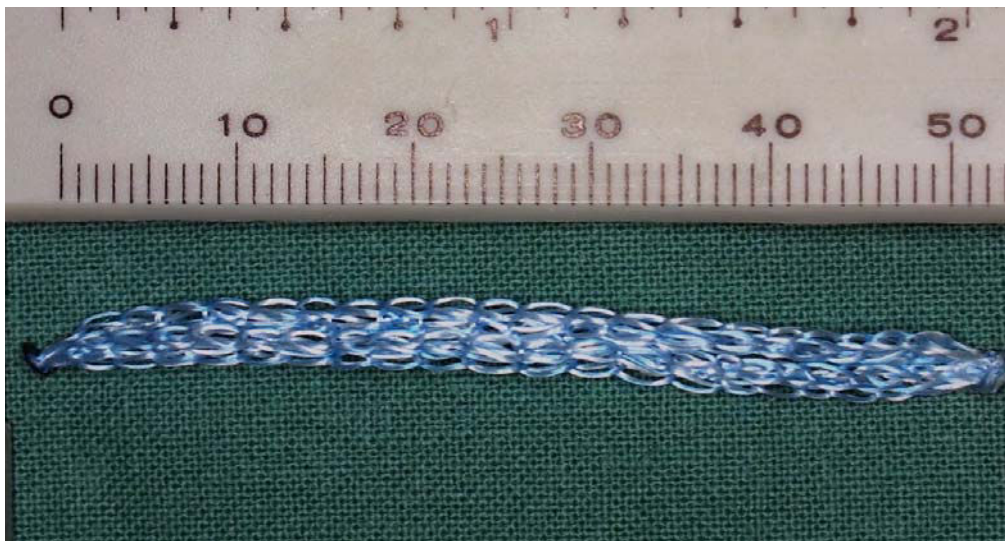


Figure 4.8 : Morphologie des scaffolds tissés. Groupe de J. Goh, Singapour.

Ces structures sont hautement poreuses, permettant ainsi la pénétration cellulaire et tissulaire. Ouyang et *al.* ont implanté ces scaffolds de PLGA au niveau du tendon d'Achille du lapin et ont montré la complète colonisation du scaffold après quelques semaines d'implantation [OUY 03]. En ensemençant les structures avec des cellules souches, ces auteurs ont confirmé les résultats montrant que la régénération tissulaire est plus rapide et de meilleure qualité lorsque la prothèse sert aussi de vecteur cellulaire.

Les scaffolds tissés ont aussi été utilisés dans une culture *in vitro* afin de développer la matrice extracellulaire afin de renforcer les propriétés mécaniques avant une éventuelle implantation [OUY 05] [SAH 06]. L'ensemencement cellulaire de ce type de scaffold est l'un des points clés de la réussite de la culture. Etant très poreux, ces scaffolds ne peuvent être ensemencés par les techniques classiques de sédimentation. Différentes stratégies ont été développées pour résoudre ce problème technique. Ouyang et *al.* ont encapsulé les cellules dans une colle chirurgicale de fibrine avant de l'incorporer dans la structure tissée [OUY 03] et d'implanter le tout dans le tendon d'Achille du lapin. Ces mêmes auteurs ont, quelque temps plus tard, élaboré une méthode utilisant la technique des couches de cellules (cf. paragraphe 4.2.1.1.3) [OUY 05]. Après avoir porté à confluence des cellules et stimulé, par de l'acide ascorbique, la production de la matrice extracellulaire, il est possible de détacher le tissu et de le disposer sur un scaffold tissé. Cette technique permet d'avoir un scaffold où les cellules ont déjà développé leur matrice extracellulaire ; cependant, il n'est pas possible de contrôler la densité d'ensemencement.

Sahoo et *al.* ont déposé, par *electrospinning*, des nanofibres de PLGA sur les structures tissées formant ainsi un tapis où les cellules peuvent être ensemencées par sédimentation sans passer au travers [SAH 06].

D'autres Groupes de recherche ont utilisé des polymères naturels tels que le collagène pour recouvrir d'un tapis de microfibrilles l'espace entre les mailles [CHE 03] [CHE 05].

Pour résumer cette partie, nous avons exposé les différents scaffolds utilisés pour l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament. Parmi toutes ces techniques, nous nous sommes orientés vers celle du tissage pour des raisons que nous allons expliquer.

Les structures tissées représentent un groupe de scaffold qui peut être employé dans l'ingénierie tissulaire du ligament et du tendon. Ces structures sont flexibles et possèdent des propriétés mécaniques intéressantes puisque similaires, par la courbe de traction en J, à celles du ligament natif. Le tissage et le tricotage sont des procédés tout à fait maîtrisés. Je me suis donc orienté vers l'étude de ces structures. De façon similaire à l'équipe de James Goh à Singapour, notre équipe a développé des tissés biodégradables en employant des fils de suture de PLGA d'une part et en soie d'autre part, ce matériau ayant une dégradation plus lente comme nous venons de le voir. Dans une première partie, je décrirai le procédé de fabrication des scaffolds et l'étude de leurs propriétés physiques. J'exposerai ensuite le développement de 2 types de scaffolds composites, l'un utilisant un polymère naturel, l'alginate et l'autre composite tissé/microfibres, utilisant *l'electrospinning* pour déposer des microfibres de polyester sur les structures tissées

4.3 Propriétés des scaffolds tissés

Il convient d'explicitier le procédé de fabrication. Ensuite je présenterai les propriétés mécaniques des scaffolds en PLGA et en soie et l'étude de la dégradation des scaffolds en PLGA.

4.3.1 Matériels et méthodes

4.3.1.1 Fil de suture

Deux matériaux différents ont été employés dans la fabrication des structures tissées :

- Vicryl 4-0, fil de suture résorbable violet en PLGA (90/10), Ligapak, bobine de 250 cm, réf. JV1204, Ethicon
- Mersilk 4-0, soie noire, Ligapak, bobine de 250 cm, réf. F4204, Ethicon

4.3.1.2 Protocole de tissage

Il y a plusieurs points importants à vérifier lors du tissage comme la taille du fil donc de la maille, la tension du fil en amont et en aval de la structure, la disposition des aiguilles, leur ouverture, etc. Les fils de suture sont noués entre eux afin d'obtenir une longueur suffisante pour le tissage des structures. Généralement, deux fils suffisent pour la fabrication d'un scaffold de 6 mailles de large et de 15 rangs de long.

En fonction du diamètre du fil, il convient de régler la taille des mailles (de 1 à 9, par ordre croissant des diamètres). Pour les fils de suture 4-0, on fixe la taille des mailles à 1 (valeur minimale). Le nombre d'aiguilles, c'est-à-dire le nombre de mailles de la structure tissée est

ensuite défini. Il est fixé à 6 mailles pour les évaluations de ce paragraphe. Par contre, pour le développement des composites tissés/microfibres le nombre de mailles est de 12 ce qui correspond à la largeur du tambour rotatif pour l'*electrospinning*.

La figure 4.9 présente la machine de tricotage (Silver-reed ZK 270, Suzhou, Chine) qui a été employée pour la fabrication des structures.

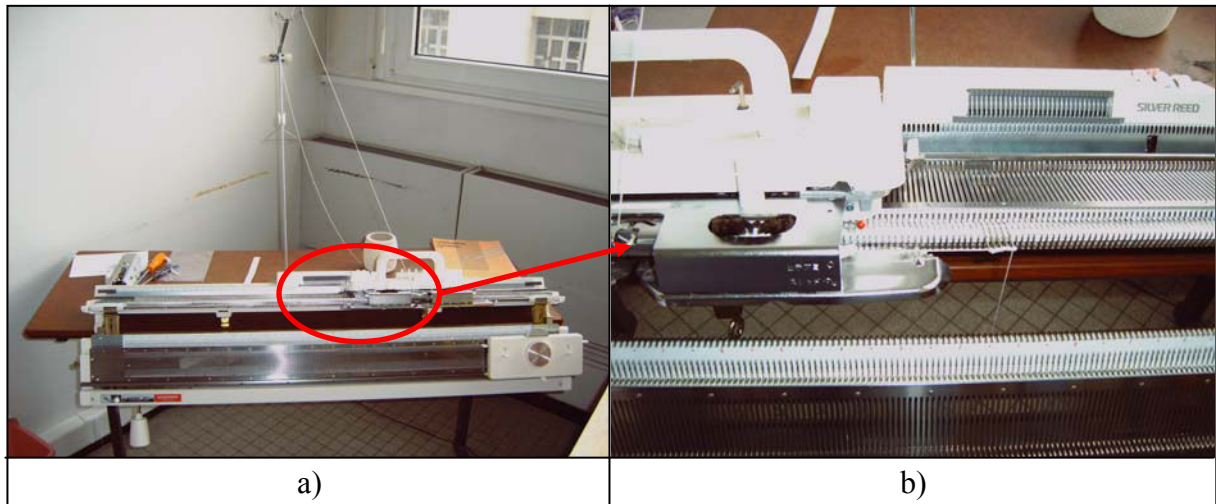


Figure 4.9 : Machine de tricotage du laboratoire. a) vue d'ensemble, b) détail du chariot et des aiguilles.

Il serait quelque peu fastidieux d'expliquer en détail les différentes étapes de fabrication des tissés. Aussi, le lecteur peut les parcourir dans l'annexe I. En résumé, il suffit de passer le fil de suture dans le chariot et de le faire circuler de droite à gauche puis de gauche à droite. Un aller-retour forme un rang. La « fermeture » de la structure s'effectue en passant les mailles les unes dans les autres et en faisant un double nœud à la dernière maille.

Pour les besoins de l'évaluation mécanique, des scaffolds en anneau de 30 rangs et 6 mailles ont été réalisés en accrochant le 1^{er} rang avec le 30^{ème} et en fermant le scaffold comme décrit ci-dessus.

4.3.1.3 Evaluation morphologique

4.3.1.3.1 Fils de suture

La morphologie des fils de suture a été évaluée par microscopie électronique à balayage. Un diamètre moyen a été calculé à partir de ces observations.

4.3.1.3.2 Scaffolds tissés

La morphologie des scaffolds tissés a été déterminée par microscopie optique (loupe binoculaire).

4.3.1.4 Evaluation mécanique

L'évaluation mécanique a été effectuée en utilisant une machine de traction Adamel-Lhomargy D.Y. 22 (500 daN), MTS France. Pour tous les tests, une pré-tension de 2 N a été appliquée avant de procéder aux essais.

4.3.1.4.1 Rappels de mécanique

➤ La déformation

La déformation ε est le logarithme népérien de la longueur instantanée (l_t) de l'échantillon divisée par sa longueur initiale l_0 (formule (4.1)) :

$$\varepsilon = \ln\left(\frac{l_t}{l_0}\right) * 100 \quad (4.1)$$

Nous avons choisi de l'exprimer en pourcentage.

➤ La contrainte

La contrainte S est la force divisée par la surface de la section de l'échantillon. On peut distinguer deux types de contrainte, la contrainte rationnelle où la force instantanée (F_t) est divisée par la section à l'instant « t » et la contrainte conventionnelle où la force est divisée par la section initiale (A_0). Dans notre étude, nous employons la contrainte conventionnelle selon la formule (4.2.) :

$$S = \frac{F_t}{A_0} \quad (4.2)$$

➤ Propriétés mécaniques

Nous avons déterminé les propriétés classiques des matériaux, à savoir : le module d'élasticité (E), la contrainte (S_{\max}) et la déformation (ε_{\max}) maximale.

➤ La relaxation

La relaxation consiste à étirer un échantillon jusqu'à une déformation donnée. On mesure ensuite la variation de la force en fonction du temps. Cette variation est due à des réorganisations internes visant à minimiser l'énergie interne. C'est le phénomène de relaxation.

➤ Calcul des temps de relaxation

Le calcul des temps de relaxation a été effectué en utilisant le modèle de Prony permettant de déterminer les τ_i , temps caractéristiques de la relaxation. Celui-ci modélise la décroissance de la force en fonction du temps par une somme pondérée d'exponentielles négatives comme le montre la formule (4.3) :

$$F(t) = \sum_{i=0}^3 a_i e^{-\frac{t}{\tau_i}} \quad (4.3)$$

Aussi dans les courbes expérimentales, $F(t)$ est calculée en fonction de la force instantanée (F_t), de la force à t_0 de la relaxation (F_0) et la force de l'état relaxé ($F_{relaxée}$) selon la formule (4.4) :

$$F(t) = \frac{F_t - F_{relaxée}}{F_0 - F_{relaxée}} \quad (4.4)$$

$F(t)$ varie donc entre 1 ($F_t = F_0$, début de la relaxation) et 0 ($F_0 = F_{relaxée}$, état relaxé). Nous obtenons donc une courbe normée par la contrainte relaxée. Ce choix est délibéré et permet de s'affranchir de l'imprécision du calcul de τ_3 lorsqu'on considère une courbe non-normée.

Dans notre étude, nous avons décidé de nous limiter à 3 temps caractéristiques de relaxation (τ_1, τ_2, τ_3). Ce qui correspond à un modèle possédant 6 paramètres puisqu'il faut déterminer les coefficients devant les exponentielles. La résolution numérique de ce modèle s'est effectuée en utilisant la fonction « solveur » dans le tableur Excel et en fixant la somme des coefficients a_i étant égale à 1.

4.3.1.4.2 Suture Vicryl

➤ Fils de suture

Le comportement mécanique des fils de suture en Vicryl a été caractérisé par des essais de traction à différentes vitesses d'étirement (10, 30, 50 et 100 mm.min⁻¹). La sensibilité du capteur de force ne permet pas de mesurer la réponse d'un seul fil, nous avons donc développé un système de 40 mm de longueur composé de 11 fils alignés les uns par rapport aux autres. L'alignement des fils est obtenu en collant une extrémité du fil le long d'une ligne de papier millimétré. Le fil est alors tendu et l'autre extrémité est collée, cette opération est répétée 10 fois.

L'impact du niveau de déformation sur la relaxation (1, 10 et 15% de déformation) a été également étudié. 5 échantillons ont été testés pour les essais de traction et 3 autres pour les essais de relaxation dans un bain thermostaté à 37°C. La figure 4.10 présente un essai typique de relaxation. Entre chaque relaxation, une décharge jusqu'à force nulle est effectuée.

Les trois premiers temps de relaxation ont été calculés selon la modélisation de Prony. De même, les valeurs caractéristiques du comportement en traction ont été déterminées à partir des courbes de traction.

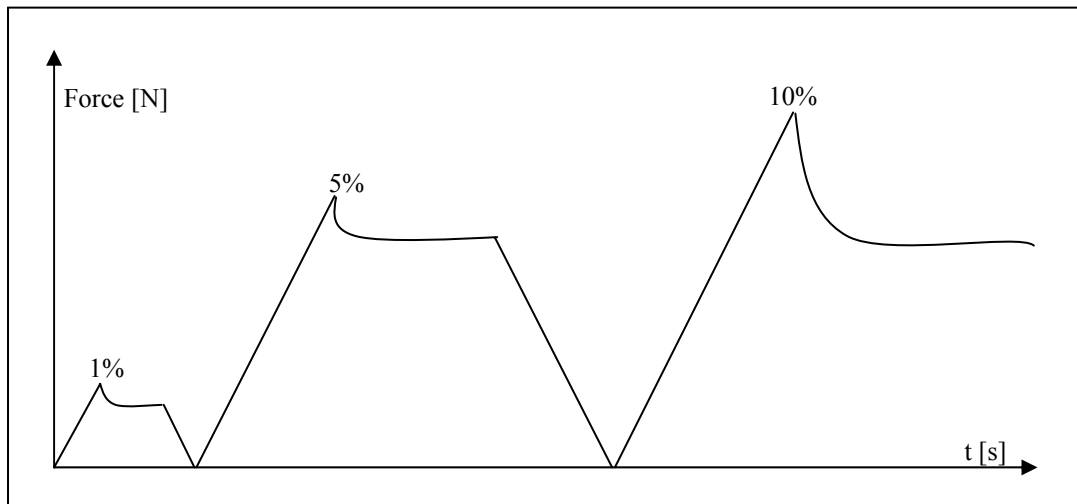


Figure 4.10 : Histoire de l'essai de relaxation.

➤ Structures tissées

Nous avons suivi le même protocole pour la caractérisation des structures tissées. Cependant, pour ces expériences, des mors cylindriques ont été usinés comme le montre la figure 4.11.

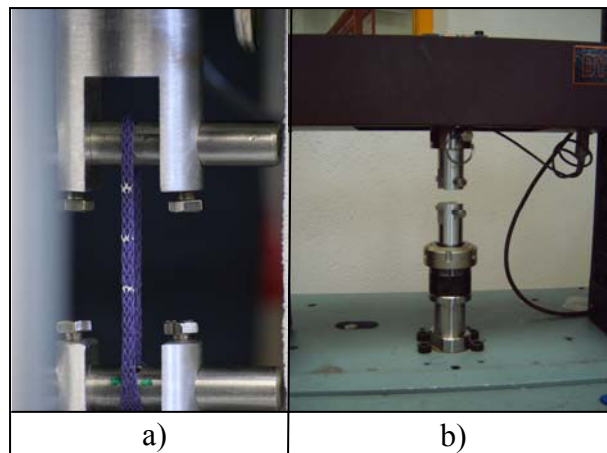


Figure 4.11 : Mors de traction cylindrique.

L'utilisation de mors classiques auto-serrants n'est pas possible pour les structures tissées puisque cela engendre des concentrations de contrainte en sortie du système de préhension.

Aussi, nous avons opté pour l'emploi de scaffolds en anneau qui s'insèrent dans ces mors cylindriques permettant ainsi le déplacement latéral des mailles et abaissant la concentration des contraintes à cet endroit de la structure.

Nous avons déterminé l'impact des vitesses d'étirement (30, 50 et 100 mm.min⁻¹) sur le comportement à traction et en relaxation. De même, l'influence des niveaux de déformation (10%, 15%, 20%) sur la relaxation a été étudiée (pour chaque paramètre, 5 échantillons ont été utilisés). Les plus faibles déformations n'ont pas été testées en raison de la faible sensibilité du capteur.

4.3.1.4.3 Suture Mersilk

- Fils de suture

La morphologie des fils de suture a été caractérisée par microscopie électronique.

- Tissés en soie

Le protocole de caractérisation mécanique des tissés en soie est le même que celui des tissés Vicryl, seul le système de préhension des scaffolds a été modifié. Les scaffolds sont enveloppés dans un papier et l'extrémité de la structure est collée avec de la colle forte à prise rapide, le tout est placé en sandwich dans un morceau de papier de verre qu'on place finalement dans un mors auto-serrant (en haut) et dans un mors constitué de deux plaques parallèles serrées à l'aide de 4 vis M3. Les essais ont été effectués dans un bain thermostaté à 37°C (figure 4.12).



Figure 4.12 : Système de préhension des scaffolds tissés Mersilk.

Les vitesses d'étirement diffèrent d'avec le protocole précédent puisque nous utilisons des vitesses de 10, 100 et 500 mm.min⁻¹. Les propriétés mécaniques sont déterminées de la même manière que pour les tissés Vicryl.

4.3.1.5 Dégradation des scaffolds Vicryl

Le but de cette étude est de caractériser le comportement des scaffolds pendant la dégradation et d'évaluer le temps nécessaire pour la perte des propriétés mécaniques. La culture *in vitro* des structures peut, à terme, s'étendre sur quelques mois, et il est nécessaire de s'intéresser à l'évolution des propriétés mécaniques pendant la dégradation. Plusieurs paramètres ont été mesurés sur 49 jours tels que l'évolution de la masse molaire, la perte de masse des structures, l'évolution du pH, les propriétés mécaniques en traction et la morphologie des fibres.

4.3.1.5.1 Protocole expérimental

➤ Milieu de dégradation

- Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM), Gibco, France.
- Pénicilline (100 U.mL⁻¹) Gibco, France.
- Streptomycine (100 µg.mL⁻¹), Gibco, France.
- Fungizone (2,5 µg.mL⁻¹), Gibco, France.

➤ Préparation des scaffolds

Des tissés Vicryl de largeur 6 mailles et de 15 rangs de longueur ont été employés pour cette étude. Les scaffolds sont nettoyés dans de l'éthanol à 75% et séchés sous vide pendant 12 h. Ils sont ensuite pesés sur une balance de précision.

Avant de placer les scaffolds dans du milieu de culture afin d'évaluer la dégradation, ils sont immergés pendant 30 min dans de l'alcool puis subissent une irradiation UV de 30 min pour les stériliser. Chaque scaffold est ensuite plongé dans un tube stérile de 15 mL contenant 5 mL de milieu DMEM-F12, et placé à 37°C. Le milieu de dégradation est changé une fois par semaine.

4.3.1.5.2 Evolution de la masse molaire

Le PLGA est un polymère difficilement soluble dans les solvants organiques classiques, ainsi il n'a pas été possible d'accéder directement à la masse molaire du polymère. Nous avons donc effectué des mesures de la viscosité intrinsèque du polymère qui permet de remonter à la masse molaire grâce à l'équation de Mark-Hoivink :

$$\eta = K * M_v^\alpha \quad (4.5)$$

Des solutions de PLGA à 2 g.L⁻¹ dans de l'hexafluoroisopropanol (HFIP) ont été préparées (n = 3 pour chaque semaine). Un rhéomètre capillaire a été employé afin de mesurer le temps

d'écoulement des solutions. Avant chaque expérience, le temps d'écoulement du solvant servant de référence, a été évalué en utilisant 3 mL d'HFIP.

La viscosité intrinsèque a été calculée selon la formule (4.6) :

$$\eta_i = \frac{1}{C} \ln\left(\frac{t_s}{t_0}\right) \quad (4.6)$$

C, est la concentration de la solution de polymère

t_s , est le temps d'écoulement de la solution de polymère

t_0 , est le temps d'écoulement du solvant

Pour chaque échantillon, quatre mesures ont été effectuées pour obtenir une moyenne du temps d'écoulement de la solution. La concentration des solutions a été vérifiée en prélevant 1 mL de solution et en le pesant. Après évaporation du solvant, la masse de polymère est mesurée et il est possible de remonter à la concentration de la solution. Pour tous les échantillons, la concentration est de 2 g.L⁻¹.

4.3.1.5.3 Evolution du pH

Le pH du milieu de dégradation a été mesuré chaque semaine pour 5 échantillons.

4.3.1.5.4 Perte de masse

Chaque scaffold a été pesé individuellement pour évaluer sa perte de masse au cours du temps. Le scaffold est prélevé et rincé à l'eau distillée puis à l'alcool, il est séché sous vide pendant 12 h puis pesé. 6 échantillons sont analysés chaque semaine.

4.3.1.5.5 Evolution des propriétés mécaniques en traction

Une fois que les scaffolds ont été lavés, séchés et pesés, un essai de traction uniaxiale est effectué à 37°C. La vitesse d'étirement est de 10 mm.min⁻¹. Les mors utilisés sont ceux présentés dans le paragraphe 4.3.1.4.3 pour les tissés en soie. 5 échantillons par mesure sont testés. Le module d'élasticité, la contrainte et la déformation maximale sont déterminés.

4.3.1.5.6 Morphologie des scaffolds dégradés

La morphologie des scaffolds (2 par semaine) au cours du temps de dégradation a été observée par microscopie électronique à balayage. Les scaffolds, une fois rincés et séchés, subissent un coating d'or-palladium préalablement à l'observation.

4.3.1.5.7 Statistiques

Un test de Student a été employé pour déterminer les différences significatives entre les mesures ($p < 0,05$).

4.3.2 Résultats

4.3.2.1 Evaluation morphologique

La figure 4.13 présente la morphologie des fils de suture Mersilk et Vicryl.

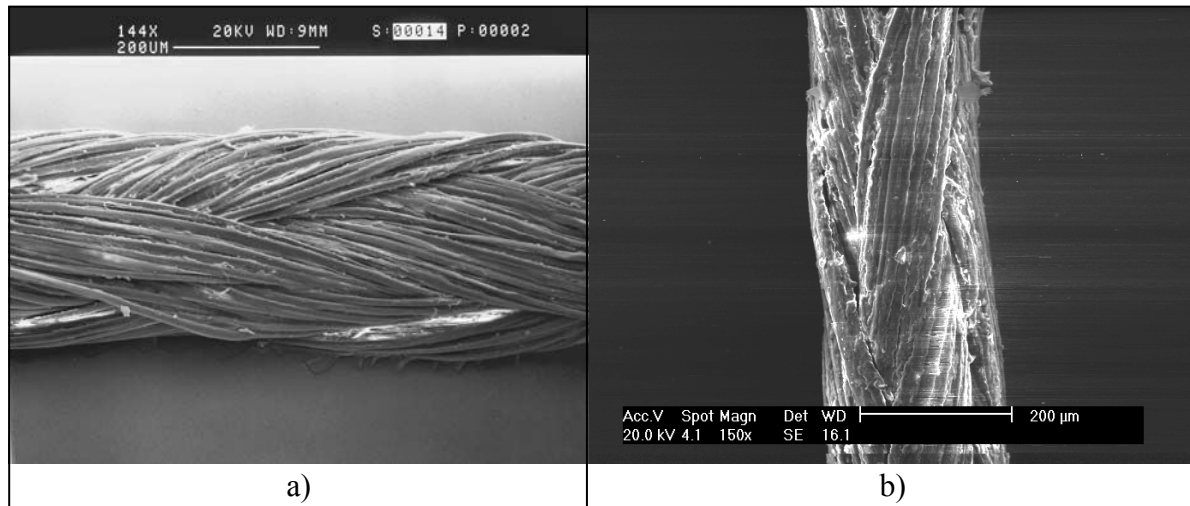


Figure 4.13 : Morphologie des fils de suture. a) Mersilk 4-0, b) Vicryl 4-0.

Les deux types de fil sont des tresses de nombreux filaments dont le diamètre mesure environ 10-15 μm . En première approximation, on peut considérer ces fils comme ayant une géométrie cylindrique de diamètre de 225 μm pour le Vicryl et de 290 μm pour le fil en soie.

La figure 4.14 montre la morphologie des structures tissées. Celle-ci est similaire pour la soie et le Vicryl. Les scaffold tissés sont des structures dont les mailles mesurent environ 1 mm de large, et possédant une porosité élevée. La mesure exacte de la porosité n'a pas pu être effectuée pour des raisons techniques. En effet, ce scaffold n'ayant pas une géométrie triviale, il est presque impossible de calculer son volume et donc sa porosité comme il a été fait pour les mousses dans la partie 2. Les scaffolds tissés ont naturellement tendance à s'enrouler sur eux-mêmes formant ainsi une structure tridimensionnelle. La porosité de ces scaffolds est une porosité ouverte et interconnectée puisque tous les pores sont reliés entre eux.

Bien que la machine à tricoter permette la fabrication de structures, possédant des mailles de différentes architectures, notre étude se limite à la caractérisation des scaffolds à mailles type jersey. Il est aussi possible de tricoter plusieurs fils en même temps afin d'augmenter les propriétés mécaniques (figure 4.14 b)).

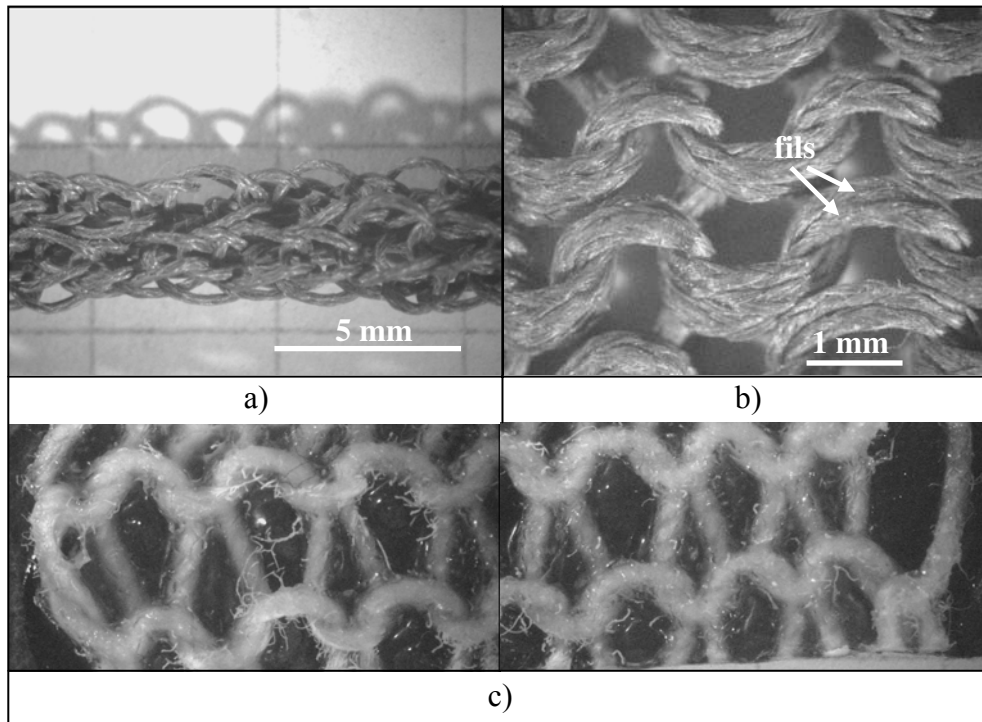


Figure 4.14 : Morphologie des scaffolds tissés. a) scaffold 1 fil, b) scaffold 2 fils, c) vue de la largeur du scaffold.

Il est important de remarquer que les bords des scaffolds sont formés par une maille torsadée (maille de gauche sur la figure 4.14 c)) d'un côté et d'un fil (maille de droite, figure 4.14 c)) reliant le rang inférieur au rang supérieur. Ces « motifs » se retrouvent alternativement et de façon tout à fait régulière aux extrémités du scaffold. Aussi, il est possible d'établir une relation générale entre le nombre de fils et le nombre de mailles formant la largeur de la structure.

$$N_{\text{fils}} = 2 * N_{\text{mailles}} + 1 \quad (4.7)$$

Ainsi, pour nos scaffolds à 6 mailles, nous avons 13 fils par largeur de section.

On peut considérer que chaque maille est constituée de deux poutres cylindriques quasiment verticales et d'une poutre cylindrique horizontale. En estimant que les poutres verticales subissent l'ensemble des efforts de traction, il est possible d'approximer la section du scaffold tissé comme étant un système de fils plus ou moins parallèles entre eux. Ceci permet, le calcul des propriétés mécaniques qui est abordé dans le paragraphe suivant.

En résumé, les structures tissées sont composées de fils (de 225 à 290 μm , respectivement pour le Vicryl 4-0 et le Mersilk 4-0) formant un réseau de mailles entrelacées d'environ 1 mm de largeur. Chaque maille peut être modélisée par des éléments verticaux et horizontaux. Les

tissés adoptent spontanément une configuration tridimensionnelle en s'enroulant sur eux-mêmes.

Ces scaffolds répondent à plusieurs critères du cahier des charges décrit dans la partie introductive. L'élément constituant ces scaffolds étant des fils de suture utilisés quotidiennement en chirurgie, ils devraient être biocompatibles (ce point est traité dans les paragraphes 4.4 et 4.5). Nous avons montré qu'ils sont hautement poreux et les pores sont largement interconnectés. Il convient désormais d'évaluer leurs propriétés mécaniques.

4.3.2.2 Evaluation mécanique

4.3.2.2.1 Suture Vicryl

La première étape de cette évaluation a été de caractériser le comportement en traction des fils de suture. Les valeurs obtenues au cours de ces expériences sont divisées par le nombre de fils (11) afin d'obtenir le comportement d'un seul fil. Nous présentons dans un premier temps le comportement en traction avant de décrire la relaxation des fils.

➤ Comportement en traction

La figure 4.15 présente les courbes représentatives des essais de traction en fonction des différentes vitesses d'étirement.

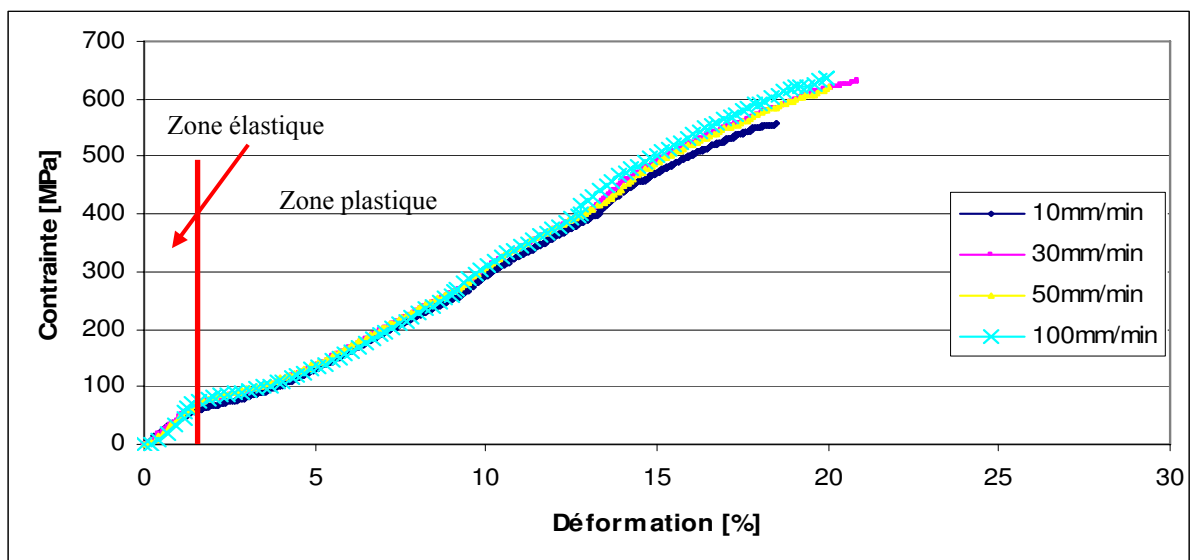


Figure 4.15 : Comportement en traction des fils Vicryl en fonction de la vitesse d'étirement.

La courbe de traction des fils peut se décomposer en deux parties distinctes, une zone de déformation élastique et une zone de déformation plastique. La zone de déformation élastique

s'échelonne de 0 à 1,5% de déformation. La contrainte évolue linéairement avec la déformation selon la loi de comportement $S = E \cdot \varepsilon$ où E est le module d'élasticité.

Dans cette gamme de déformation le fil de suture se comporte comme un solide Hookéen, c'est-à-dire purement élastique. La limite de la déformation élastique est de 1,5% et la contrainte élastique est de 70 MPa. Au dessus de cette contrainte et de cette déformation, le fil de suture se déforme de manière irréversible et se détériore.

La vitesse d'étirement n'a pas, semble-t-il, d'influence sur la réponse du fil. Ainsi dans une gamme de 10 à 100 mm.min⁻¹, la vitesse d'étirement n'influe pas sur le comportement en traction du fil puisque les courbes des différentes vitesses sont presque identiques.

Le module d'élasticité, la contrainte et la déformation maximale ont été calculés et le tableau 4-1 rassemble ces valeurs.

Tableau 4-1 : Propriétés mécaniques en traction des fils de suture Vicryl.

	Déformation max [%]	Contrainte max [MPa]	E [GPa]
10 mm/min	18,9 ± 0,9	532 ± 26	4 ± 0,2
30 mm/min	20,4 ± 0,5	623 ± 13	4,9 ± 0,1
50 mm/min	20,5 ± 1,2	591 ± 63	4,9 ± 0,4
100 mm/min	21,1 ± 1,2	639 ± 16	5,3 ± 0,1

La déformation maximale des fils se situe autour de 20% et la contrainte à rupture est d'environ 580 MPa. Le module d'élasticité varie quand à lui de 4 à 5,3 GPa en fonction de la vitesse de déformation. La vitesse d'étirement semble ne pas avoir d'impact sur les caractéristiques de la zone plastique. En revanche, elle influe sur le module d'élasticité, calculé dans la zone élastique, en rendant le scaffold plus rigide.

➤ Relaxation des fils Vicryl

La figure 4.16 présente l'impact du niveau de déformation pour la vitesse d'étirement de 10 mm.min⁻¹.

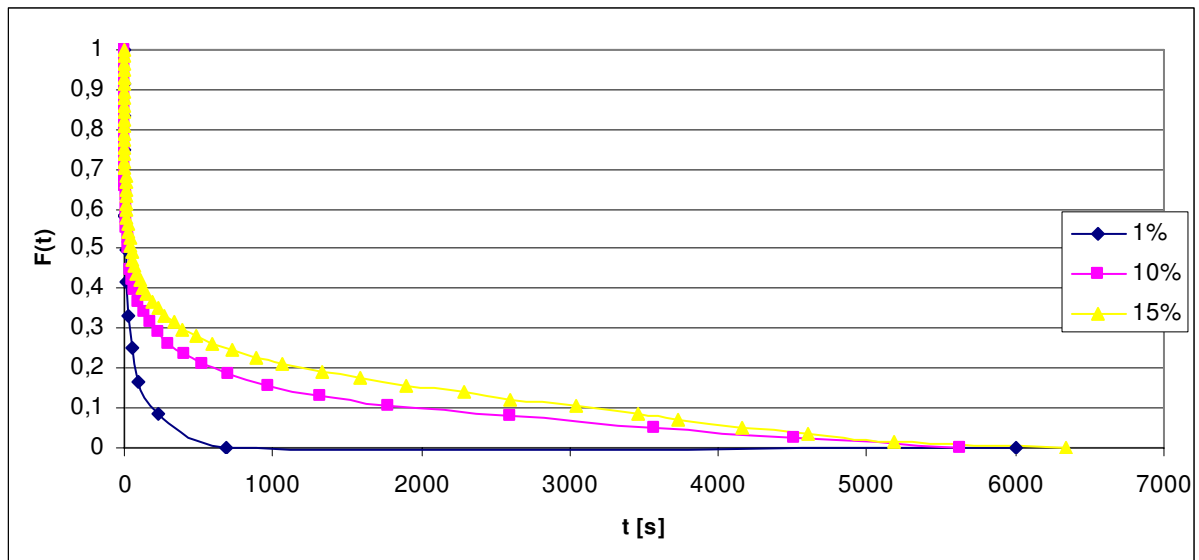


Figure 4.16 : Impact du niveau de pré-déformation sur la relaxation des fils Vicryl.

Lorsque les fils sont déformés à 1%, ils retournent plus rapidement à l'état relaxé que lorsqu'un essai de relaxation est effectué pour une déformation de la zone plastique (10% et 15%). Cette tendance est observable pour les autres vitesses. L'influence des vitesses d'étirement a aussi été caractérisée pour chaque niveau de déformation constituant ainsi une étude systématique. La figure 4.17 présente les courbes obtenues.

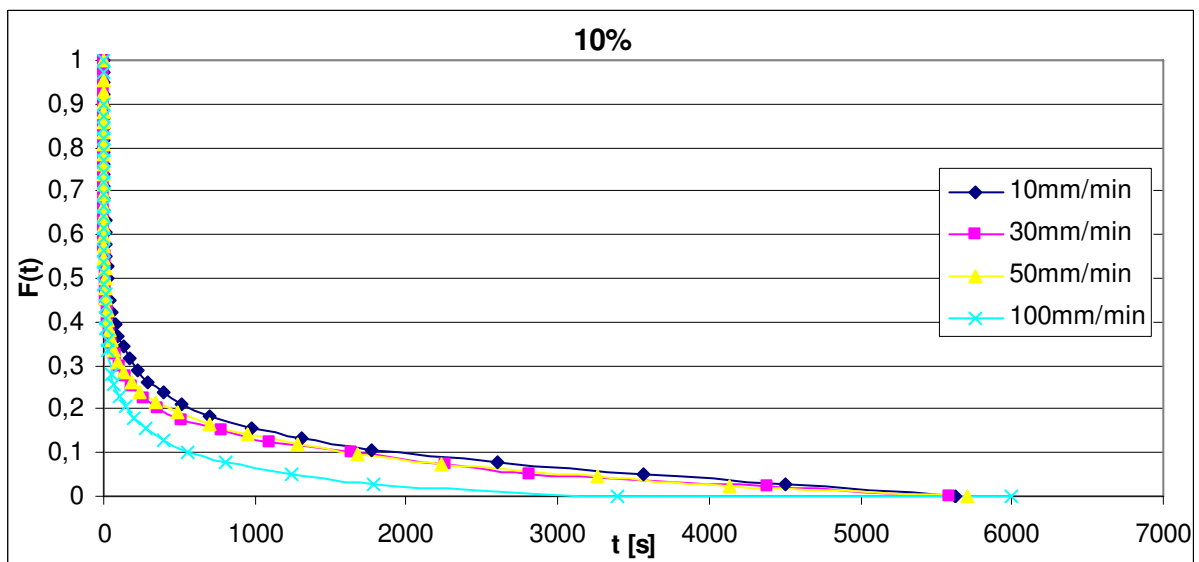


Figure 4.17 : Influence de la vitesse d'étirement sur la relaxation, 10% de déformation.

Pour la relaxation, la vitesse d'étirement a une influence non négligeable. Plus la vitesse est importante, plus les fils atteignent l'état relaxé rapidement.

Ces résultats sont corroborés par le calcul des temps de relaxation. Nous avons choisi le modèle de Prony décrit dans le paragraphe 4.3.1.4. Le calcul et l'ajustement des 6 paramètres

ont été effectués, en utilisant le logiciel Excel, en comparant les courbes théoriques et les courbes expérimentales. L'erreur moyenne pour l'ensemble des points de ces courbes est toujours inférieure à 5%. Le tableau 4-2 présente les temps de relaxation ainsi que les coefficients a_i pour chaque déformation et chaque vitesse d'étirement.

Considérons en premier lieu, l'impact de la déformation sur les temps de relaxation. En examinant le tableau 4-2, il est possible d'observer deux modes différents de relaxation. Lorsque la pré-déformation est de 1%, les fils retournent rapidement à l'état relaxé. Le 3^{ème} temps de relaxation, qui représente la durée de la relaxation, est de 600 s alors que pour les autres pré-déformations il est de plus de 2000 s. Cette tendance, bien que moins marquée, peut être aussi observée pour le 1^{er} et le 2^{ème} temps de relaxation. Ceci revient à dire que lorsqu'une relaxation est effectuée dans la zone élastique, le matériau revient plus rapidement à l'état relaxé.

Les coefficients a_i représentent le poids du temps de relaxation qui lui est associé. Il est important de noter que ces coefficients sont relativement constants pour les différentes pré-déformations et les différentes vitesses d'étirement. Les paramètres déterminés à partir du modèle de Prony sont rassemblés dans le tableau 4-2.

Tableau 4-2 : Temps de relaxation des fils de suture Vicryl 4-0 en fonction de la pré-déformation et de la vitesse d'étirement.

	t_{01} [s]	t_{02} [s]	t_{03} [s]	a_1 [N]	a_2 [N]	a_3 [N]
10 mm.min⁻¹						
1%	2,3 ± 0,2	54 ± 7	649 ± 51	0,44 ± 0,04	0,41 ± 0,02	0,15 ± 0,05
10%	3,2 ± 0,1	96 ± 16	2186 ± 101	0,42 ± 0,01	0,31 ± 0,05	0,26 ± 0,05
15%	3,2 ± 0,4	101 ± 23	2163 ± 63	0,39 ± 0,05	0,32 ± 0,02	0,28 ± 0,07
30 mm.min⁻¹						
1%	1,5 ± 0,3	39 ± 3	629 ± 75	0,39 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,26 ± 0,01
10%	1,6 ± 0,2	73 ± 17	2072 ± 79	0,46 ± 0,02	0,33 ± 0,02	0,21 ± 0,01
15%	1,5 ± 0,2	63 ± 12	1966 ± 41	0,41 ± 0,02	0,35 ± 0,01	0,25 ± 0,03
50 mm.min⁻¹						
1%	1,2 ± 0,1	40 ± 19	650 ± 173	0,47 ± 0,07	0,37 ± 0,04	0,16 ± 0,10
10%	1,1 ± 0,2	60 ± 22	1768 ± 107	0,46 ± 0,06	0,33 ± 0,01	0,21 ± 0,05
15%	1,1 ± 0,3	55 ± 24	1580 ± 104	0,43 ± 0,05	0,32 ± 0,02	0,24 ± 0,03
100 mm.min⁻¹						
1%	0,8 ± 0,4	35 ± 2	603 ± 120	0,43 ± 0,06	0,37 ± 0,01	0,20 ± 0,06
10%	0,7 ± 0,1	44 ± 6	1413 ± 329	0,47 ± 0,02	0,32 ± 0,01	0,21 ± 0,02
15%	0,9 ± 0,4	52 ± 6	1640 ± 85	0,43 ± 0,02	0,33 ± 0,01	0,24 ± 0,02

Considérons désormais l'influence de l'augmentation de la vitesse d'étirement quelle que soit la déformation. En étudiant les résultats vitesse par vitesse, nous observons une diminution de tous les temps de relaxation. Cette diminution est d'autant plus marquée pour les vitesses extrêmes (10 et 100 mm.min⁻¹) où le 1^{er} temps de relaxation passe de 3,2 à 0,9 s pour la pré-déformation de 15%.

En résumé, les fils de suture Vicryl possèdent un diamètre de 250 µm. Leur comportement mécanique a montré une zone de déformation élastique où le module d'élasticité est d'environ 5 GPa. La vitesse d'étirement n'influe pas de manière significative sur le comportement en traction. L'étude de la relaxation a montré que la pré-déformation joue un rôle important puisque la relaxation est plus rapide lorsque qu'elle est effectuée dans la zone élastique. De même, plus la vitesse d'étirement est grande, plus la relaxation est rapide. Ce résultat semble indiquer que les fils de suture Vicryl possèdent un comportement visco-élastique non-linéaire.

4.3.2.2 Tissé Vicryl

L'étude mécanique des tissés Vicryl suit le même schéma que celle des fils de suture, c'est-à-dire que nous décrivons en premier lieu le comportement en traction puis nous exposons les résultats obtenus concernant la relaxation des scaffolds.

➤ Comportement en traction

La figure 4.18 montre la courbe de traction obtenue pour un scaffold tissé.

Cette courbe peut se décomposer en trois zones similairement à la courbe de traction du ligament. La première zone de cette courbe en « J » est caractérisée par une déformation sans efforts du tissé. La plage de déformation pour laquelle cet effet est obtenu s'étale entre 0 et 10-12% de déformation. Cet effet correspond à l'alignement des fils de suture au sein des mailles du tissé.

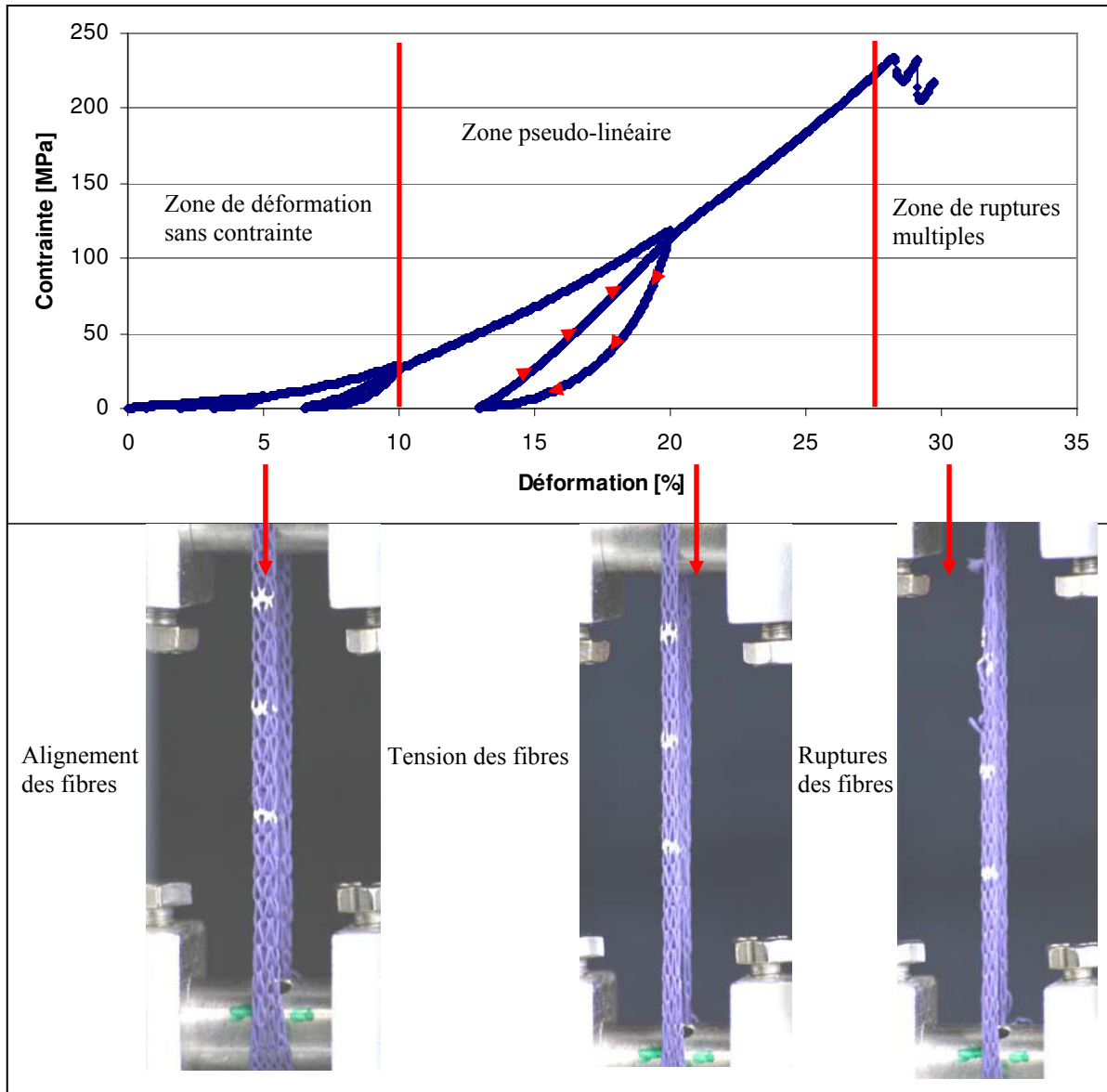


Figure 4.18 : Comportement en traction des tissés Vicryl.

Après leur alignement, les fibres sont mises sous tension et participent toutes à la réponse de la structure face à son étirement donnant ainsi une relation quasiment linéaire entre la déformation et la contrainte. Cette zone s'étend entre 12 et 25% de déformation. Ensuite, nous observons une zone de ruptures multiples. En effet, il semble que les fibres, subissant des efforts importants, rompent après 25% de déformation. Cependant, l'architecture des scaffolds tissés permet à la structure de subir encore un étirement supplémentaire. Il est fréquent d'observer, après une première rupture engendrant donc une chute de la valeur de la contrainte, une nouvelle augmentation de cette dernière avant qu'une nouvelle rupture survienne. Ce phénomène semble mettre en évidence une distribution hétérogène des efforts

au sein de la structure. Il semblerait aussi, que lorsqu'une fibre se rompt, les mailles des rangs inférieurs et supérieurs se détricotent jusqu'à ce que cette fibre se retrouve enserrée dans un nœud. La « propagation de la rupture » est alors empêchée et de nouveau la contrainte augmente. Il est possible de rapprocher ce comportement à celui des ligaments où pour des déformations supérieures à 10%, surviennent des microruptures des fibres de collagène avant la rupture totale du tissu.

Durant les essais de traction, des décharges ont été effectuées périodiquement. Il est ainsi possible d'observer une hystérèse entre la courbe de décharge et la courbe de charge. La charge ne suit donc pas la courbe de décharge (cf. figure 4.18), ce phénomène étant moins marqué pour les petites déformations. Il est important de remarquer que la pente de la charge augmente avec la déformation. Pour des déformations de 0 à 5%, la forme de la charge reste relativement similaire à la courbe en « J » ce qui signifie que pour une future utilisation dans un bioréacteur, le stretching des scaffolds doit être effectué dans une gamme de déformation de 0 à 5% afin de conserver la zone de déformation sans augmentation de la contrainte.

Nous avons déterminé le comportement en traction des scaffolds tissés en fonction de plusieurs vitesses d'étirement. La figure 4.19 montre les courbes obtenues pour des vitesses d'étirement de 10, 30, 50, 100 mm.min⁻¹.

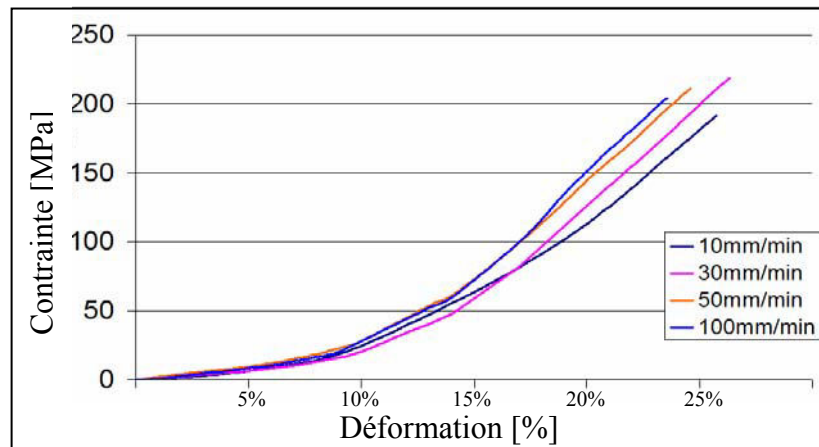


Figure 4.19 : Comportement en traction des tissés Vicryl en fonction des vitesses d'étirement.

Il n'y a pas donc d'influence notable de la vitesse d'étirement (dans la gamme 10-100 mm.min⁻¹) sur le comportement en traction des structures tissées Vicryl.

Les caractéristiques mécaniques des structures tissées sont données dans le tableau 4-3.

Tableau 4-3 : Propriétés mécaniques en traction des tissés Vicryl.

	Déformation max [%]	Contrainte max [MPa]	E [MPa]
Tissés Vicryl	29 ± 2	210 ± 34	750 ± 100

Les tissés Vicryl possèdent un module d'élasticité de 700 MPa (ce module a été calculé en fonction de la pente de la partie linéaire des courbes de traction). Aussi, ils peuvent se déformer jusqu'à 29% avant rupture ce qui est presque le triple comparé à un ligament.

➤ Relaxation

La relaxation des scaffolds tissés a été caractérisée pour différentes pré-déformations et différentes vitesses d'étirement. La figure 4.20 présente les courbes obtenues en fonction des différentes pré-déformations.

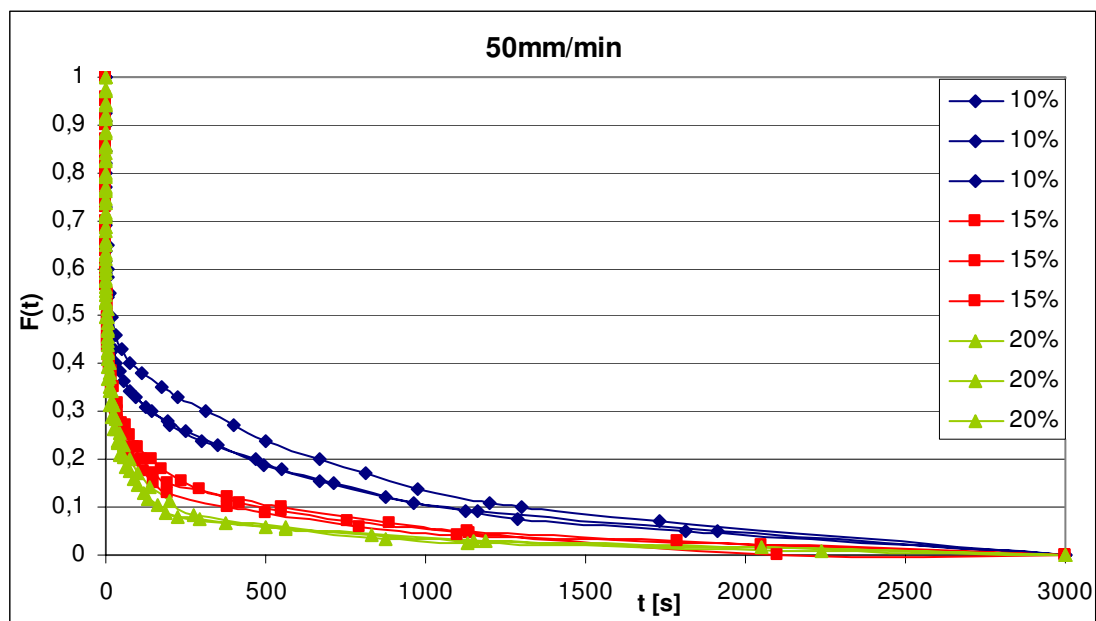


Figure 4.20 : Impact du niveau de pré-déformation sur la relaxation des tissés Vicryl.

La pré-déformation semble jouer un rôle sur la relaxation des tissés Vicryl. En effet, les pré-déformations les plus faibles provoquent un retour à l'état relaxé moins rapide. Pour les pré-déformations de 15 et 20% la relaxation est similaire, bien que la relaxation après une pré-déformation de 20% semble plus rapide.

De même l'influence des vitesses d'étirement a été étudiée pour des vitesses de 30, 50 et 100 mm.min⁻¹ comme le présente la figure 4.21.

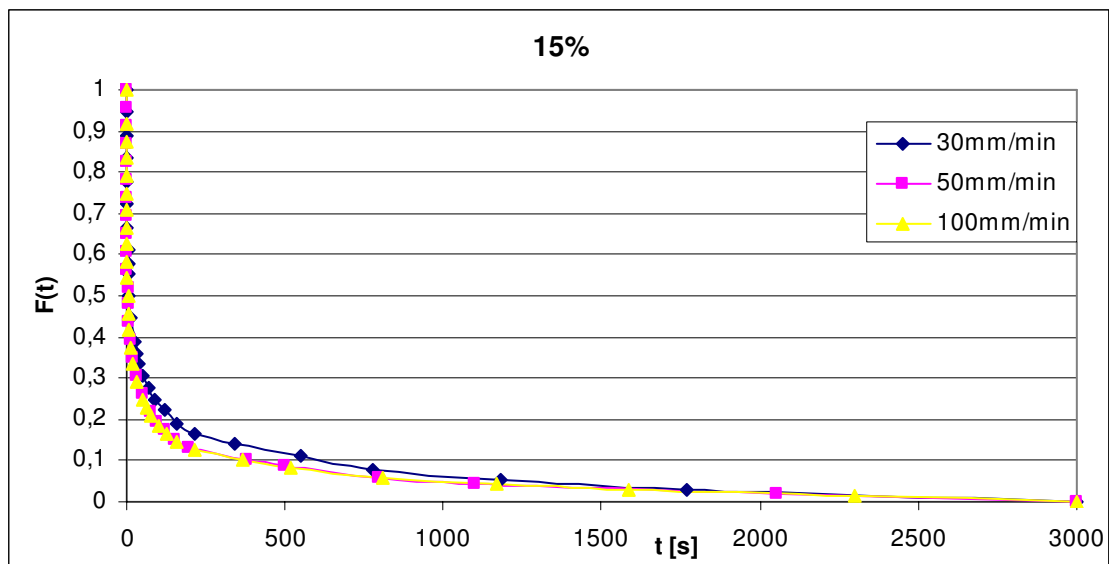


Figure 4.21 : Influence de la vitesse d'étirement sur la relaxation des tissus Vicryl pour une pré-déformation de 15%.

La vitesse d'étirement ne semble pas avoir d'impact sur la relaxation des tissus puisque les courbes de relaxation se superposent. Ceci est également observé pour les autres pré-déformations de 10 et 20%.

Le tableau 4-4 rassemble les différents temps de relaxation calculés par le modèle de Prony.

Tableau 4-4 : Temps de relaxation des tissus Vicryl 4-0 en fonction de la pré-déformation et de la vitesse d'étirement.

	t_{01} [s]	t_{02} [s]	t_{03} [s]	a_1 [N]	a_2 [N]	a_3 [N]
30mm.min⁻¹						
10%	1,5 ± 0,3	78 ± 4	1162 ± 75	0,46 ± 0,02	0,18 ± 0,04	0,36 ± 0,06
15%	1,8 ± 0,2	69 ± 2	1048 ± 54	0,51 ± 0,01	0,32 ± 0,04	0,16 ± 0,04
20%	1,8 ± 0,1	68 ± 5	898 ± 97	0,52 ± 0,02	0,34 ± 0,10	0,13 ± 0,02
50mm.min⁻¹						
10%	1,5 ± 0,4	60 ± 5	981 ± 69	0,46 ± 0,02	0,19 ± 0,03	0,34 ± 0,04
15%	1,2 ± 0,1	61 ± 13	951 ± 64	0,52 ± 0,01	0,31 ± 0,02	0,16 ± 0,01
20%	1,2 ± 0,1	55 ± 9	963 ± 34	0,56 ± 0,02	0,34 ± 0,01	0,10 ± 0,01
100mm.min⁻¹						
10%	0,7 ± 0,1	33 ± 2	997 ± 32	0,48 ± 0,01	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,03
15%	0,9 ± 0,1	59 ± 6	992 ± 16	0,55 ± 0,10	0,32 ± 0,02	0,14 ± 0,1
20%	0,9 ± 0,1	59 ± 6	1005 ± 22	0,58 ± 0,01	0,32 ± 0,01	0,10 ± 0,01

La pré-déformation n'a pas d'impact significatif sur les temps de relaxation contrairement à ce qui était attendu.

Les vitesses d'étirement ne semblaient pas avoir non plus, une influence particulière au regard des courbes de relaxation (figure 4.21). Cependant, le calcul des temps de relaxation a mis en évidence un effet non négligeable. En examinant ces données, nous pouvons observer une nette diminution du 1^{er} temps de relaxation. Ce 1^{er} temps de relaxation représente en quelque sorte la pente de la courbe pour t proche de 0. Ainsi, nous assistons à une relaxation plus rapide pendant les premières secondes de l'essai lorsque la vitesse d'étirement augmente. Le temps intermédiaire et le temps final de la relaxation ne varient que peu.

Dans ces expériences, les coefficients a_1 et a_2 , voient leur valeur augmenter en fonction de la pré-déformation appliquée et de la vitesse d'étirement. A l'opposé, le coefficient a_3 diminue en fonction de ces mêmes paramètres. Ceci signifie que les premiers temps de relaxation prennent de plus en plus de poids et que le dernier temps de relaxation perd de son importance. Ainsi, on peut conclure que les mécanismes rapides de relaxation sont prédominants lorsque la pré-déformation et la vitesse d'étirement sont augmentées.

En conclusion de cette partie, les scaffolds tissés Vicryl possèdent un comportement en traction qu'il est possible de décomposer en trois parties ; une première zone de déformation sans augmentation de la contrainte, une seconde zone où la contrainte varie linéairement avec la déformation et une dernière zone de ruptures multiples. Ce comportement se rapproche de celui des ligaments. Ces scaffolds ont un module d'élasticité de 700 MPa et une déformation et une contrainte maximale de 29% et de 210 MPa respectivement. Lors des essais de relaxation, nous avons montré que la pré-déformation n'a pas d'impact et que la vitesse d'étirement influe principalement sur le 1^{er} temps de relaxation. L'état relaxé des structures est atteint au bout de 1000 s.

4.3.2.2.3 Tissés en soie

L'évaluation des tissés en soie traite exclusivement du comportement en traction comme il est présenté ci-dessous.

La figure 4.22 montre les résultats obtenus pour plusieurs vitesses d'étirement.

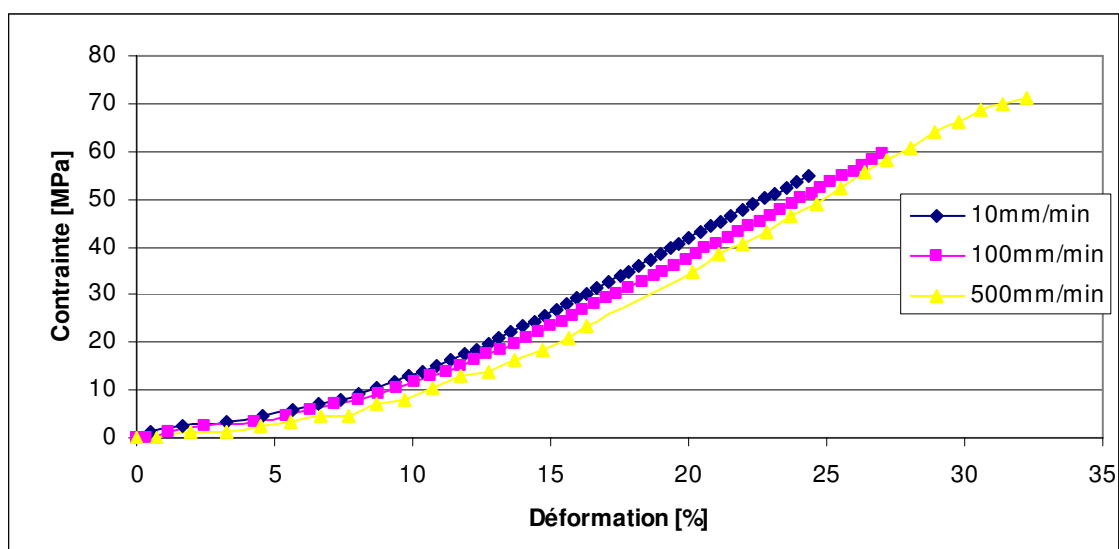


Figure 4.22 : Comportement en traction des tissés en soie en fonction de la vitesse d'étirement.

Les scaffolds en soie font preuve d'un comportement assez similaire, dans la forme de la courbe de traction, à celui du ligament. Nous pouvons observer, jusqu'à environ 5%, une zone de déformation sans augmentation de la contrainte. Survient ensuite un changement de régime et la contrainte évolue linéairement en fonction de la déformation. Pour ces scaffolds, aucune rupture partielle n'a été observée avant la rupture totale.

La figure 4.22 montre clairement que la vitesse d'étirement n'a pas d'influence sur le comportement en traction des scaffolds. Nous pouvons remarquer que la déformation à rupture a tendance à augmenter en fonction de la vitesse de déformation. Cette observation est corroborée par les valeurs des propriétés mécaniques classiques reportées dans le tableau 4-5.

Tableau 4-5 : Propriétés mécaniques en traction des tissés en soie.

	Déformation [%]	Contrainte [MPa]	E [Mpa]
10 mm.min ⁻¹	24,3 ± 2,9	54 ± 4	318 ± 62
100 mm.min ⁻¹	28,0 ± 4,1	55 ± 18	307 ± 14
500 mm.min ⁻¹	31,9 ± 1,8	68 ± 4	308 ± 35

Les scaffolds en soie possèdent des propriétés mécaniques relativement faibles puisque la contrainte à rupture est de l'ordre de 50 MPa et leur module d'élasticité est centré sur 300 MPa, elles sont néanmoins stables dans le temps puisque la soie n'est pas assujettie à la dégradation par hydrolyse.

4.3.2.3 Dégradation des tissés Vicryl

La dégradation des structures tissées a été étudiée sur 8 semaines consécutives en analysant la variation de la viscosité intrinsèque du polymère, le pH du milieu de dégradation, la perte de masse des structures ainsi que la variation des propriétés mécaniques.

Abordons tout d'abord l'étude de la viscosité intrinsèque qui est une mesure indirecte de la masse molaire du polymère.

4.3.2.3.1 Viscosité intrinsèque

La viscosité intrinsèque a été mesurée en utilisant des solutions à 2 dL.g^{-1} . La figure 4.23 présente les résultats de ces mesures.

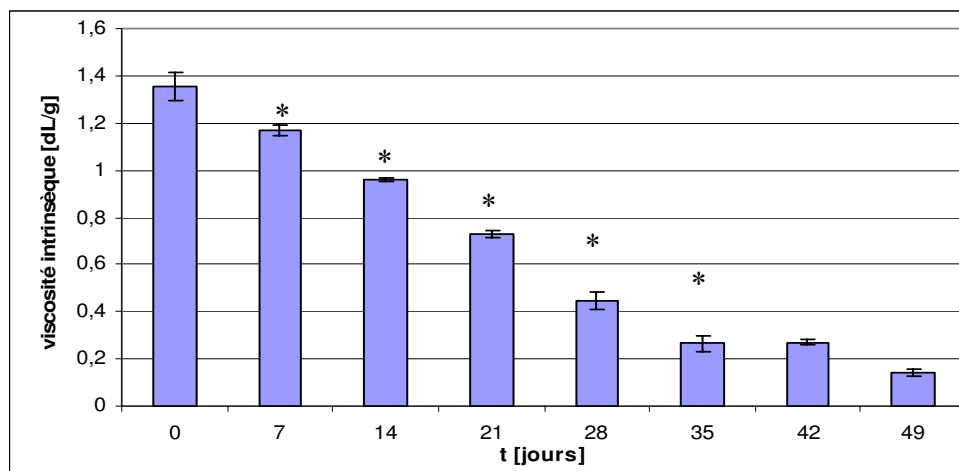


Figure 4.23 : Evolution de la viscosité intrinsèque en fonction du temps. Les étoiles représentent les différences significatives en comparant chaque mesure avec la précédente.

Le polymère non dégradé possède une viscosité intrinsèque de $1,3 \text{ dL.g}^{-1}$, valeur qui diminue progressivement pour atteindre $0,3 \text{ dL.g}^{-1}$ après 35 jours d'immersion dans le milieu de dégradation. A partir du 35^{ème} jour, la viscosité reste quasiment constante correspondant vraisemblablement à la limite de détection de l'appareil. Ainsi, la masse molaire du PLGA, composant les scaffolds, décroît elle aussi au cours du temps. En calculant les rapports des viscosités avec la mesure précédente, il est possible d'estimer grossièrement un taux de dégradation pour chaque semaine. Ce rapport jusqu'à J21 est quasiment constant et égal à 0,8. Ceci signifie que d'une mesure à l'autre la viscosité est environ 80% de la mesure de la semaine précédente. A partir de J28, ce taux chute à 0,4 caractérisant ainsi une accélération de la dégradation. Nous pouvons en conclure une augmentation de la vitesse de scission des chaînes de polyesters.

4.3.2.3.2 Evolution du pH

La figure 4.24 montre l'évolution du pH du milieu de dégradation en fonction du temps.

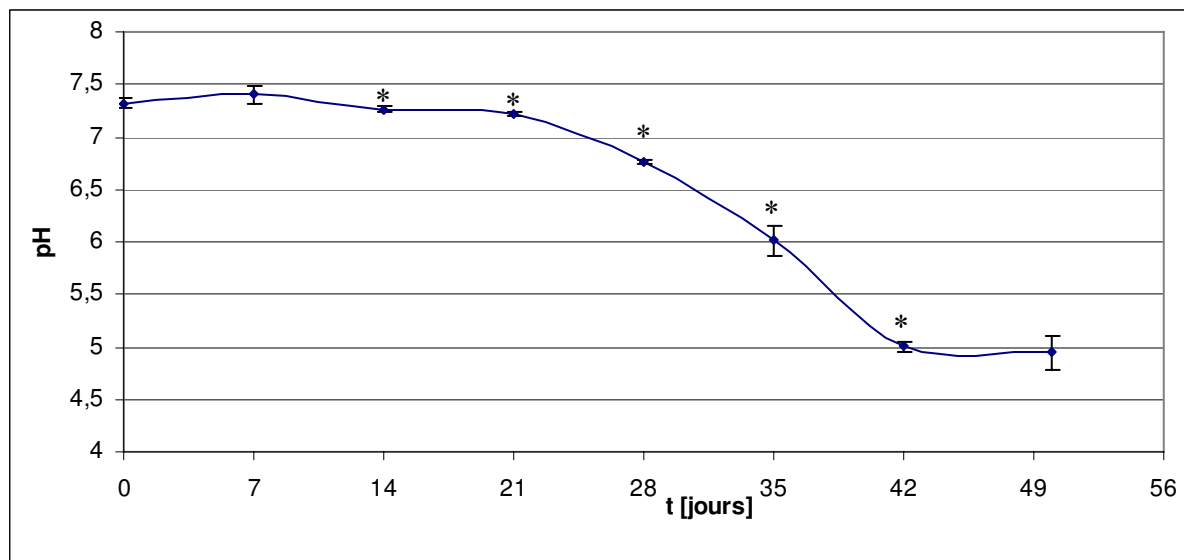


Figure 4.24 : Evolution du pH du milieu de dégradation en fonction du temps. Les étoiles représentent les différences significatives en comparant la mesure précédente.

Le pH normal du milieu de culture est 7,4. Pendant les 7 premiers jours il reste constant puis diminue. Au 14^{ème} jour la diminution du pH est significativement différente comparée à la mesure effectuée au 7^{ème} jour, ce qui signifie que des produits acides de la dégradation, ayant eu lieu en surface, commencent à diffuser dans le milieu. La valeur du pH stagne aux environs de 7,2. A partir du 28^{ème} jour de dégradation, cette valeur diminue brusquement pour atteindre un plateau au 42^{ème} jour (pH = 5). La brusque chute du pH peut s'expliquer par la diffusion des produits de dégradation de la masse du matériau vers le milieu. Cette hypothèse est confirmée par l'étude de la perte de masse des scaffolds présentée ci-après. La brusque chute du pH vers les pH acides provoque une augmentation de la vitesse de dégradation puisque la réaction de scission des chaînes est catalysée par la présence d'espèces acides (cf. partie 1, paragraphe 1.1.3.1).

4.3.2.3.3 Perte de masse

La figure 4.25 montre l'évolution de la perte de masse des scaffolds en fonction du temps.

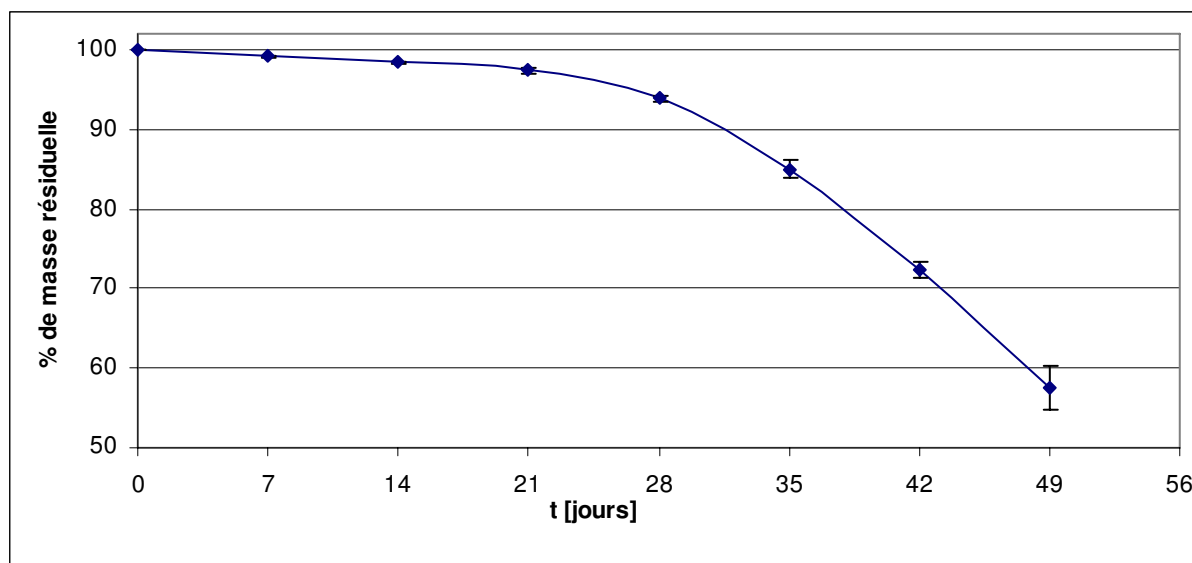


Figure 4.25 : Perte de masse des scaffolds au cours de la dégradation.

La masse des structures reste relativement constante au cours des 3 premières semaines de la dégradation. Elles perdent en effet moins de 3% de leur masse totale. Au 28^{ème} jour, la perte de masse des structures commence à s'accélérer. Au bout de 28 jours de dégradation, la masse résiduelle des scaffolds est aux alentours de 94%, et une semaine après, cette valeur chute à 85%. Une diffusion importante des produits de dégradation survient après 28 jours d'immersion des scaffolds dans le milieu de dégradation. Cette perte de masse explique la chute de pH observée à partir de J28. Nous pouvons considérer qu'il faut 21 jours pour que l'eau diffuse dans la masse du PLGA et scinde les chaînes polymères en fragments assez petits pour qu'ils diffusent dans le milieu de dégradation. Ainsi, nous observons une chute du pH et de la masse résiduelle des structures.

La chute de la masse résiduelle des scaffolds est ensuite (après J35) de plus en plus importante. Les scaffolds perdent en effet 10, puis 15% de leur masse. Cette libération des produits acides de la dégradation est bien évidemment corrélée avec une diminution du pH (figure 4.24). Cependant, il est vraisemblable que le plateau atteint par la valeur du pH, après 42 jours de dégradation, corresponde à un équilibre entre les espèces acides du milieu de dégradation et celles encore contenues dans le scaffold. Aussi, en procédant au rinçage des structures, ces produits diffusent à nouveau à l'extérieur des structures.

4.3.2.3.4 Evolution des propriétés mécaniques

La figure 4.26 présente les courbes de traction obtenues pour les scaffolds au cours de la dégradation.

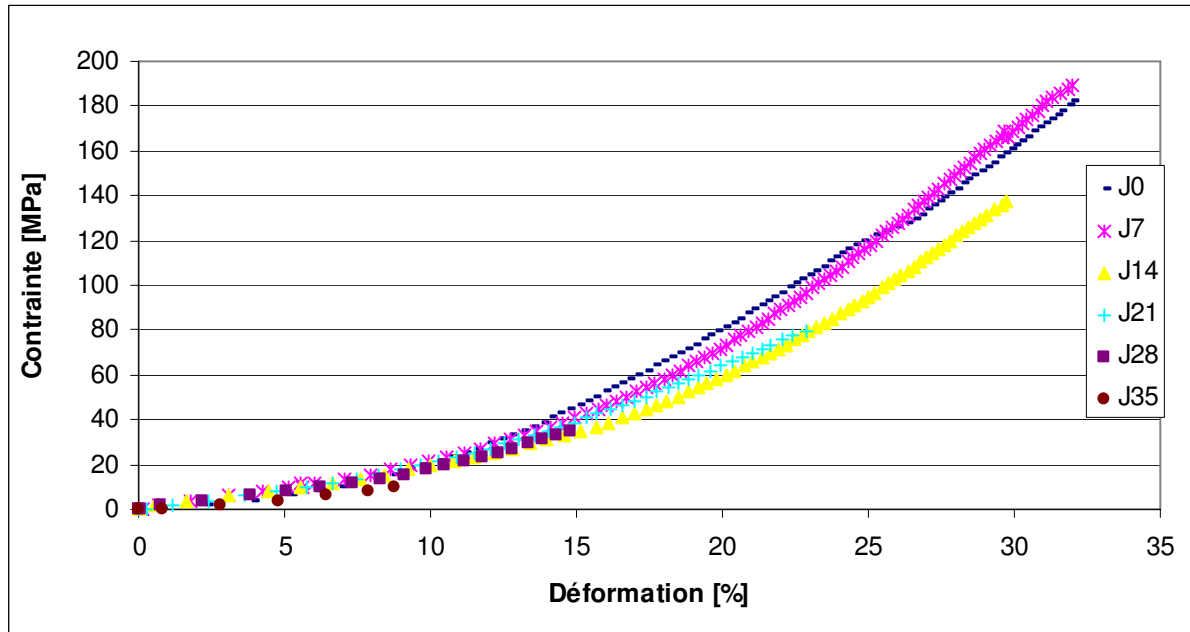


Figure 4.26 : Courbes de traction des scaffolds au cours de la dégradation.

La courbe de traction des scaffolds est caractérisée par une première zone de déformation sans augmentation de la contrainte. Au cours de la déformation, cette caractéristique est conservée comme le montre la figure 4.26. Le comportement en traction des scaffolds, ayant été immergés pendant une semaine dans le milieu de dégradation, est similaire à celui des scaffolds non dégradés. Une baisse de la contrainte et de la déformation à rupture est observée pour les scaffolds dont le temps de dégradation est plus important. Après 35 jours d'expérimentation, la déformation à rupture des scaffolds est de l'ordre de 10%. A J42, il n'est plus possible d'obtenir une courbe de traction exploitable et après 49 jours, il n'est plus possible de manipuler les scaffolds, ils sont devenus trop fragiles.

Les valeurs des caractéristiques mécaniques, notamment celle du module d'élasticité, sont en constante diminution dès que le scaffold commence à être dégradé. Ces propriétés, en fonction de la durée de dégradation sont rassemblées et présentées dans le tableau 4-6. Après 7 jours de dégradation, les scaffolds ne présentent pas d'altérations significatives des propriétés mécaniques. Nous avons même observé une augmentation du module d'élasticité, la contrainte maximale reste quant à elle constante. Ensuite, toutes ces propriétés diminuent jusqu'à ce que les scaffolds perdent leur intégrité physique.

Tableau 4-6 : Evolution des propriétés mécaniques au cours de la dégradation.

	Déformation [%]	Contrainte [MPa]	E [MPa]
J0	32,9 ± 2,2	164 ± 23	765 ± 108
J7	29,9 ± 3,1	165 ± 24	914 ± 90
J14	27,6 ± 2,9	105 ± 28	604 ± 101
J21	23,1 ± 2,6	75 ± 5	502 ± 57
J28	14,5 ± 1,9	35 ± 8	279 ± 76
J35	8,0 ± 1,9	10 ± 2	128 ± 9

4.3.2.3.5 Morphologie des scaffolds

La morphologie des scaffolds varie au cours de la dégradation. A l'œil nu, il est possible d'observer une augmentation de la rugosité des fils de suture après 3 semaines de dégradation. Au bout de 28 jours, une décoloration des structures a été remarquée (les fils de suture sont violets à l'origine). Cette décoloration s'amplifie par la suite et après 7 semaines de dégradation, les scaffolds sont de couleur blanchâtre.

La morphologie des scaffolds observée par microscopie à balayage est présentée dans la figure 4.27.

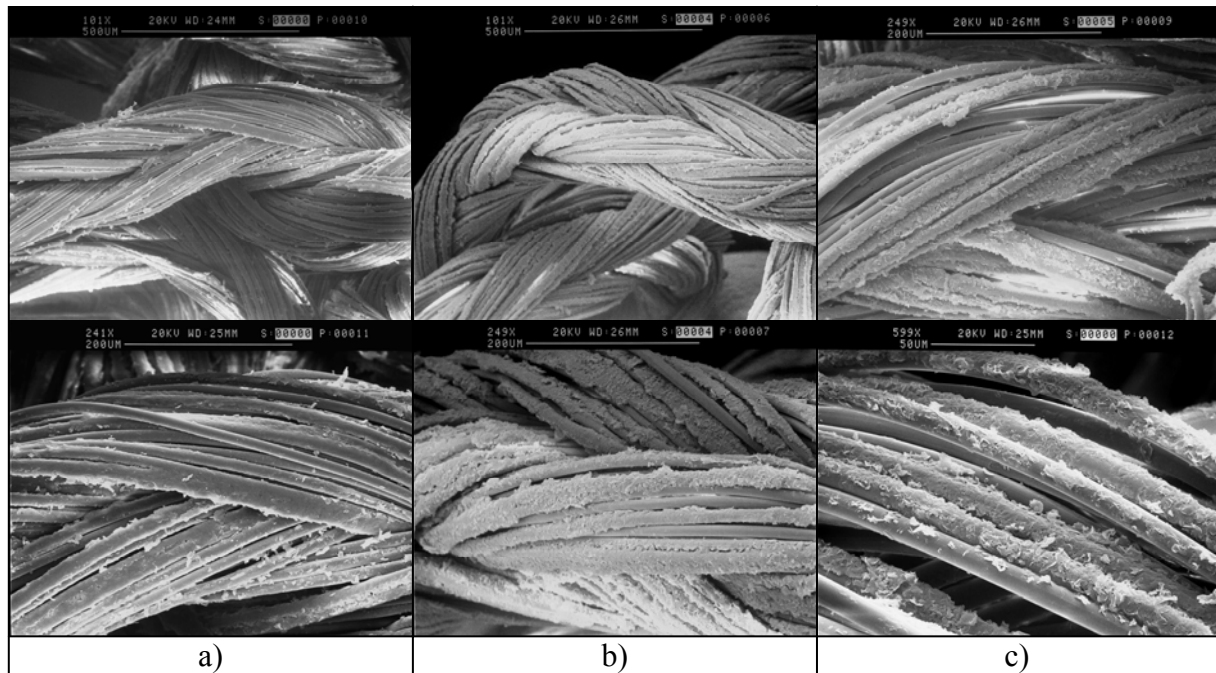


Figure 4.27 : Morphologie des scaffolds au cours de la dégradation. a) J0, b) J28, c) J35.

Cette figure montre les différences importantes entre les scaffolds à différents temps de dégradation. La forme globale des scaffolds n'a pas changée au cours de la dégradation. Les scaffolds sont toujours composés de mailles entrelacées. La structure même des fils de suture

n'a pas non plus évolué, ce sont toujours des tresses de monofilaments possédant un diamètre d'environ 10 μm . Les scaffolds n'ayant pas subi de dégradation présentent des fibres assez lisses, alors que le développement d'une microrugosité peut être observé à partir de 28 jours de dégradation. La dégradation provoque donc la formation d'écailles sur la surface des fibres. La dégradation a aussi lieu dans la masse des fibres, puisque des filaments creux ont été observés (figure 4.28).

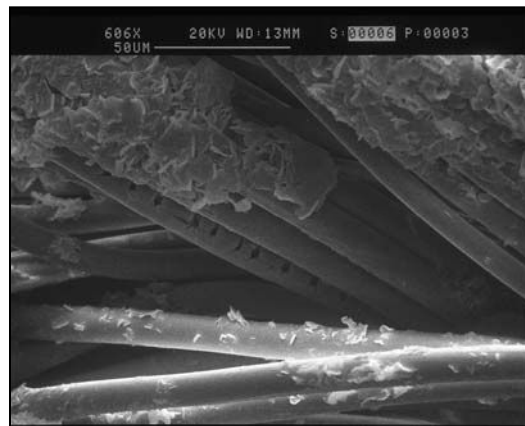


Figure 4.28 : Dégradation des scaffolds tissés, apparition de fibres creuses.

L'apparition de ces écailles en surface des fibres est corrélée à la diffusion des produits de dégradation hors du scaffold. C'est en effet à J28 que la perte de masse commence à être importante (figure 4.25).

Pour résumer cette étude de la dégradation des structures tissées Vicryl, il convient de rappeler les principaux résultats. La viscosité des solutions de PLGA décroît de façon linéaire, puis la vitesse de dégradation augmente à partir de J28 en raison de l'autocatalyse de la réaction de dégradation par les espèces acides. De même, le pH relativement constant jusqu'à J21, décroît subitement à J28. Ce phénomène a été expliqué par la mise en relation de la forte perte de masse des structures à ce moment de l'étude. Les valeurs des propriétés mécaniques sont constantes pour les 7 premiers jours pour, ensuite, diminuer régulièrement jusqu'à ce que les scaffolds aient totalement perdu leur intégrité physique. Cependant, la forme en « J » de la courbe est conservée jusqu'à J28. La morphologie des scaffolds tissés au cours de la dégradation présente une augmentation de la rugosité des fibres composant les fils de suture.

4.3.3 Discussion

4.3.3.1 Propriétés des scaffolds

4.3.3.1.1 Effet de structure

Les propriétés des fils de suture Vicryl diffèrent d'avec les propriétés des structures tissées. Les fils possèdent une courbe de traction classique, c'est-à-dire, composée d'une partie élastique linéaire puis d'une partie plastique alors que les structures présentent une courbe de déformation/contrainte en « J ». Nous avons donc mis en évidence un effet de structure.

Cet effet de structure est corroboré par l'utilisation d'un autre matériau, la soie, connu pour sa flexibilité et sa grande résistance à la traction. Nous avons obtenu un scaffold dont la courbe de traction est, dans sa forme en « J » similaire à celle du ligament. D'autres structures en soie, telles que les scaffolds tressés, ne possèdent qu'une petite zone de déformation sans augmentation de la contrainte. La technique utilisée dans ce travail semble pouvoir produire, quel que soit le matériau, des scaffolds pouvant être utilisés pour l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament en raison de l'effet de structure mentionné ci-dessus.

Cet effet de structure peut éventuellement expliquer le fait que les scaffolds ne sont pas sensibles aux vitesses de pré-déformation, pendant les tests de relaxation, alors que les fils de suture le sont (cf. paragraphe 4.3.2.2.1). Les scaffolds tissés sont formés d'un enchevêtrement organisé de mailles. D'un point de vue mécanique, c'est une structure possédant une architecture complexe. Il est probable que la vitesse de déformation, appliquée au scaffold, ne soit pas homogène dans la structure. La zone en « J » existe parce que les fibres composant les mailles du scaffold se tendent puis transmettent l'effort aux mailles inférieures. Il existe ainsi un gradient de la vitesse de déformation, les fibres les plus proches de la traverse se déformant plus rapidement que les autres (figure 4.29).

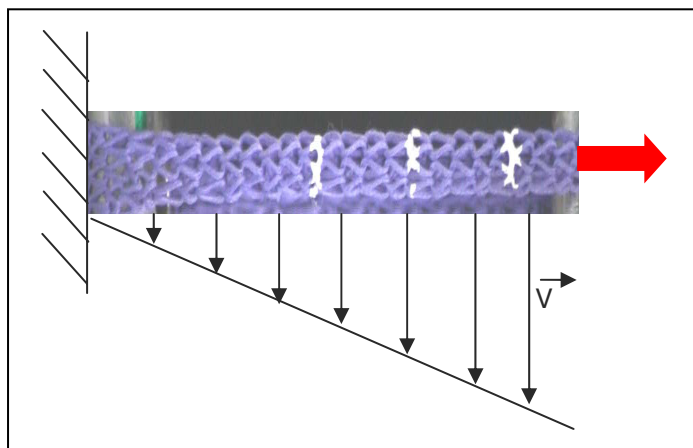


Figure 4.29 : Gradient de la vitesse de déformation dans les scaffolds tissés.

Ainsi, les valeurs de la force en fonction du temps que nous obtenons sont des valeurs moyennées puisque certaines fibres sont déformées très rapidement et d'autres le sont moins vite. La mise en forme des scaffolds tissés, de par leur architecture, change de façon importante les propriétés mécaniques des matériaux qui sont utilisés puisque nous avons obtenu des scaffolds moins rigides (le module d'élasticité étant plus faible pour les scaffolds que les fils de suture) et ayant une résistance à traction plus faible.

4.3.3.1.2 Ajustement des propriétés mécaniques

➤ Nombre de fils et diamètre du fil

La technique de tricotage permet en outre de varier les paramètres physiques, et donc mécaniques des scaffolds. Ge et *al.*, en utilisant conjointement trois fils de suture (2 en PLLA et 1 en PLGA), ont montré que les scaffolds obtenus possèdent une porosité de 44% [GE 05a]. Aussi en ajustant le nombre de fils utilisé lors du tissage, il est possible de contrôler la porosité mais aussi les performances mécaniques. De la même façon, l'utilisation de fil de suture de diamètre plus gros permet d'augmenter la force de rupture des scaffolds. Des expériences préliminaires effectuées dans notre Groupe, utilisant des scaffolds de 6 mailles de large et fabriqués avec un fil de suture Vicryl 0 (le diamètre du fil est de l'ordre du millimètre) ont montré que la force à rupture dépasse les 250 N.

➤ Nombre de mailles

La variation du nombre de mailles des scaffolds tissés, bien que ne changeant pas les caractéristiques globales du comportement mécanique, permet cependant de contrôler les valeurs de la force à rupture. Liu et *al.* donnent une valeur de la force à rupture de 250 N pour

des scaffolds tissés en soie possédant 40 mailles de large [LIU 07]. Dans nos propres expériences, nous avons montré que les scaffolds en soie de 6 mailles de large ont une résistance à la rupture de 60 N. Ceci montre bien qu'il est possible d'ajuster les propriétés mécaniques par la variation du nombre de mailles de la structure. Ce point est très important car il permet d'obtenir des scaffolds plus résistants, pouvant s'approcher de la force à rupture du LCA (environ 2 000 N [DUT 06]).

➤ Matériau utilisé

Le matériau utilisé est le paramètre clé qui détermine les propriétés mécaniques des scaffolds. Ouyang et *al.* ont montré que la force à rupture de leur scaffold tissé en PLLA est de l'ordre de 50 N [OUY 05]. Cette valeur est obtenue pour des scaffolds comportant 6 mailles de large, comme les nôtres. Nous pouvons ainsi comparer la résistance à la traction de nos scaffolds en PLGA et en soie. Les scaffolds en PLGA possèdent une force à rupture de 110 N et ceux en soie de 60 N. Chaque scaffold, bien que possédant cette courbe de traction caractéristique en « J », a une résistance à la traction différente. Les matériaux utilisés définissent aussi la durée de dégradation du scaffold.

4.3.3.2 Dégradation des scaffolds

Notre approche a consisté à mettre les scaffolds tissés au contact d'un milieu de culture car c'est dans cet environnement qu'aura lieu la formation du néo-tissu. La dégradation des scaffolds est due à la scission par hydrolyse des chaînes polymères. Ce mécanisme est relativement bien connu, et a été largement étudié par le Groupe de Vert [LI 95] essentiellement au niveau macromoléculaire. Le comportement en traction des structures tissées en fonction de la dégradation n'a pas été systématiquement caractérisé. C'est pourquoi nous avons développé cette étude de la dégradation des tissés Vicryl.

4.3.3.2.1 Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des polymères sont liées à leur masse molaire et à l'orientation des chaînes [GUP 07]. Il est possible de prédire certaines performances mécaniques en fonction de la masse molaire résiduelle des fils de suture Vicryl. Cette étude, menée pour du Vicryl 2-0 par Deng et *al.*, a montré que la résistance à rupture en fonction de la masse molaire est régie par une loi logarithmique [DEN 05] :

$$\text{Résistance}_{\text{rupture}} = a + \ln(M_w)$$

Ces auteurs ont montré que la masse molaire (M_w) minimale pour que les fils de suture puissent répondre à une charge est de 6 000 g.mol⁻¹. Ces fils de suture élaborés dans le même matériau que les nôtres ont une M_w avant la dégradation de 56 000 g.mol⁻¹ [DEN 05]. La masse molaire des fils de suture a été divisée par 10 en moins de 26 jours. Ces auteurs ont montré que les fils de suture perdent 50% de leur résistance au bout de 21 jours et après 30 jours de dégradation ils ne sont plus manipulables. Ces résultats sont semblables à ceux obtenus avec les scaffolds tissés. Nous avons montré que les structures tissées conservent l'essentiel des propriétés mécaniques pendant les 14 premiers jours de dégradation, et que la valeur de la force à rupture est divisée par 2 après 21 jours d'expérience. Cependant, le comportement des scaffolds dégradés n'est pas en tout point similaire à celui des fils de suture puisque, Deng et *al.* ont observé une stabilisation du module d'élasticité des fils de suture entre 7 et 23 jours de dégradation alors que cet effet n'existe pas pour les scaffolds. Le module d'élasticité diminue de façon quasiment linéaire avec la durée de dégradation. Il en est de même pour la déformation à rupture. Aussi, nos scaffolds tissés peuvent être manipulés sans produire de fracture jusque J35.

Les scaffolds perdent l'intégralité de leurs propriétés mécaniques après 35 jours de dégradation. Cette étude a été réalisée en conditions statiques, ainsi, à la scission des chaînes de polymère, s'ajoute la fatigue du matériau lorsqu'il sera utilisé dans un bioréacteur lui appliquant de la traction torsion cyclique. Ce paramètre est à prendre en compte lors de la culture *in vitro* du néo-tissu.

Durant les expériences de dégradation, le milieu dans lequel sont immergées les structures a été changé une fois par semaine. Dans une utilisation dans un bioréacteur, le milieu de culture est, soit changé tous les 2 jours, ou soit renouvelé continuellement par l'utilisation d'une perfusion. Les produits acides de la dégradation sont alors éliminés plus régulièrement ce qui maintiendra très probablement le pH du milieu vers 7,4. La dégradation sera assurément ralentie puisqu'elle est catalysée par la présence d'espèces acides [LI 95] et les propriétés notamment mécaniques diminueront éventuellement moins rapidement.

4.3.3.2 Types de matériaux

Le temps de dégradation est bien évidemment relié au matériau utilisé. Nous avons montré, dans ces derniers paragraphes, que la dégradation des fils Vicryl, relativement rapide, se déroule sur une trentaine de jour. Une dégradation rapide est un avantage pour limiter l'inflammation lorsque les structures sont implantées. Le matériau synthétique, disparaissant au bout d'une trentaine de jour, ne provoque pas de réaction inflammatoire à long terme.

Cependant, si la culture dans le bioréacteur nécessite plusieurs mois il faut que la matrice extracellulaire soit suffisamment développée pour pouvoir subir les déformations sans dommage.

Ge et *al.* ont étudié la dégradation de scaffolds tissés en PLLA et en PLGA [GE 05a]. Leurs conditions de dégradation sont similaires aux nôtres puisque ces auteurs ont utilisé du milieu de culture. Le PLLA est un polymère se dégradant plus lentement que le PLGA, ainsi, les structures tissées développées sont encore capables de se déformer sans rompre après 20 semaines de dégradation. Ge et *al.* ont remarqué une chute du pH et du module d'élasticité après 4 semaines d'expériences. Ils ont attribué ce phénomène à la dégradation plus rapide du fil de suture en PLGA. Ceci corrobore nos résultats car la diminution importante du pH a lieu pour la 4^{ème} semaine de dégradation. Crow et *al.* ont aussi observé ce phénomène pour des fibres de PLGA après 4 semaines de dégradation [CRO 05]. Les scaffolds en PLLA semblent être aussi une bonne alternative pour l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament en raison de leur durée de dégradation permettant une culture à plus long terme du néo-tissu dans un bioréacteur. Le désavantage lié à l'utilisation de structures en PLLA vient de la réaction inflammatoire du corps une fois les prothèses implantées. Il a été montré que des vis résorbables provoquent une réaction inflammatoire à long terme (> 3 ans) [BER 95]. La dégradation du PLLA s'effectue préférentiellement dans les zones amorphes du matériau. Lorsque les chaînes de polymère sont assez petites, elles forment des nanocristaux où l'hydrolyse des liaisons esters est fortement ralentie en raison de la mauvaise diffusion de l'eau dans ces cristaux. La dégradation du PLLA conduit à la formation de particules hautement cristallines dont la durée de dégradation est très longue (> 6 ans) [BER 95] [VER 06]. Ces cristaux sont généralement internalisés par les cellules et provoquent une mort cellulaire [VER 06].

Un autre paramètre à prendre en compte lors de l'utilisation des polyesters est la nature de leurs produits de dégradation. L'acide lactique libéré par la dégradation du PLLA est éliminé en entrant dans le cycle cellulaire. Les acides glycoliques et caproïques sont aussi métaboliquement éliminés. Il faut cependant que les produits de dégradation soient solubles pour pouvoir être éliminés [VER 06] ce qui signifie que les particules issues de la dégradation ne doivent pas être trop cristallines pour permettre une scission des chaînes jusqu'à un poids moléculaire assez petit pour qu'elles soient solubilisées par le milieu environnant.

La soie, utilisée aussi dans cette étude, pour fabriquer des structures tissées, permet de conserver, pendant tout le temps de la culture *in vitro*, les propriétés des scaffolds puisqu'elle ne se dégrade pas par hydrolyse. La soie subit une dégradation protéolytique [ALT 03]. C'est

donc seulement après implantation que la dégradation de ce matériau est activée. Une fois que les régions les moins cristallines de la soie sont dégradées, les produits de dégradation sont phagocytés. La soie ne doit donc pas provoquer de réaction inflammatoire à long terme [ALT 03].

Pour résumer et conclure cette partie, nous avons élaboré des structures tissées en Vicryl (PLGA) et en soie, dont les propriétés physiques telles que la porosité, la taille des pores et l'interconnexion répondent au cahier des charges défini en partie introductive. Le comportement mécanique de ces structures est similaire à celui des ligaments et des tendons dans le sens où les scaffolds peuvent subir initialement une déformation sans augmentation de la contrainte. Nous avons aussi caractérisé la dégradation des scaffolds Vicryl, montrant que la durée d'utilisation de ces scaffolds dans un bioréacteur est de l'ordre de 30 jours en raison de la chute des propriétés mécaniques. Il convient cependant de trouver une méthode d'ensemencement cellulaire des scaffolds. C'est ce dont il est question dans les 2 prochains paragraphes.

4.4 Développement de scaffold composite, tissé/alginate

Les scaffolds tissés présentent des caractéristiques intéressantes pour une application en ingénierie tissulaire du tendon et du ligament comme nous venons de le voir. Cependant, un important problème technique se présente dès que les scaffolds doivent êtreensemencés par un ou plusieurs types cellulaires. Les scaffolds décrits dans cette partie sont hautement poreux et leurs pores possèdent un diamètre très large (~ 1 mm). Ainsi un ensemencement par sédimentation n'est pas possible, puisque le rendement d'adhésion cellulaire sur les fibres des tissés serait très faible. Hutmacher et *al.* ont été confrontés à ce problème pour leurs scaffolds (cf. partie 2, paragraphe 2.1.4) et ont montré que l'efficacité de la technique de sédimentation est de l'ordre de 30% [HUT 01]. Le contrôle du nombre de cellules injectées dans la structure n'est donc pas assuré et il faut trouver des procédés permettant l'obtention de scaffolds pour lesquels l'ensemencement est moins hasardeux et plus précis. Dans cette optique, nous avons développé deux types de scaffolds tissés. Celui que nous présentons dans cette partie est composé d'une structure mécaniquement résistante, le scaffold tissé, et d'un autre matériau permettant d'apporter les cellules, l'alginate.

Ce paragraphe se divise en 3 sous-paragraphes principaux, dans le premier nous expliciterons la méthode de fabrication, puis nous présenterons les résultats de l'étude biologique *in vitro* et *in vivo* avant de discuter de la méthode et les résultats.

4.4.1 Matériels et méthodes

4.4.1.1 Matériels

- Vicryl 4-0, fil de suture résorbable violet en PLGA (90/10), Ligapak, bobine de 250 cm, réf. JV1204, Ethicon (la technique de fabrication des tissés est la même que celle présentée dans le paragraphe 4.3.1)
- Alginate, medium viscosity, Sigma-Aldrich, France
- Dichlorure de calcium, CaCl₂, Sigma-Aldrich, France
- Moule rectangulaire de polycarbonate (dimension interne : longueur 12 mm, largeur 4 mm)

4.4.1.2 Etude *in vitro*

Une lignée de fibroblastes humains (CRL 2703) a été employée pour tester la biocompatibilité des scaffolds tissés.

- Milieu de culture
 - Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM), Gibco, France.
 - Pénicilline (100 U.mL⁻¹) Gibco, France.
 - Streptomycine (100 µg.mL⁻¹), Gibco, France.
 - Fungizone (2,5 µg.mL⁻¹), Gibco, France.
 - On ajoute aussi du CaCl₂ (0,003 M).

4.4.1.2.1 Mise en forme des scaffolds

Le principe de la mise en forme des tissés/alginate consiste à encapsuler des cellules dans un hydrogel d'alginate qui englobe le scaffold tissé.

- Stérilisation des matériels et matériaux

Les moules rectangulaires utilisés pour la mise en forme des scaffolds sont autoclavés avant utilisation. La poudre d'alginate est aussi autoclavée. Les scaffolds tissés sont immergés pendant 30 min dans de l'alcool à 75° puis subissent une irradiation UV pendant 30 min.

Une solution aqueuse de CaCl₂ à 0,1 M a été préparée, puis filtrée stérilement.

- Préparation des scaffolds composites

A une masse connue d'alginate ayant été autoclavée, nous ajoutons un volume déterminé d'eau distillée stérile afin de préparer une solution à 2,5% (m/vol). Cette solution est agitée pendant 3 h pour obtenir une solution homogène. Cette étape est effectuée de telle façon que

la solution est toujours stérile. Des fibroblastes entre P11 et P19 sont détachés de leur support de culture, centrifugés, re-suspendus et comptés (cf. paragraphe 1.2.3.2). Les cellules sont de nouveau centrifugées et le surnageant est remplacé par un volume d'alginate afin d'obtenir une densité de 700 000 cellules pour 200 μL de solution d'alginate. Les cellules sont suspendues dans la solution d'alginate.

Dans une boîte de Pétri stérile, les scaffolds tissés sont disposés dans les moules en polycarbonate et 200 μL de solution cellulaire d'alginate sont ajoutés. Pendant cette étape, une pince est utilisée afin d'appuyer sur les moules pour prévenir toute fuite de la solution d'alginate. Quelques millilitres de la solution de CaCl_2 à 0,1 M est délicatement ajoutée à la base du moule pour gélifier la partie du scaffold composite en contact avec la boîte de Pétri. La même opération est répétée sur la partie supérieure. Un large excès de CaCl_2 est finalement introduit dans la boîte de Pétri afin de compléter la gélification de l'alginate. Les scaffolds composites tissés/alginate sont laissés durant 3 min dans cette solution. Les scaffolds sont ensuite rincés 3 fois avec du milieu de culture enrichi en CaCl_2 . Cette étape permet d'éliminer le Ca^{2+} en excès dans les hydrogels qui peut être nocif pour les cellules.

4.4.1.2 Morphologie des scaffolds

La morphologie des scaffolds a été visualisée par microscopie optique (loupe binoculaire).

4.4.1.3 Test de viabilité

La viabilité des fibroblastes dans les scaffolds tissés/alginate a été mesurée en utilisant le test Alamar Blue déjà décrit précédemment. Ici, une solution d'Alamar Blue à 10% a été employée et 500 μL ont été versés dans chaque puits.

Deux contrôles positifs ont été effectués, l'un consistant à cultiver les cellules dans le puits de culture et l'autre consistant à les encapsuler dans de l'alginate (ces contrôles sont de la même dimension que les composites tissés/alginate). Pour cette étude, 9 échantillons ont été testés par 3 séries de 3 échantillons.

4.4.1.3 Etude *in vivo*

L'étude *in vivo* a été effectuée chez des lapins de Nouvelle Zélande (2,25-5 kg, Cégav, France). Cette étude a pour but d'évaluer la reconstruction tissulaire du tendon d'Achille lorsqu'un scaffold,ensemencé par des cellules souches mésenchymateuses autologues, est implanté.

4.4.1.3.1 Classification des groupes d'étude

Trois groupes d'étude ont été formés pour cette expérimentation :

➤ Groupe I (GI) :

C'est le groupe témoin. Nous procédons à une lésion (1 cm) du faisceau externe du tendon d'Achille afin d'évaluer la régénération tissulaire naturelle (n = 4).

➤ Groupe II (GII) :

Le groupe II est constitué par des lapins dont le faisceau externe a été lésé et qui ont été implantés par un scaffold composite tissé/alginate sans cellules (n = 8).

➤ Groupe III (GIII) :

Le groupe III est composé par des lapins ayant subi une lésion puis une implantation de scaffolds tissé/alginate ensemencés par 3 millions de cellules souches mésenchymateuses autologues (n = 8).

4.4.1.3.2 Procédure de prélèvement et d'implantation

➤ Prélèvement des cellules souches

Le prélèvement des cellules souches a été effectué dans la crête iliaque des lapines de façon similaire à la description donnée dans la partie 2, paragraphe 2.2.4.4.

➤ Procédure d'implantation

○ Anesthésie

Le protocole d'anesthésie est décrit dans le paragraphe 2.2.4.4, à la différence près que la dose d'entretien de l'anesthésie a été augmentée jusqu'à 75 mg/kg/h de Rompum dans 20 mL de sérum physiologique afin d'obtenir un endormissement plus profond des animaux.

➤ Implantation

La figure 4.30 présente les différentes étapes de l'implantation.

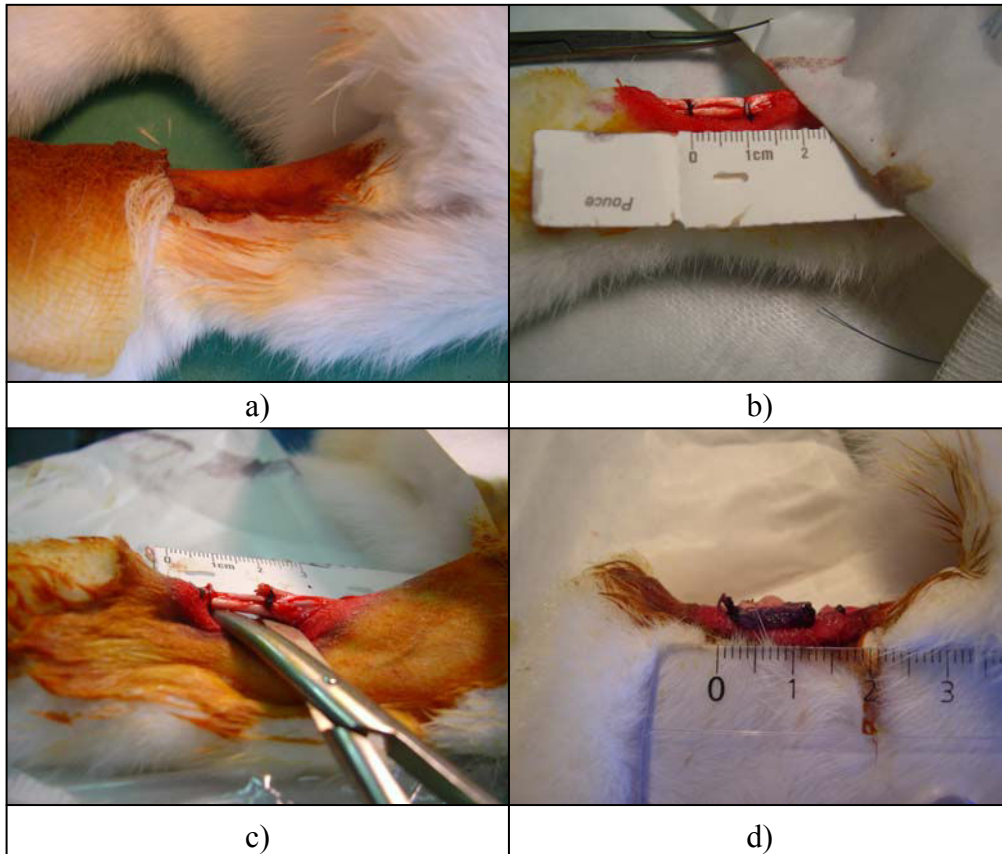


Figure 4.30 : Protocole d'implantation des scaffolds tissé/alginate chez le lapin.

a) rasage, b) incision, c) création de la lésion, d) implantation.

La patte droite des lapines est rasée puis désinfectée par une solution de Béthadine à 10% (figure 4.30 a)).

Après incision, les trois faisceaux du tendon d'Achille sont ligaturés permettant ainsi d'empêcher la rétraction du faisceau externe lors de la création de la lésion (figure 4.30 b)).

Ensuite la lésion est créée en enlevant 1 cm du faisceau (figure 4.30 c)). Le scaffold est positionné à l'endroit du défaut puis il est suturé à chaque bord du faisceau lésé (figure 4.30 d)). La peau de la lapine est finalement recousue et les lapines sont remises dans leurs cages respectives. Il est important de noter que dès le réveil le mouvement des lapines n'est pas entravé.

➤ Prélèvement des tendons

Après 13 semaines d'implantation, les lapines sont abattues et les tendons des deux pattes sont prélevés. Le tendon dans son intégralité est récupéré. Il se compose donc d'une partie osseuse et d'une partie musculaire. Les tissus musculaires sont enlevés en pelant cette partie afin de

conserver exclusivement les fibres de collagène. Pour le groupe I, 3 lapines sont utilisées pour effectuer des tests biomécaniques et les tendons de la quatrième lapine sont destinés à l'étude histologique. Il en est de même pour les groupes II et III, où 6 lapines sont utilisées pour les tests biomécaniques et les 2 lapines restantes pour l'étude histologique.

4.4.1.3.3 Etude biomécanique

Des essais de traction uniaxiale ont été effectués sur le tendon sain, servant de référence, et sur le tendon lésé des lapines. Les mors utilisés pour cette évaluation ont été spécialement fabriqués. Le mors du bas, où l'attache osseuse du tendon est placée, est un mors cylindrique creux, dans lequel l'attache osseuse est insérée. Environ 5 mL de ciment orthopédique (Palacos R, Heraeus, France) est ensuite coulé pour empêcher le mouvement de cette partie du tendon pendant l'essai. L'attache musculaire est placée en sandwich entre deux feuilles de papier de verre, puis disposée dans des mors en coins autoserrants (figure 4.31).



Figure 4.31 : Description des mors utilisés pour les tests biomécaniques.

La vitesse d'étirement est de $30 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$. Les essais sont effectués à 20°C dans l'air, pendant le temps nécessaire à la procédure de mise en place des mors, les tendons sont régulièrement aspergés de liquide physiologique pour prévenir leur séchage. 5 cycles de charge/décharge de 0 à 2 N sont effectués avant l'essai.

Le module d'élasticité de chaque tendon est déterminé à partir de la pente de la partie linéaire de la courbe de traction. Le module d'élasticité du tendon lésé est normalisé par la valeur de celui du tendon sain afin de s'affranchir des effets dispersifs des mesures provenant des

différents poids des lapins. Les résultats sont donc exprimés en pourcentage de la valeur du module d'élasticité du tendon sain.

4.4.1.3.4 Etude histologique

Les tendons destinés à l'étude histologique sont, dès le prélèvement, immergés dans du formol et placés à 4°C pendant plusieurs semaines. Les tissus sont ensuite inclus dans son socle de paraffine pour une coloration HES classique.

4.4.2 Résultats

4.4.2.1 Etude *in vitro*

4.4.2.1.1 Morphologie des scaffolds tissé/alginate

La morphologie des scaffolds composites tissé/alginate est présentée dans la figure 4.32.

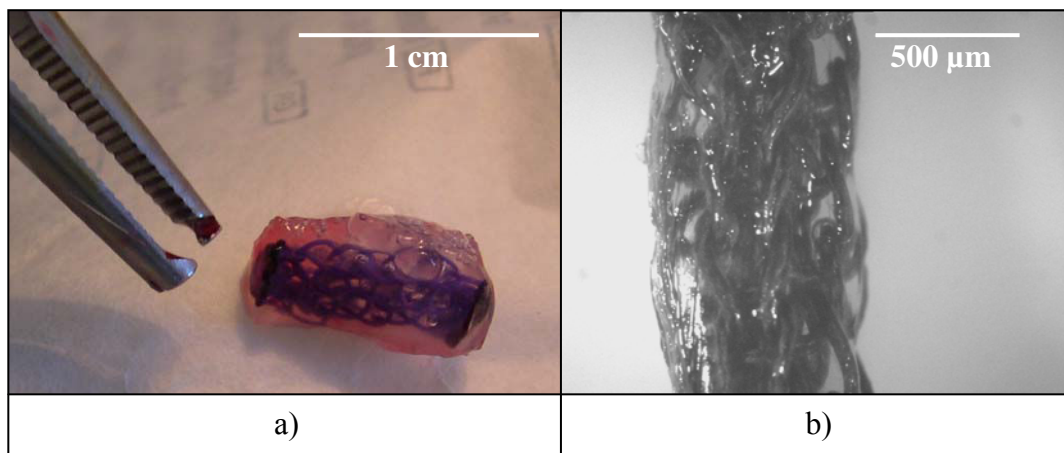


Figure 4.32 : Morphologie des composites tissé/alginate. a) vue d'ensemble, b) détail.

Le scaffold tissé est englobé dans un hydrogel d'alginate qui contient lui-même des cellules. Ce système permet de contrôler précisément la densité d'ensemencement cellulaire. L'encapsulation du tissu par l'alginate n'altère pas ses performances mécaniques. Il convient désormais de vérifier la non-toxicité de ce système.

4.4.2.1.2 Viabilité

La viabilité des cellules dans le composite a été mesurée par le test Alamar Blue. La figure 4.33 présente les résultats de cet essai de viabilité.

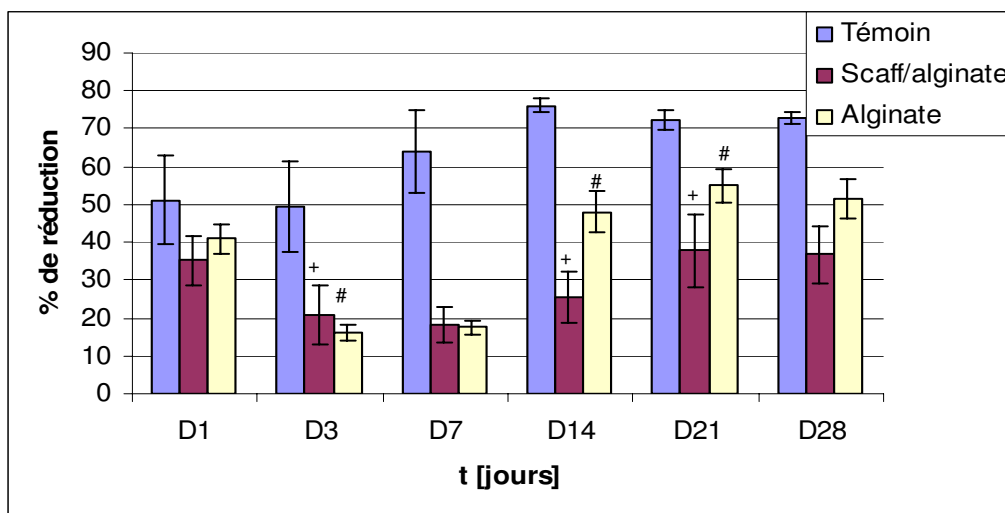


Figure 4.33 : Viabilité des fibroblastes dans les scaffolds composites tissé/alginate.

Le pourcentage de réduction des composites et des structures d'alginate est, après 24 h de culture, aux alentours de 40%, puis il chute jusqu'à J7 avant de remonter de nouveau à J14. A partir de J21, le pourcentage de réduction est stable, se situant autour de sa valeur initiale. Les puits témoins font preuve d'une activité plus intense puisque le pourcentage de réduction passe de 50% le premier jour à 70% à J14. La différence du pourcentage de réduction peut être encore une fois attribuée à l'adaptation des cellules à leur nouvel environnement tridimensionnel. Il est possible que cette diminution soit attribuable à la présence de Ca^{2+} en excès au centre des composites induisant ainsi un effet nocif. Cependant ces résultats montrent que les cellules après un temps assez long de culture (28 jours) sont encore vivantes dans les composites tissé/alginate.

Ces expériences valident donc l'utilisation des composites pour l'application *in vivo*.

4.4.2.2 Etude *in vivo*

L'étude *in vivo* se décompose en deux sous-parties, l'une biomécanique et l'autre histologique. Abordons en premier lieu la partie biomécanique.

4.4.2.2.1 Etude biomécanique

Après 13 semaines d'implantation, les lapines sont abattues et les deux tendons sont prélevés. La figure 4.34 présente une courbe de traction typique d'un tendon sain et d'un tendon régénéré.

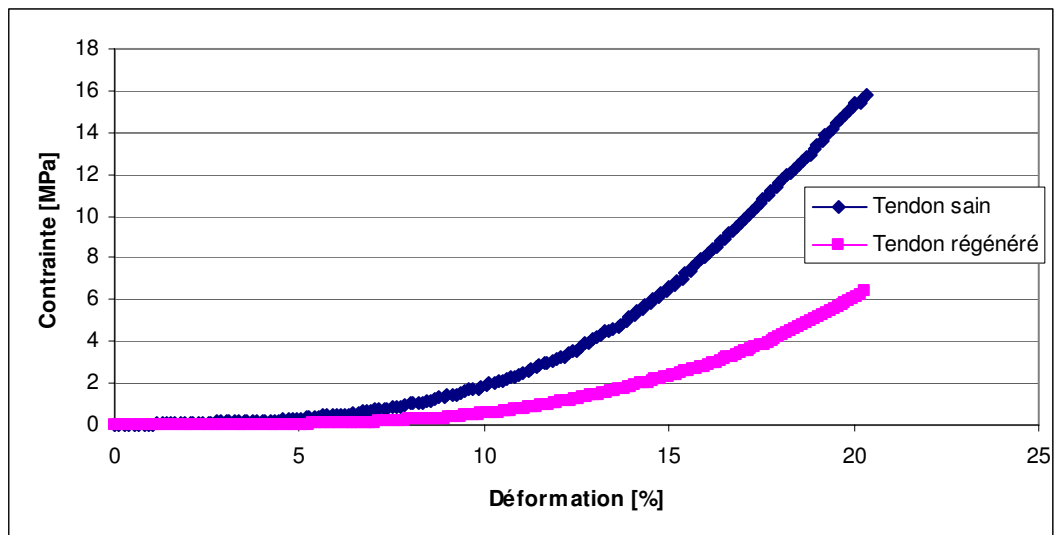


Figure 4.34 : Courbe de traction d'un tendon sain et d'un tendon régénéré après 13 semaines d'implantation.

Toutes les courbes possèdent ce même aspect où nous pouvons distinguer, à faibles déformations, la zone de déformation sans augmentation de la contrainte suivie d'une zone où la contrainte augmente avec la déformation. Globalement, les tendons régénérés possèdent des performances mécaniques plus faibles que les tendons sains.

Leur déformation à rupture est dans la plupart des cas plus élevée alors que la contrainte à rupture est plus faible. Nous n'avons pas examiné ces deux paramètres (déformation et contrainte à rupture) car ils ne sont pas fiables en raison du glissement de l'attache musculaire dans les mors en coin après un certain niveau de déformation et de contrainte. Cependant, le module d'élasticité n'est pas affecté par ce phénomène car il est calculé dans la partie linéaire de la courbe où le glissement n'a pas encore eu lieu. Il est cependant important de remarquer que pour les déformations physiologiques (0 à 6%) les deux tendons possèdent un comportement quasiment similaire.

La figure 4.35 présente les résultats obtenus en effectuant le rapport des modules d'élasticité des tendons sains et des tendons lésés pour les trois différents groupes.

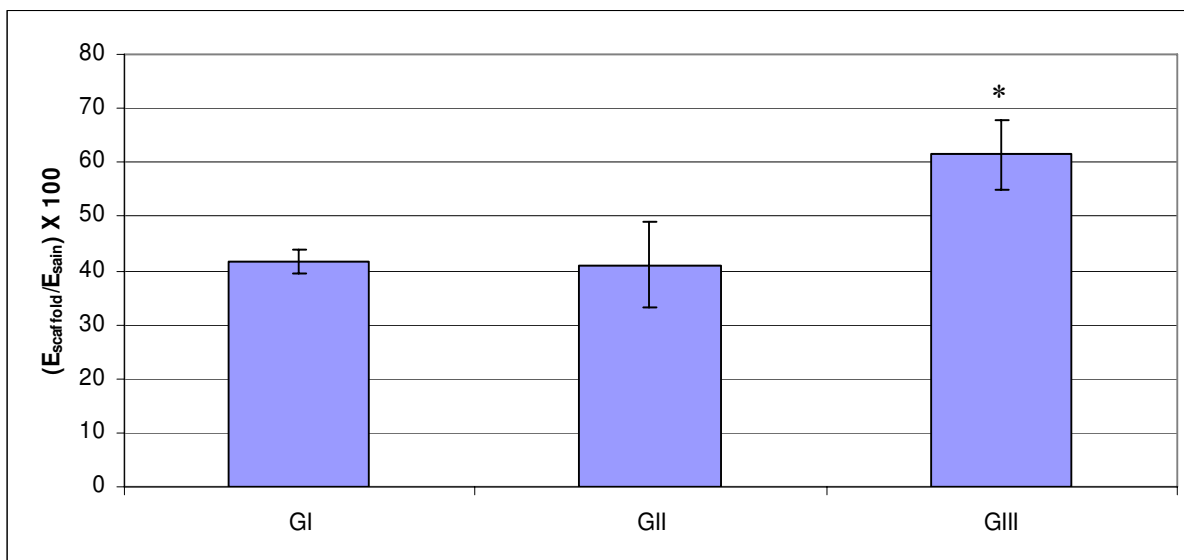


Figure 4.35 : Rapport des modules d'élasticité des tendons d'Achille lésés (GI), cicatrisés (GII) et régénérés (GIII) par rapport aux tendons sains.

Les modules d'élasticité des spécimens des groupes I et II sont autour de 40% du module du tendon sain. Ainsi, l'implantation d'un scaffold composite ne semble pas empêcher la cicatrisation naturelle, du moins du point de vue biomécanique. Pour autant, il n'améliore pas les propriétés biomécaniques du tendon. La valeur du pourcentage du groupe III se situe aux environs de 60% des modules des tendons sains. L'implantation de cellules engendre une meilleure régénération que la cicatrisation naturelle.

4.4.2.2 Etude histologique

Lors du prélèvement des tendons, nous avons observé que les tendons lésés des trois groupes, après 13 semaines d'implantation, possèdent un diamètre plus important que le tendon sain provenant du même animal. Aussi, une matrice fibreuse se trouve en lieu et place des scaffolds composites tissé/alginate qui paraissent avoir été complètement résorbés.

La structure des tendons des différents groupes est donnée dans la figure 4.36. D'une manière générale, les tendons régénérés et cicatrisés possèdent une morphologie différente des tendons sains. Ils sont composés de fibres de collagène moins alignées que celles des tendons sains. De même, l'orientation des cellules est plus aléatoire dans les tendons lésés et régénérés que dans les tendons témoins (figure 4.36). Il n'y a pas de différences morphologiques majeures entre les tendons lésés des trois groupes. Nous pouvons néanmoins remarquer la résorption quasiment totale des scaffolds tissé/alginate.

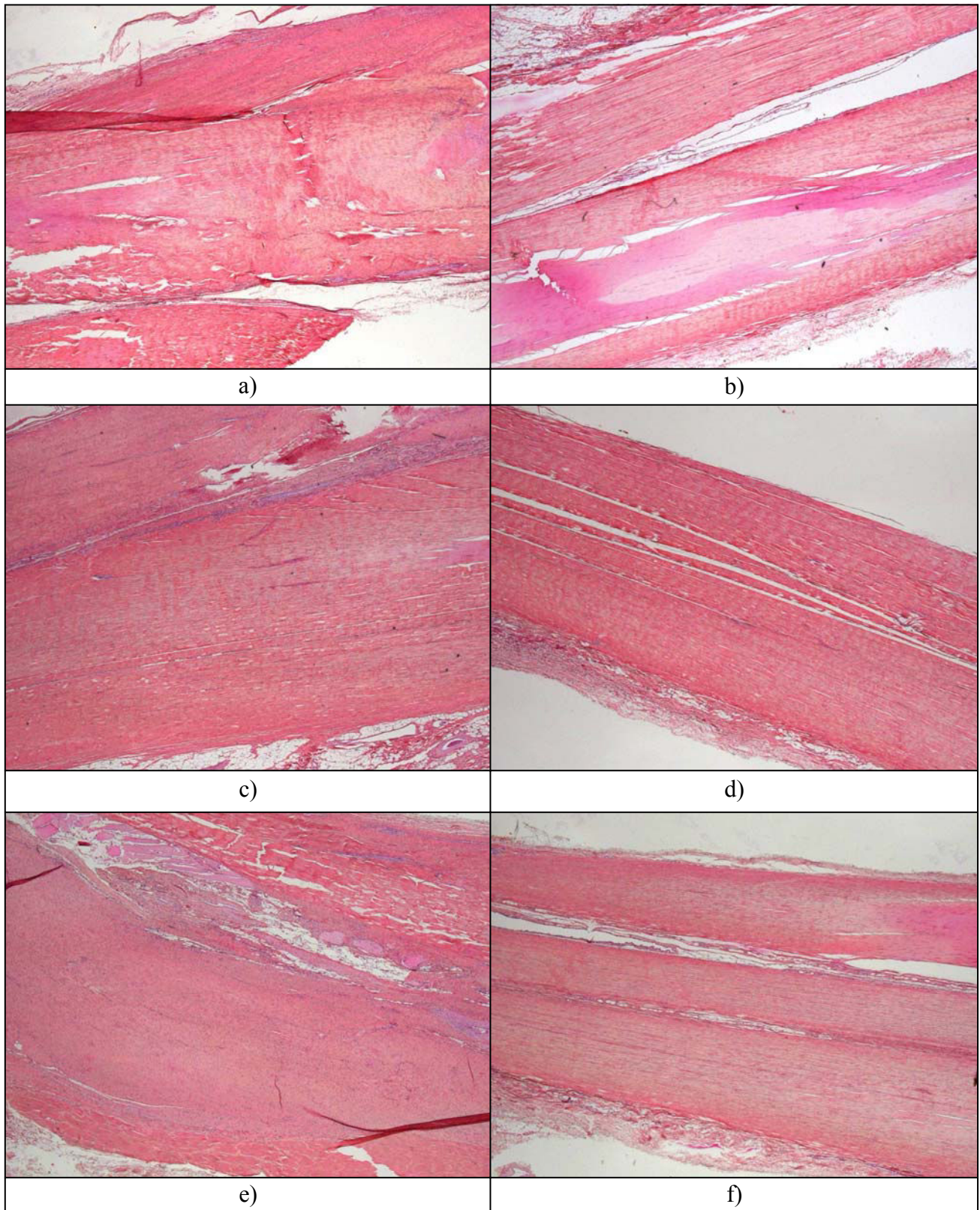


Figure 4.36 : Coupes histologiques des tendons après 13 semaines. GI ; a) lésé et b) témoin, GII ; c) scaffold d) témoin, GIII ; e) scaffold + cellules, f) témoin.

En périphérie et dans certaines zones des tendons, il est possible d'observer une infiltration des cellules caractéristiques d'une réaction de résorption. La présence de macrophages, de lymphocytes et de cellules plurinucléées a été en effet détectée. Ce phénomène est lié à l'existence de particules de matériaux exogènes, vraisemblablement de l'alginate, entraînant la migration de ces cellules en vue de leur résorption. La régénération des tendons pour le groupe III s'accompagne d'une importante vascularisation comme le montre la figure 4.37 c). Cette même figure illustre aussi la différence de cellularisation entre les faisceaux régénérés et les faisceaux sains pour les trois groupes (les faisceaux régénérés étant ceux possédant le plus grand nombre de cellules, mis en évidence par les points bleus sur les clichés).

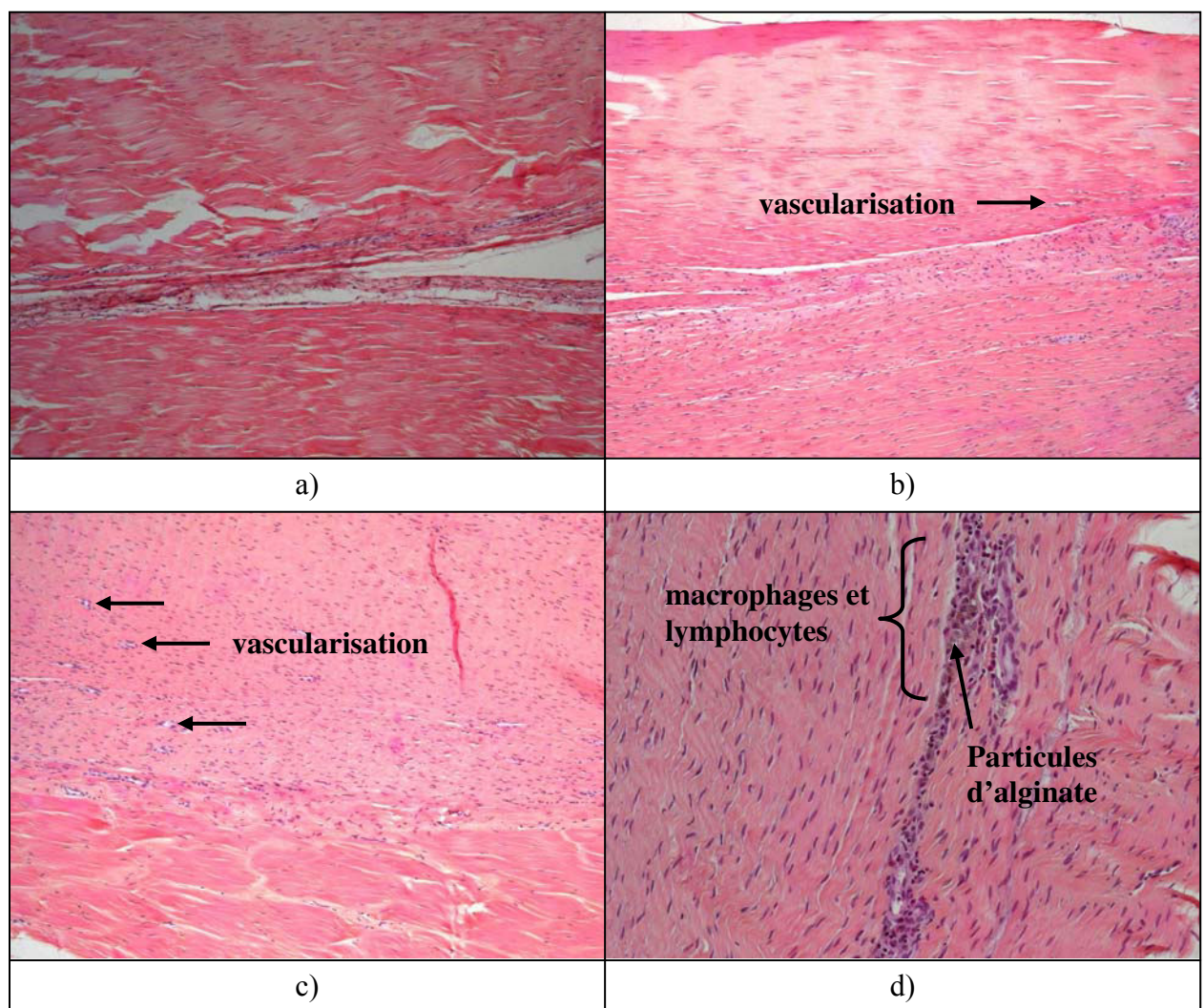


Figure 4.37 : Coupes histologiques des tendons régénérés, a) GI, b) GII, c) et d) GIII ;

4.4.3 Discussion

4.4.3.1 Procédé de fabrication

L'encapsulation des cellules dans un gel d'alginate est une méthode simple afin de les délivrer au niveau de la lésion pratiquée dans le tendon d'Achille du lapin. L'alginate est un polysaccharide d'origine végétale, composé de chaînes d'acide α -L-guluronique et de chaînes de β -D-mannuronique, dont les propriétés mécaniques peuvent être ajustées en fonction de la proportion des deux composants et de la quantité de cations divalents incorporés dans le gel [DRA 97]. Nous avons montré qu'après une petite chute de la population cellulaire, la prolifération a lieu. Lors de l'étude *in vivo*, les scaffolds composites tissé/alginate sont implantés quelques heures après leur fabrication. Le gel d'alginate se dégradant après quelques jours de culture, il est préférable de procéder à l'implantation de la prothèse rapidement.

4.4.3.2 Evaluation biomécanique

D'un point de vue biomécanique, l'apport de cellules à l'endroit de la lésion est une action bénéfique pour la régénération tissulaire du tendon. Plusieurs études concernant ce sujet, mais employant d'autres types de scaffolds, des gels de collagène notamment, confirment ces résultats [YOU 98] [AWA 03]. Une étude presque similaire a été effectuée par Ouyang *et al.*, qui utilisent des tissés en Vicryl et de la colle de fibrine [OUY 03]. Ces auteurs ontensemencé 10 millions de cellules mésenchymateuses dans les scaffolds tissés à l'aide d'une colle de fibrine. 12 semaines après implantation, ils ont obtenu des résultats similaires aux nôtres puisque les tendons traités par les scaffolds possèdent $62 \pm 13\%$ de la valeur du module d'élasticité des tendons sains. Dans cette étude, Ouyang *et al.* n'ont pas observé de différence significative de cette valeur avec celle des tendons témoins (lésion et cicatrisation naturelle). Ces auteurs font aussi état d'une raideur des tendons régénérés proche de celle des tendons sains [OUY 03]. L'utilisation de la colle de fibrine peut expliquer ce genre de résultats puisque c'est une colle assez rigide. Dans notre étude, le fait que le gel d'alginate ne possède pas de comportement à traction (en comparaison avec celui du scaffold tissé), nous permet de mesurer exclusivement les effets des cellules et des scaffolds tissés. Le scaffold tissé en lui-même ne permet pas d'améliorer les propriétés biomécaniques des tendons régénérés puisque les valeurs obtenues pour le groupe I (lésion et cicatrisation naturelle) et le groupe II (lésion et implantation d'un scaffold tissé sans cellules) sont similaires. En revanche, l'introduction des cellules souches engendre des modifications suffisantes puisque notre étude

montre qu'il y a une différence significative entre les groupes témoins (GI et GII) et le groupe III. L'utilisation des structures tissées, lors de la réparation d'une lésion sur le tendon d'Achille du lapin, donne aux cellules un support tridimensionnel hautement poreux permettant la croissance tissulaire. De plus, ces scaffolds, se dégradant en une trentaine de jour, permettent la formation d'un tissu complètement biologique.

4.4.3.3 Etude *in vivo*

L'apport de cellules souches mésenchymateuses à l'endroit d'une lésion a déjà été étudié par différents Groupes de recherche et pour plusieurs types de vecteur cellulaire (gel et fibres de collagène, structure tissée en Vicryl). L'infiltration de cellules d'inflammation et de résorption fait partie du processus normal de cicatrisation qui se déroule typiquement en 4 étapes. Durant la première étape, la lésion effectuée dans le tendon se remplit rapidement de sang et en quelques heures, une infiltration de macrophages et de lymphocytes peut être observée. C'est le début de l'inflammation qui constitue la seconde étape de ce processus. Durant cette phase inflammatoire, plusieurs types cellulaires sont recrutés provoquant la phagocytose des tissus nécrosés, la libération de facteurs de croissance, la formation de néo-vaisseaux et de tissus granulaires. Au troisième jour, des cellules pluripotentes sont acheminées au niveau du défaut et participent au développement de la matrice extracellulaire (principalement des collagènes des types I, III et V). La troisième étape voit une augmentation de la densité cellulaire du tissu néo-formé et une importante sécrétion de la matrice extracellulaire. Lors de la quatrième étape, le remodelage du tissu a lieu, c'est-à-dire un alignement des fibres de collagène suivi d'une baisse de la cellularité. Aussi, le rapport entre les collagènes des types I et III s'approche de celui des tendons sains [WOO 99]. La présence d'une matrice fibreuse organisée en fibres ondulées, semble indiquer que, dans nos expériences, nous nous situons dans la troisième phase de la cicatrisation. Le remodelage n'étant pas complet, il est possible de différencier les faisceaux régénérés et les faisceaux sains de par leur structure ondulée et de par leur plus haute cellularité. Ouyang et *al.* ont effectué des observations similaires après douze semaines d'implantation. Ces auteurs ont aussi remarqué que les tendons traités par des cellules souches possèdent une morphologie plus organisée, dans le sens où, les fibres de collagène sont plus alignées dans ces tendons que dans les tendons ayant subi une cicatrisation naturelle [OUY 03]. Ils ont attribué ce phénomène à l'effet positif des cellules souches permettant une accélération de la cicatrisation. De tels résultats n'ont pas été observés dans nos expériences. Cependant, l'étude biomécanique a montré l'augmentation de la valeur

des modules d'élasticité du groupe III. Il est néanmoins difficile de relier ce phénomène à une meilleure organisation du tissu néo-formé.

Un des inconvénients de l'utilisation d'hydrogels comme vecteur cellulaire provient de leur stabilité une fois au contact des tissus biologiques. L'hydrogel d'alginate n'est pas très stable, il perd une grande quantité d'eau une fois implanté conduisant, à une dégelification partielle et à une diminution de ses dimensions. De plus, nous avons pu observer un écoulement partiel d'alginate hors de la zone lésée. Ceci peut éventuellement expliquer que les tendons régénérés des groupes II et III ne présentent pas de différence morphologique, puisqu'une certaine quantité d'alginate, donc de cellules souches, a pu être captée par les tissus environnants.

Pour résumer ce paragraphe, nous avons développé des scaffolds composites tissé/alginate biocompatibles permettant de délivrer des cellules souches mésenchymateuses au niveau d'une lésion pratiquée dans le tendon d'Achille d'un lapin. Nous avons montré le bienfait de l'incorporation de cellules souches dans les scaffolds au point de vue biomécanique.

Le principal inconvénient de ce type de composite provient de la faible résistance à la traction du gel d'alginate et de sa stabilité une fois implanté.

4.5 Développement de composites tissé/microfibre

Les composites tissé/alginate ont permis d'incorporer des cellules dans les scaffolds tissés. Pour une application dans un bioréacteur, ces structures ne sont pas adéquates puisque l'alginate a un piètre comportement en traction. Ainsi la transmission des efforts mécaniques, produits par le bioréacteur vers les cellules ne peut pas être assurée par ce système. Nous avons donc développé de nouvelles structures où le transfert des efforts est assuré par des microfibrilles déposées sur les scaffolds tissés.

Ce paragraphe s'articule de manière similaire au précédent dans le sens où nous présentons la méthode de fabrication, puis l'évaluation biologique.

4.5.1 Matériels et méthodes

4.5.1.1 Matériels

- Matériaux et solvants
 - PLCL (LA/LC : 70/30), i.v. (viscosité intrinsèque) 1,4 dL.g⁻¹, Boehringer Ingelheim, Allemagne.
 - Chloroforme et diméthylformamide, Sigma-Aldrich, France.

- Vicryl 4-0, fil de suture résorbable violet en PLGA (90/10), Ligapak, bobine de 250 cm, réf. JV1204, Ethicon.
- Mersilk 4-0, soie noire, Ligapak, bobine de 250 cm, réf. F4204, Ethicon.
- Culture cellulaire
 - Milieu de culture
 - Dulbecco's modified Eagle's medium F12 (DMEM), Gibco, France.
 - Pénicilline (100 U.mL⁻¹) Gibco, France.
 - Streptomycine (100 µg.mL⁻¹), Gibco, France.
 - Fungizone (2,5 µg.mL⁻¹), Gibco, France.
 - Alamar Blue, Serotec, Angleterre.
 - Source cellulaire

Les cellules souches mésenchymateuses utilisées dans cette partie proviennent de la moelle osseuse de rats. Le prélèvement a été effectué dans le tibia. Les cellules ont été séparées et isolées de la façon décrite en partie 2, paragraphe 2.2.4.4. Ces cellules sont amplifiées et utilisées entre les passages 4 et 7.

➤ Machine d'*electrospinning*

Le matériel de la machine d'*electrospinning* a été décrit dans la partie 3, paragraphe 3.2.1.2.1. Des barres métalliques rectangulaires de 50 mm de longueur et de 5 mm de largeur ont été employées pour fixer les scaffolds tissés sur le tambour d'*electrospinning*.

4.5.1.2 Protocole de fabrication

Les structures tissées sont fabriquées selon la méthode décrite dans la partie 4, paragraphe 4.3.1.2. Pour cette étude des scaffolds de 12 mailles de large ont été élaborés. Le paragraphe suivant traite de la méthode de déposition et d'accrochage des microfibres sur les scaffolds tissés.

4.5.1.2.1 Préparation des solutions

Une solution de PLCL à 2,5% (m/vol) dans du chloroforme a été préparée pour effectuer un coating des scaffolds tissés.

Une autre solution de PLCL à 15% (m/vol) dans un mélange de chloroforme/diméthylformamide à (90/10) (vol/vol) a été employée pour la fabrication des microfibres.

4.5.1.2.2 Coating des scaffolds

La solution de PLCL à 2,5 % (m/vol) dans du chloroforme a été utilisée pour effectuer un coating sur les scaffolds tissés. Ce coating permet l'adhésion des microfibrilles de PLCL sur les scaffolds. Ce coating est réalisé en badigeonnant la structure avec un pinceau imprégné de la solution. Après séchage du polymère (5 min), la même opération est répétée deux fois de suite. Le polymère, une fois sec, peut empêcher le glissement inter-maillages. Ainsi, nous procédons à quelques cycles d'étirements manuels qui servent à décoller les points de contact des mailles bloquées par le polymère solidifié.

La morphologie des scaffolds tissés a été observée par microscopie électronique à balayage.

4.5.1.2.3 Déposition des microfibrilles

➤ Déposition aléatoire

Des membranes où les fibres sont déposées de façon aléatoire afin de déterminer le diamètre des fibres fabriquées, ont été préparées. Ces membranes ont aussi servi à tester la biocompatibilité des microfibrilles.

➤ Déposition alignée

De même des scaffolds composés de fibres de PLCL alignées ont été élaborés afin d'évaluer les diamètres des fibres et leur biocompatibilité.

➤ *Electrospinning* des microfibrilles alignées sur les scaffolds tissés

La solution de PLCL à 15% (m/vol) est utilisée à un débit de 2 mL.h⁻¹. La distance entre le tambour et l'aiguille est de 8 cm. La tension appliquée est de 6 kV, valeur à partir de laquelle le cône de Taylor. Cependant, il est nécessaire d'augmenter régulièrement cette tension (jusqu'à 9 kV) afin de conserver le cône de Taylor. L'application directe, c'est-à-dire sans passer par cette augmentation régulière de champ, de 9 kV provoque l'apparition de jets secondaires et empêche le contrôle du diamètre des fibres (cf. partie 3, paragraphe 3.1.2.2.1). La vitesse de rotation du tambour est de 1500 tr.min⁻¹, correspondant à une vitesse linéaire de 15 m.s⁻¹. La déposition s'effectue pendant 10 min, puis les fibres se trouvant sur les barres métalliques sont repoussées vers le tissé en utilisant un pinceau immergé dans du chloroforme. Cette étape permet de dissoudre partiellement les microfibrilles et de les faire s'accrocher aux extrémités du scaffold. Trois couches de microfibrilles sont successivement déposées, faisant un total de 30 min de déposition.

➤ Mise en place des scaffolds

Les structures tissées (en soie ou en Vicryl) sont disposées sur le tambour rotatif et sont maintenues par des barres métalliques vissées sur les bords de l'anneau comme le montre la figure 4.38.

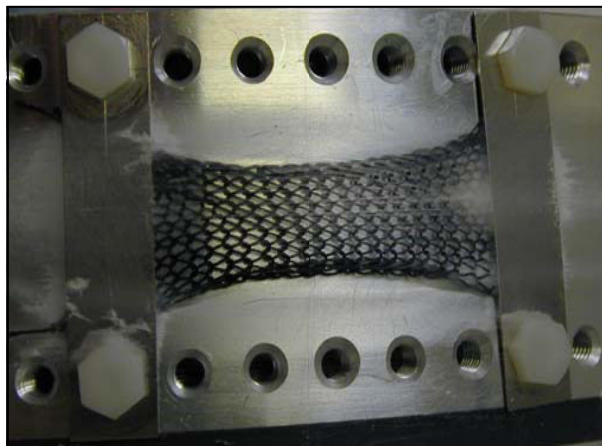


Figure 4.38 : Disposition des tissés sur le tambour rotatif.

Tous les scaffolds sont séchés sous vide pendant 12 h avant d'être utilisés pour l'étude biologique.

4.5.1.3 Etude biologique

4.5.1.3.1 Stérilisation des scaffolds

Quatre types différents de scaffolds ont été utilisés dans cette étude, les membranes de microfibres aléatoires et alignées, et les composites tissés Vicryl/microfibre et tissé en soie/microfibre. Le procédé de stérilisation est semblable à celui décrit dans les autres parties. Les scaffolds sont immergés pendant 30 min dans de l'alcool à 75°, et subissent ensuite une irradiation UV de 30 min. Ils sont ensuite rincés plusieurs fois. Les scaffolds tissé/microfibres sont ensuite séchés stérilement par aspiration sur un filtre steritop.

4.5.1.3.2 Ensemencement cellulaire

➤ Membranes

Les membranes des fibres de PLCL aléatoires et alignées sontensemencées, par la technique classique de sédimentation, à une densité cellulaire de 10 000 cellules par membrane (1,2 x 1,2 cm²). La culture a lieu pendant 14 jours dans une plaque de 48 puits.

➤ Composites tissé/microfibres

Les scaffolds composites sont ensemencés par 50 μL de milieu contenant 250 000 cellules toujours par la technique de sédimentation. Un faible volume d'ensemencement est nécessaire pour éviter que la solution cellulaire ne s'écoule hors du composite, les scaffolds ne recouvrant pas complètement la surface du puits. Ainsi le contrôle du nombre de cellules par scaffold passe par la diminution du volume d'ensemencement. Les scaffolds sont laissés 4 h à l'étuve avant de les transférer dans des puits de culture (plaque de 6 puits). Du milieu de culture est ensuite ajouté. De même, la culture cellulaire se déroule sur 14 jours.

4.5.1.3.3 Tests de biocompatibilité

La biocompatibilité des différentes structures a été testée en utilisant le test de viabilité cellulaire Alamar Blue, cependant les conditions sont différentes pour les membranes et pour les scaffolds composites. La formule permettant le calcul du pourcentage de réduction est donnée dans la partie 1, paragraphe 1.2.3.2. Les mesures ont été effectuées à J1, J3, J7, J10 et J14.

➤ Membranes fibreuses

La viabilité des cellules sur ces membranes nécessite d'être évaluée avant de la vérifier pour les composites.

500 μL d'une solution d'Alamar Blue à 5% dans du DMEM sans rouge de phénol ont été employés pour les membranes. Une incubation de 120 min à 37°C a ensuite lieu. Pour ces mesures, 9 échantillons et autant de contrôles positifs ont été utilisés.

➤ Scaffolds composites tissé/microfibres

5 000 μL d'une solution d'Alamar Blue à 5% et une incubation de 120 min ont été utilisés pour ces expériences. Il est nécessaire d'utiliser un volume de solution d'Alamar Blue important pour pouvoir recouvrir entièrement les scaffolds composites. Ici, 6 échantillons ont été analysés.

4.5.1.4 Evaluation morphologique

Les membranes fibreuses de PLCL ont été observées par microscopie électronique. Un diamètre moyen des fibres a été calculé à partir de 20 fibres. Les scaffolds composites ont été observés par microscopie optique puisque la couche de microfibres occulte le tissé lors d'une observation en microscopie électronique. Les électrons ne pouvant la traverser, il est impossible d'observer le tissé situé en dessous.

Les scaffolds ensemencés ont été observés par microscopie électronique à balayage selon la procédure déjà décrite dans la partie 2, paragraphe 2.2.4.4.

4.5.2 Résultats

4.5.2.1 Membranes fibreuses

4.5.2.1.1 Morphologie

La morphologie des membranes fibreuses est présentée dans la figure 4.39.

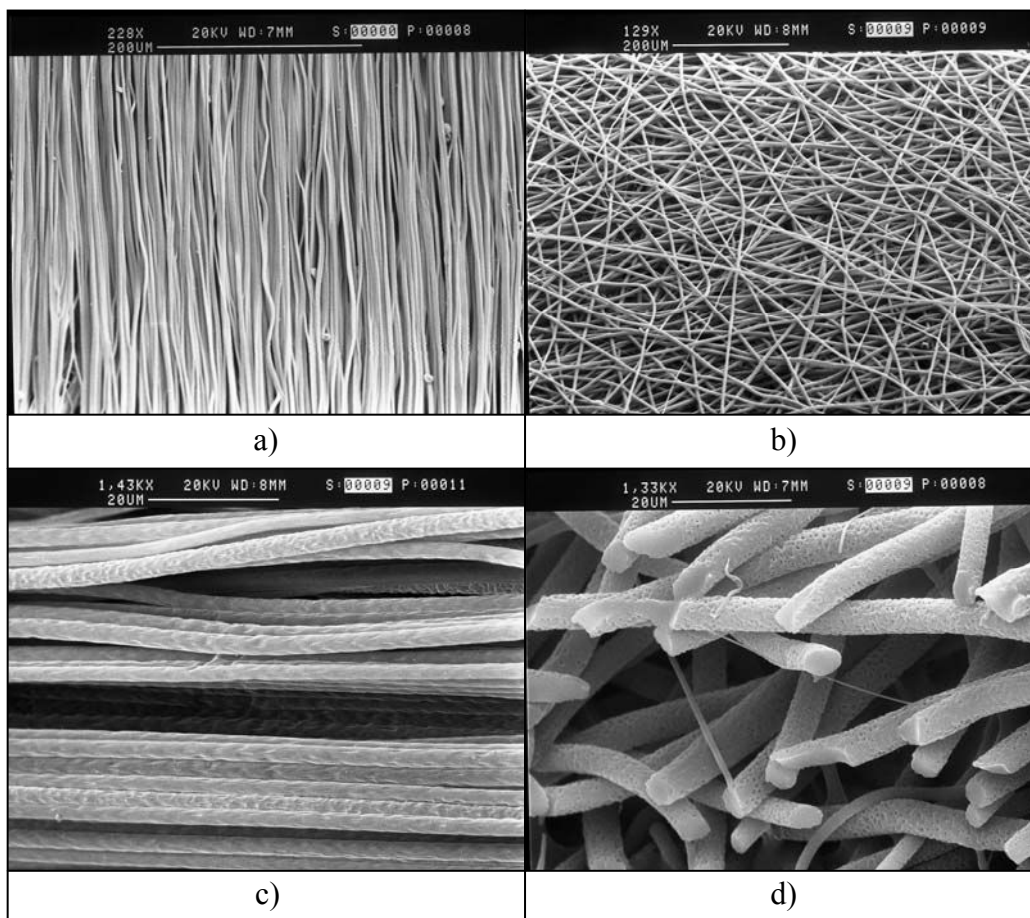


Figure 4.39 : Morphologie des membranes fibreuses de PLCL.

a) et c) fibres alignées, b) et d) fibres aléatoires.

Les fibres déposées de manière aléatoire possèdent un diamètre de $5,8 \pm 0,7 \mu\text{m}$. La surface de ces microfibrilles présente une rugosité provenant des trous formés par l'évaporation du solvant. Les fibres alignées possèdent une orientation assez homogène, et les fibres sont parallèles les unes par rapport aux autres. Ces fibres présentent une surface rugueuse et contrairement aux fibres déposées de façon aléatoire la présence de trous d'évaporation n'a

pas été observée. Le diamètre des fibres alignées est de $2,6 \pm 0,3 \mu\text{m}$. Comme il a été écrit dans la partie 3, l'alignement des fibres a pour effet de diminuer leur diamètre. Ceci est dû à l'étirement mécanique subi par les fibres avant d'atteindre le tambour rotatif.

4.5.2.1.2 Etude biologique

La viabilité de cellules souches du rat a été testée sur ces deux sortes de membrane. La figure 4.40 montre les résultats obtenus.

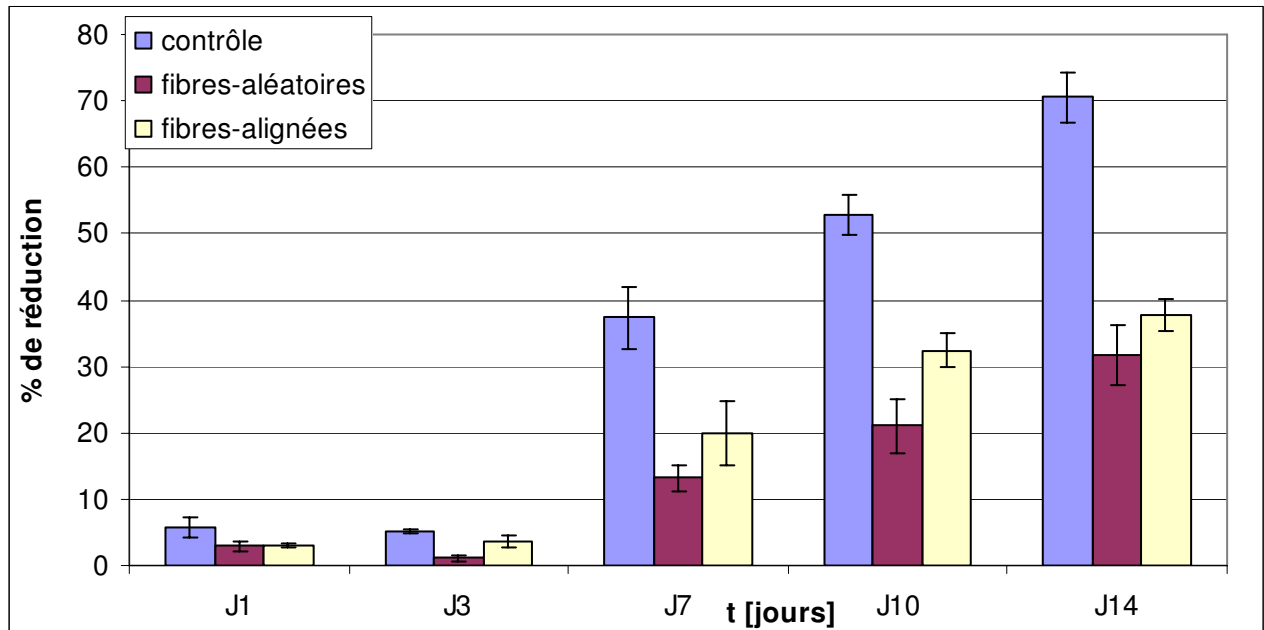


Figure 4.40 : Viabilité des cellules souches mésenchymateuses sur les membranes fibreuses de PLCL (70/30).

Le pourcentage de réduction du contrôle est toujours supérieur à ceux des microfibrilles. Ceci provient de l'hydrophobie des fibres de PLCL. A 24 h de culture, le pourcentage de réduction varie de 5 à 6% et après 21 jours de culture il est supérieur à 30% pour les microfibrilles. Après une stagnation à quelques pourcents, le pourcentage de réduction augmente régulièrement à partir de J3 pour les deux types de membrane traduisant ainsi une augmentation de l'activité métabolique de la population cellulaire pouvant s'interpréter par une prolifération cellulaire. Les membranes alignées semblent être un meilleur support puisque les valeurs du pourcentage de réduction sont toujours plus importantes que pour les membranes de fibres aléatoires. Deux hypothèses peuvent expliquer ce fait : les fibres alignées permettent une plus grande prolifération cellulaire et/ou l'alignement des fibres stimule plus le métabolisme des cellules.

Les observations effectuées en microscopie électronique à balayage apportent des preuves de la prolifération cellulaire puisque, plus le temps de culture est grand, plus les membranes sont recouvertes d'un tapis cellulaire comme le montre la figure 4.41.

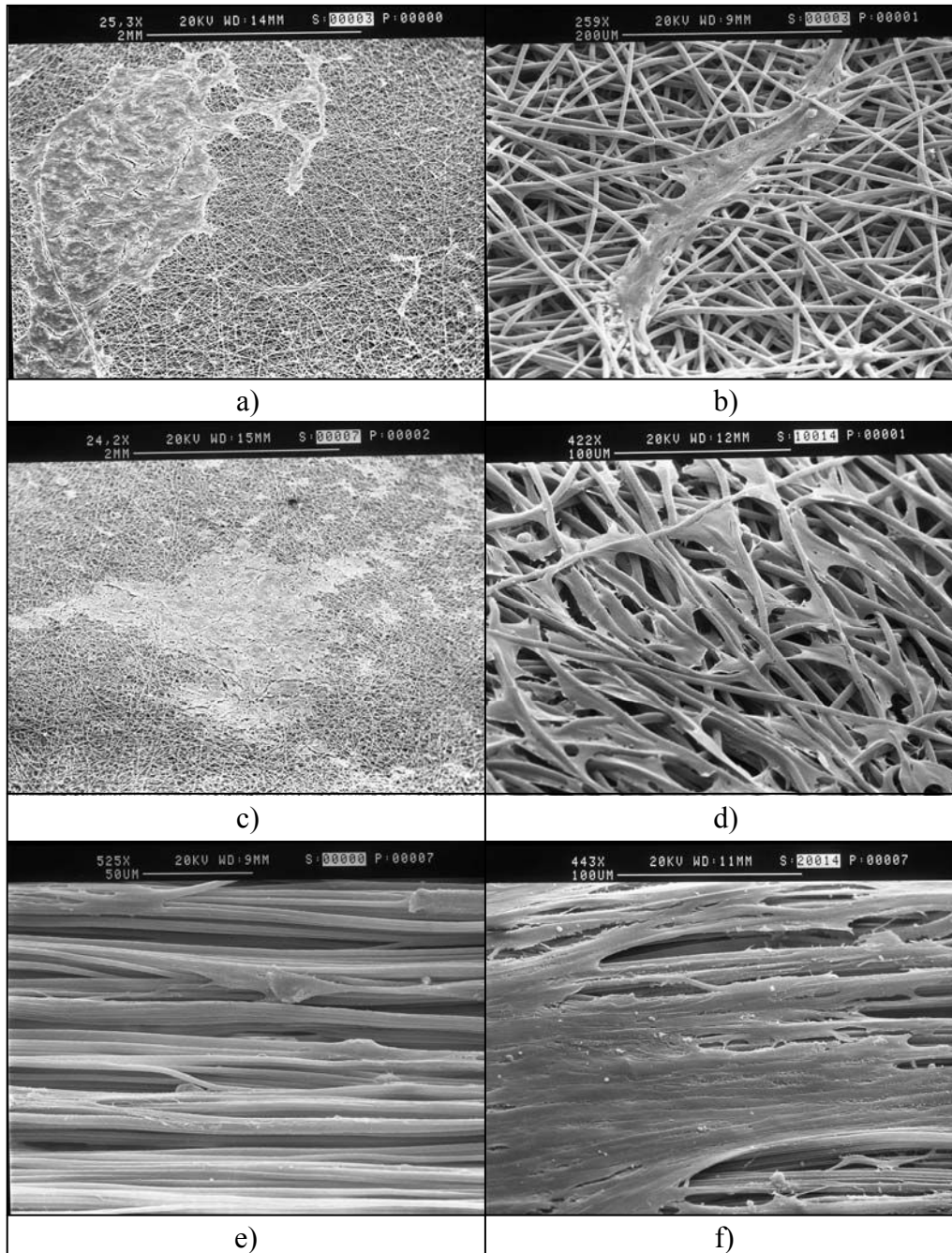


Figure 4.41 : Morphologie des cellules sur les membranes de PLCL. Membrane aléatoire a) et b) J3, c) J7, d) J14, membrane alignée, e) J1, f) J14.

Les cellules restent cependant sur la surface des membranes et ne la pénètrent pas. En revanche, l'alignement des fibres induit un alignement des cellules selon l'orientation des fibres comme le montrent les photos e) et f) de la figure 4.41. Les cellules sont allongées et de nombreux pseudopodes sont visibles, accrochant la cellule aux microfibrilles environnantes. L'alignement des cellules par rapport à l'orientation des fibres est un point excessivement important puisque cela préfigure la structure du ligament (cf. paragraphe 4.1.3.2 de cette partie). Une importante sécrétion a été observée pour ces cellules à partir de J7 jusqu'à J14. Cette sécrétion est uniquement constatée pour les membranes alignées. La figure 4.42 présente la morphologie de ces sécrétions. Les membranes des cellules sont extrêmement rugueuses, et la présence de nombreux sacs, ou vésicules, et de fibres peut être observée.

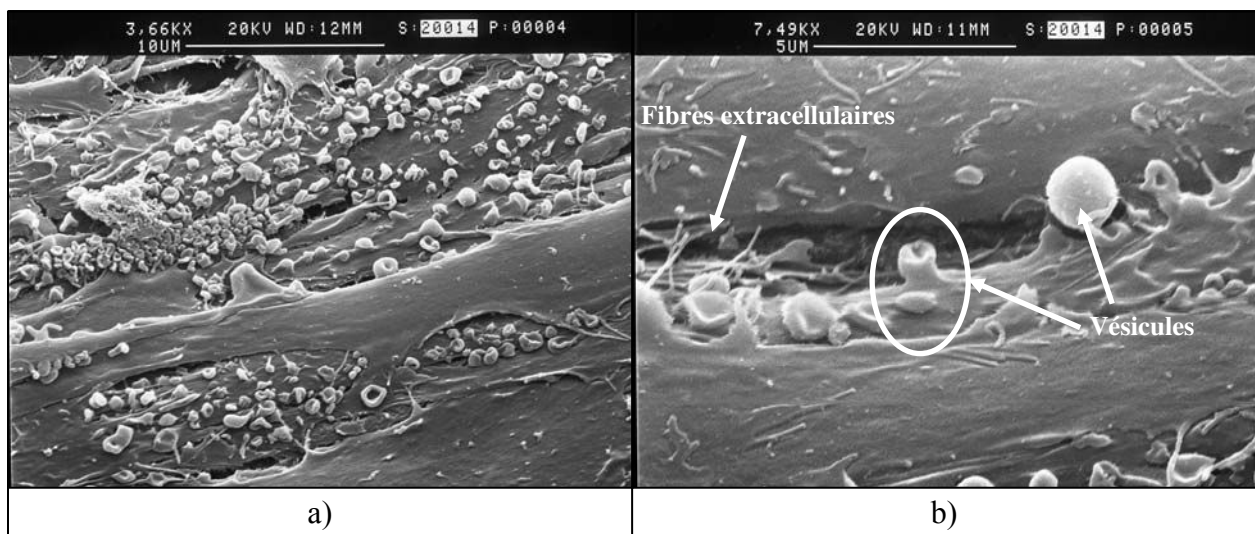


Figure 4.42 : Morphologie des cellules sur les membranes alignées. a) présence de nombreuses vésicules, b) détail, vésicule en formation.

La figure 4.42 b) apporte la certitude que ces vésicules sont bel et bien sécrétées par les cellules puisque sur cette image, nous voyons distinctement un sac en train de sortir de la cellule.

Cette étude préliminaire a permis de déterminer le diamètre ($2,6 \mu\text{m}$) des fibres qui seront déposées sur les scaffolds tissés. Aussi, nous avons mis en évidence la biocompatibilité des membranes. En dernier lieu, nous avons montré que l'alignement des fibres induit une orientation cellulaire. Abordons désormais les résultats concernant les scaffolds tissé/microfibres.

4.5.2.2 Scaffolds tissé/microfibres

4.5.2.2.1 Morphologie

Préalablement à la déposition des fibres sur les tissés, nous avons effectué un coating de polymère sur ces structures en vue d'améliorer l'adhésion de microfibres sur ce support. La figure 4.43 montre la morphologie des scaffolds tissés en soie et en Vicryl après ce dépôt.

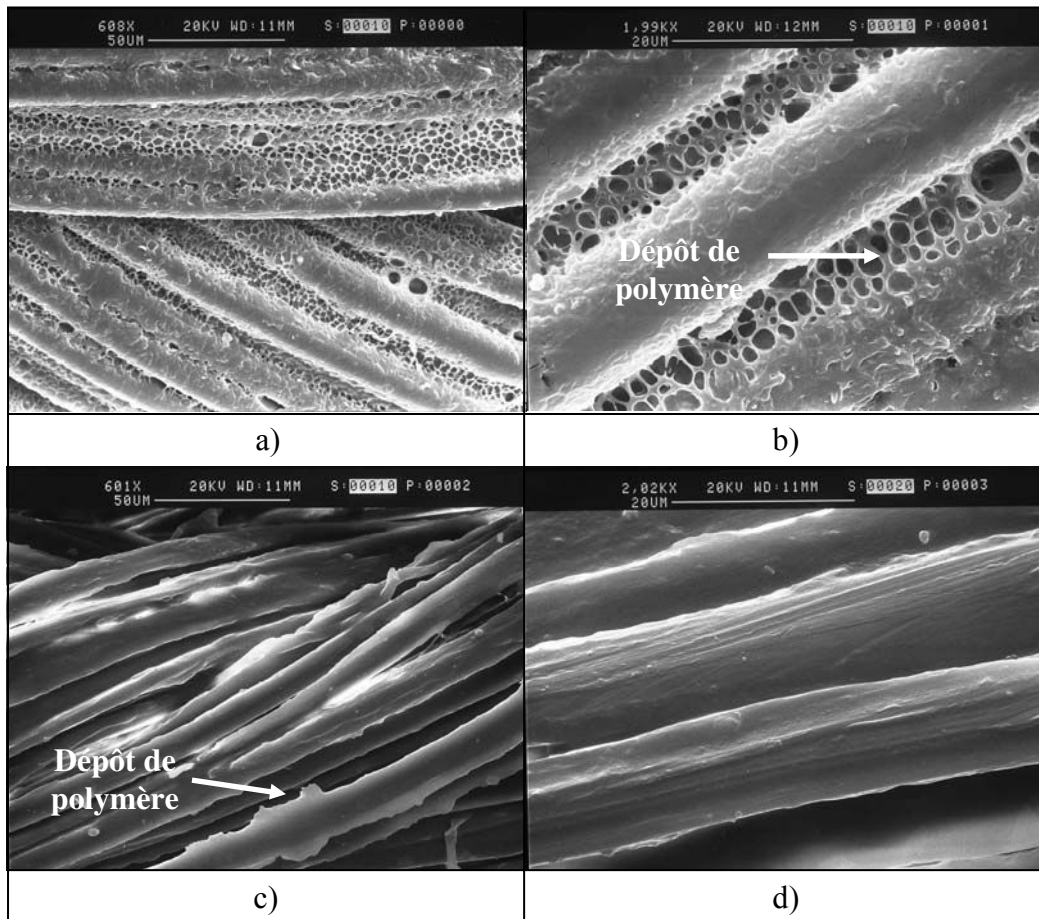


Figure 4.43 : Morphologie des scaffolds tissés après un dépôt de PLCL (70/30).

a) et b) tissé en Vicryl, c) et d) tissé en soie.

Il y a une grande différence morphologique entre la soie et le Vicryl après le coating. Le mince film de polymère est très poreux pour le tissé en Vicryl alors que le dépôt est très homogène pour le tissé en soie. L'information importante que nous pouvons obtenir de ces images, est le fait que le PLCL est bien en surface des fils de suture. Ceci va permettre aux microfibres de se lier avec cette couche de polymère.

La déposition des microfibrilles a été effectuée par trois séries de 10 min. Les barres de fixation, bien qu'ayant une faible épaisseur, provoquent une petite perturbation dans la déposition des fibres. Ces fibres, proches des attaches n'adhèrent pas complètement sur le tissu. L'utilisation d'un pinceau imbibé de chloroforme permet de dissoudre partiellement les microfibrilles et de les accrocher à la structure tissée. La figure 4.44 montre la morphologie des composites tissés en soie/microfibrilles. Les tissés Vicryl/microfibrilles propose une morphologie similaire.

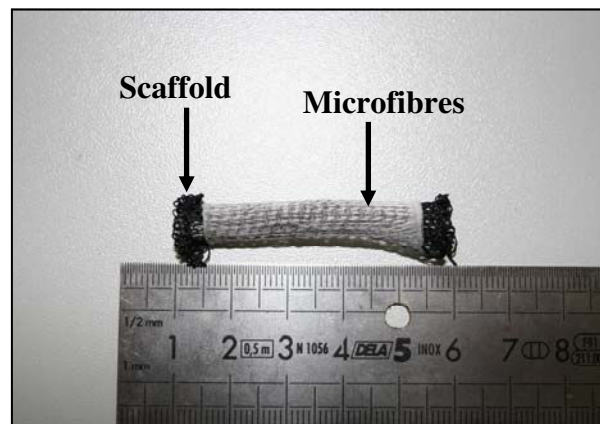


Figure 4.44 : Morphologie des composites tissés en soie/microfibrilles.

Le dépôt de microfibrilles sur les structures tissées est assez homogène et n'empêche pas l'enroulement des tissés sur eux-mêmes. Nous avons donc un échafaudage tridimensionnel.

La figure 4.45 montre plus en détail les microfibrilles sur les tissés.

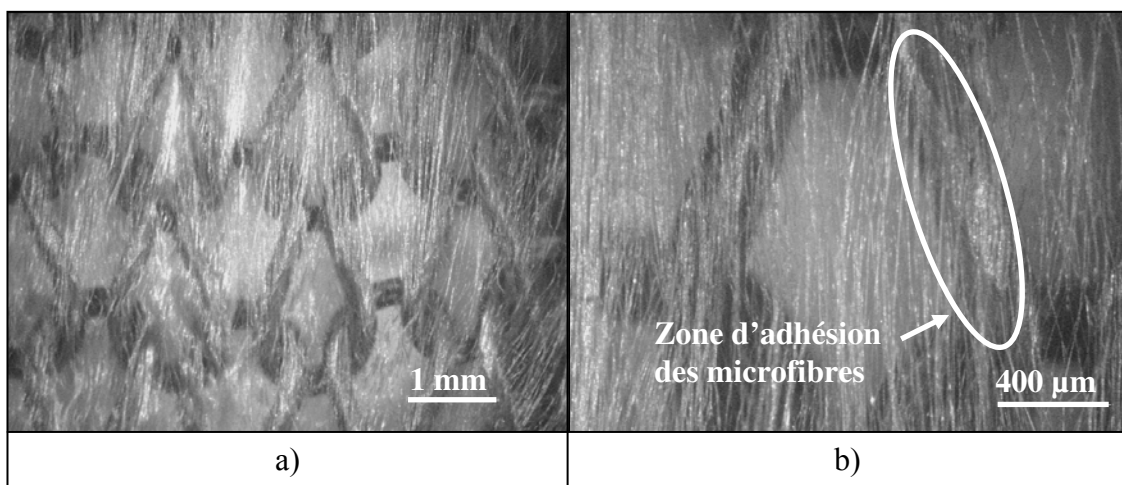


Figure 4.45 : Morphologie des échafaudages composites tissés/microfibrilles.

a) vue générale, b) détail d'une maille.

Les fibres sur les échafaudages tissés sont alignées et recouvrent tous les espaces situés entre les fils de suture. L'adhésion des microfibrilles sur les fils est satisfaisante et nous pouvons

observer des zones de fusion entre le coating de PLCL et les microfibres sur les contours des mailles (figure 4.45 b)). En étirant manuellement ces composites, nous n'avons pas remarqué de désolidarisation de la couche de microfibres et du support tissé. Cela constitue un point extrêmement positif et permettra vraisemblablement l'utilisation de ces scaffolds dans un bioréacteur où ils subiront des efforts cycliques de traction-torsion. La couche de microfibres possède une épaisseur de 20 à 30 μm . Elle est relativement fine et ne change donc pas les propriétés mécaniques de la structure tissée.

4.5.2.2.2 Etude biologique

La déposition d'une couche de microfibres permet de pouvoir ensemercer par sédimentation les scaffolds composites. Le contrôle de la densité cellulaire est assuré par cette méthode. Cependant, il est nécessaire de déenrouler les scaffolds pour ensemercer toute leur surface. La figure 4.46 présente l'évolution du pourcentage d'Alamar Blue en fonction du temps de culture et du type de scaffold composite (soie ou Vicryl)

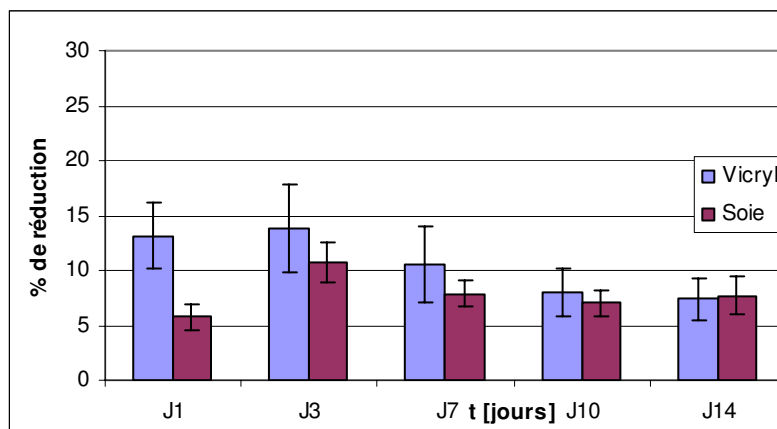


Figure 4.46 : Viabilité des cellules souches du rat sur les composites tissé/microfibres.

Le pourcentage de réduction de la molécule d'Alamar Blue après une augmentation de quelques pourcents reste stable durant les 14 jours de culture. Ce pourcentage se stabilise vers 10% de réduction pour les deux types de structures composites. Ces résultats prouvent que les cellules survivent sur les composites. Le fait que le pourcentage de réduction reste constant peut être expliqué par la densité d'ensemencement cellulaire. Nous avons déposé 250 000 cellules par scaffold, les cellules sont alors assez rapidement à confluence d'où la stabilité du pourcentage de réduction. Cela explique aussi la légère augmentation du pourcentage de réduction observé entre J1 et J3. Aussi, le volume de solution d'Alamar Blue étant assez grand (5 mL) ce test n'est plus alors d'une extrême sensibilité.

L'étude morphologique des scaffolds ensemencés apporte des informations sur le degré de confluence des cellules comme le présente la figure 4.47.

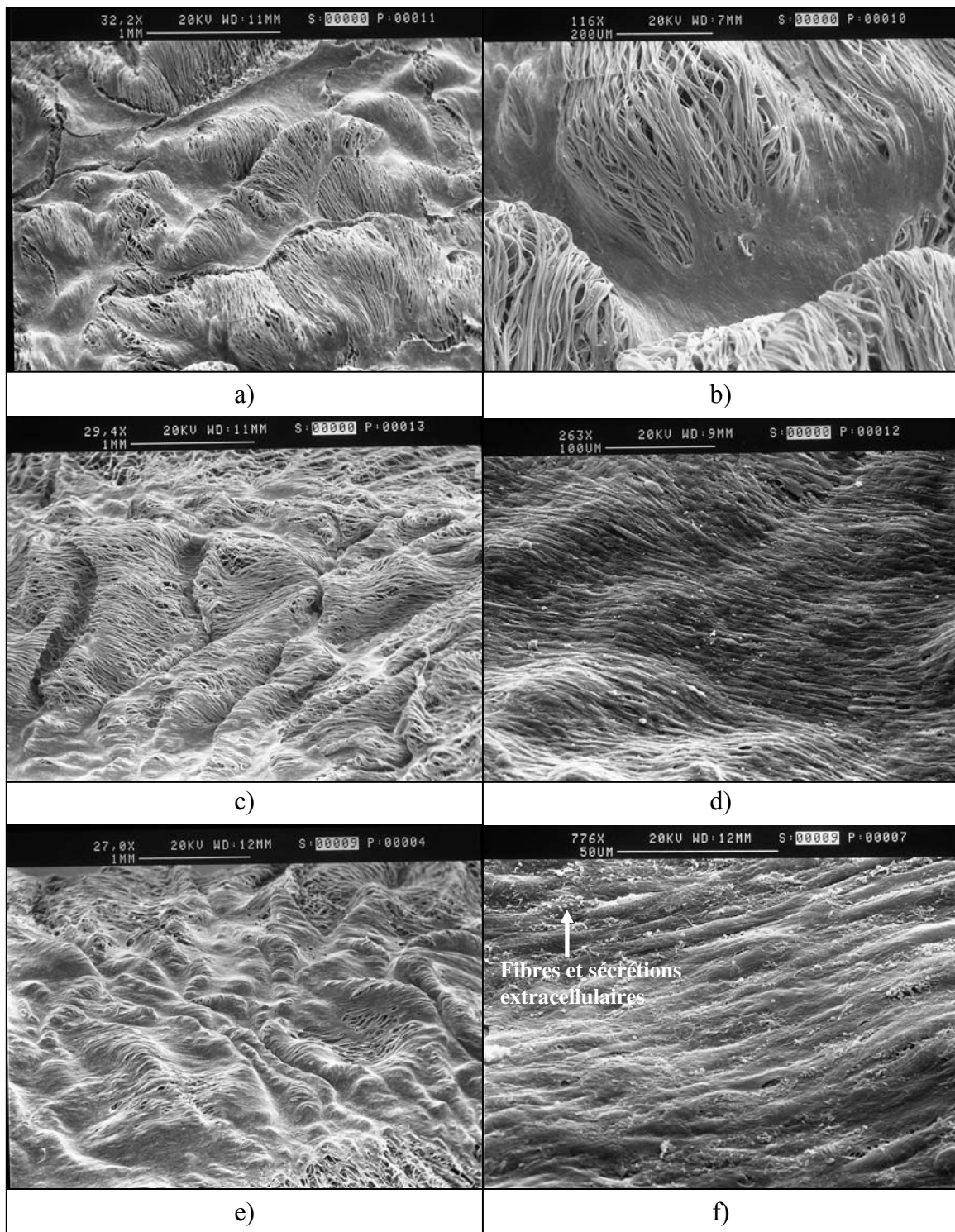


Figure 4.47 : Morphologie des cellules ensemencées sur les composites tissés Vicryl/microfibres. a) et b) J1, c) et d) J3, e) et f) J14.

Après 24 h de culture, les cellules ne recouvrent pas entièrement la surface du scaffold et ont adhéré majoritairement dans les creux créés par la forme des mailles du tissé (figure 4.47 a) et b)). Certaines cellules commencent à être alignées selon la direction des fibres bien que ce phénomène soit moins flagrant que pour les fibres alignées seules (cf. figure 4.47). Ceci est probablement dû à la perturbation engendrée par la structure tissée lors de la déposition. Le degré d'alignement des fibres est moindre sur les structures tissées que pour la déposition de fibres alignées seules. Les cellules ne s'orientent pas toutes selon la direction globale des fibres.

A J3, les cellules ont recouvert la majeure partie du scaffold, bien que certaines zones périphériques ne soient pas entièrement colonisées. Dans les zones de confluence les cellules sont parfaitement alignées (figure 4.47 c) et d)). A partir de J7, l'observation des différents scaffolds propose toujours la même morphologie, c'est-à-dire un tapis de cellules, presque toutes alignées, qui a entièrement recouvert les microfibrilles (figure 4.47 e) et f)). Nous observons aussi une forte sécrétion de la matrice extracellulaire avec la présence de fibres et de vésicules (figure 4.48) comme décrit précédemment.

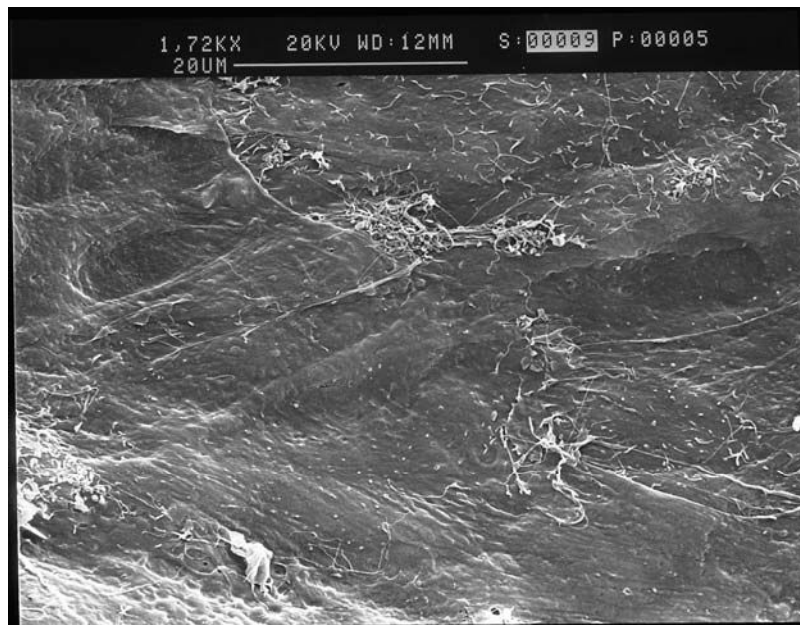


Figure 4.48 : Morphologie des cellules et mise en évidence de sécrétion extracellulaire.

En résumé, cette étude a permis à partir de deux techniques différentes de mise en forme (tricotage et *electrospinning*) de fabriquer des scaffolds imitant la morphologie des ligaments et tendons. Les fibres alignées possèdent un diamètre moyen de 2,6 μm et lorsque les cellules

ont adhéré, elles s'orientent selon la direction des fibres. Une forte sécrétion extracellulaire a été observée.

4.5.3 Discussion

4.5.3.1 Membranes fibreuses

L'étude portant sur l'évaluation des membranes fibreuses a permis de vérifier leur biocompatibilité. L'orientation spontanée des cellules selon la direction des microfibrilles est un résultat qui était attendu puisqu'il est déjà largement décrit dans la littérature [XU 04] [LEE 05] [YAN 05]. La valeur du pourcentage de réduction sur les fibres alignées est sensiblement supérieure à celle des fibres déposées de façon aléatoire (cf. figure 4.40). Cela semble indiquer que le métabolisme des cellules sur les fibres alignées est plus important. La présence de vésicules ayant été observée uniquement pour les cellules alignées, il est alors possible d'affirmer que l'alignement des cellules, induit par l'orientation des microfibrilles obtenues par déposition, stimule le métabolisme cellulaire de la synthèse de la matrice extracellulaire.

Lee et *al.* ont eux aussi reporté ce fait [LEE 05]. Ils ont montré que les cellules alignées synthétisent plus de collagène. Cet effet semble cependant diminuer lorsque le temps de culture augmente. Après 3 jours de culture, les cellules alignées synthétisent 3 fois plus de collagène, et après 7 jours ce facteur chute à 1,5. L'alignement cellulaire spontané induit donc une hausse de la synthèse collagénique.

4.5.3.2 Méthode de fabrication

La fabrication des structures composites tissé/microfibrilles est un procédé original et innovant. L'utilisation couplée du tissage et de l'*electrospinning* permet d'obtenir des scaffolds dont les propriétés morphologiques sont similaires à celles du ligament et du tendon, c'est-à-dire qu'ils sont composés de fibres parallèles. Sahoo et *al.* ont développé des structures tissées sur lesquelles ils ont déposé de façon aléatoire des microfibrilles de PLGA (65/35) [SAH 06]. Ces structures permettent, comme les nôtres, un ensemencement aisé et facile à contrôler. Les résultats obtenus en conditions statiques semblent montrer que les cellules ont bien adhéré et proliféré sur la couche de nanofibrilles (il y a augmentation de la synthèse collagénique et des glycoaminoglycanes). Cependant, ce type de scaffold n'est pas optimal pour plusieurs raisons. La première raison vient du choix du polymère composant les microfibrilles. Le PLGA, comme l'ensemble des copolymères lactique-glycolique, est un polymère assez rigide. Le comportement à traction de membranes fibreuses de PLLA ($M_w = 650\,000\text{ g.mol}^{-1}$) a été testé

[BHA 06]. Les membranes font preuve d'une rigidité assez importante puisque le module d'élasticité est de l'ordre de 400 MPa. Les fibres de PLLA ou de PLGA, étant trop rigides, vont se détacher de la structure tissée pendant les cycles de déformation. Sahoo et *al.* n'ont pas testé la réaction des cellules lorsque les scaffolds sont soumis à un étirement cyclique [SAH 06]. J'ai cependant eu l'occasion de rencontrer Sambit Sahoo, et lors de cette discussion, il a reconnu qu'il avait des problèmes d'adhérence des microfibres sur les structures tissées une fois que celles-ci sont soumises à un étirement cyclique. Il est fort probable que cela soit dû à la trop grande rigidité du PLGA. L'utilisation d'un copolymère PLCL (70/30) permet d'introduire des segments moins rigides dans le squelette polymère et d'éviter ainsi que les microfibres ne se détachent du support. Des essais avec de la PCL, polymère très peu rigide, ont été effectués. La technique de déposition est la même et nous avons obtenu des scaffolds similaires à ceux décrits dans la partie précédente. Nous avons préféré continuer à travailler avec le PLCL (70/30) en raison de son meilleur comportement à traction. He et *al.* en évaluant le comportement à traction de membranes fibreuses de ce même copolymère ont montré qu'elles possèdent une zone élastique jusque 5% de déformation [HE 05]. En revanche, et d'après nos propres expériences, les membranes fibreuses de PCL à 37°C et subissant un essai de traction, se déforment de façon irréversible, et ce, même à faibles déformations. La PCL ne convenait donc pas pour notre application. Il est possible que des meilleurs résultats soient obtenus en utilisant un polymère élastique tel que le PLCL (50/50). Kwon et *al.* ont synthétisé un tel polymère et ont caractérisé le comportement mécanique des microfibres. Ils ont prouvé que ce polymère est très élastique [KWO 05].

La seconde raison tire son origine dans le manque d'adhérence naturel de tous types de microfibres sur un substrat. Le coating préalable des structures tissées est nécessaire pour que les fibres adhèrent correctement sur les mailles du tissé. Une autre méthode développée par Kim et *al.* permet de fusionner les microfibres [KIM 07]. En plaçant, pendant quelques secondes, des membranes de PCL dans un four à convection chauffé à 100°C, ces chercheurs ont observé une fusion des microfibres. Cette technique pourrait elle aussi permettre une meilleure adhésion des microfibres sur le tissé. Nous avons testé une technique différente, consistant à placer les composites dans une atmosphère saturée en solvant (chloroforme dans ce cas) pendant 10 à 30 min. Les résultats obtenus n'ont pas été satisfaisants puisque les microfibres fusionnaient entre elles mais n'adhéraient pas sur le tissé. Le coating de polymère semble être ainsi la méthode la plus efficace. Il faut cependant que les microfibres arrivent « mouillées » sur la structure tissée pour qu'elles fusionnent avec le coating. C'est pourquoi la distance de déposition a été ramenée à 8 cm.

4.5.3.3 Comportement mécanique

Lors de la marche ou d'un mouvement, ce sont les fibres de collagène du LCA qui subissent les efforts et les déformations et qui déterminent la résistance à traction. Dans le cas des structures tissées, la résistance à la traction est fonction de la structure tissée. Lorsqu'une déformation est imposée, la structure tissée va subir l'ensemble des efforts mais les fibres vont aussi se déformer longitudinalement, permettant le transfert de l'étirement aux cellules qui ont adhéré sur les microfibrilles. Pour des déformations importantes, engendrant alors des contraintes importantes, il est probable que le tapis de microfibrilles se détache du tissé ou bien se rompe. Ces scaffolds sont destinés à une utilisation dans un bioréacteur où les déformations qu'ils subiront ne dépasseront pas 10%. Nous restons dans la zone en « J », la zone de déformation sans efforts des structures tissées (cf. paragraphes 4.3.2.2.2 et 4.3.2.2.3). Des cycles de stretching appliqués manuellement montrent que les microfibrilles sont étirées en même temps que la structure tissée. Les déformations vont donc être transmises aux cellules lors de l'étirement.

4.5.3.4 Alignement cellulaire et stretching

La conjonction de la mesure du niveau d'activité métabolique des cellules et les observations en microscopie électronique montrent que les cellules sont en train de proliférer. Nous avons aussi retrouvé la présence de vésicules et de fibres extracellulaires. La morphologie des composites permet spontanément de stimuler la synthèse de la matrice extracellulaire. Cette synthèse peut être d'autant plus stimulée si les scaffolds sont utilisés dans un bioréacteur de traction-torsion cyclique. Les déformations subies par les cellules provoquent à la fois une synthèse de la matrice extracellulaire mais aussi une différenciation des cellules souches [ALT 02a]. Dès les années 60, des chercheurs ont remarqué que les efforts mécaniques, tels que l'étirement ou la compression, conduisent à des changements de la morphologie des cellules souches. Andrew et *al.* ont montré la possibilité de différenciation cellulaire lorsque le taux d'oxygène est ajusté et en appliquant une compression, ou un étirement [AND 61]. Ces auteurs ont observé la formation d'os lorsque les cellules sont soumises à une compaction et à un taux d'oxygène de 35%. La formation de cellules similaires à des chondrocytes a été observée pour un taux d'oxygène plus faible. Ces auteurs ont étudié l'effet d'une vitesse d'étirement constante sur les cellules et ont montré la synthèse de fibres de collagène s'alignant selon la direction d'étirement. Plus récemment, Altmann et *al.* ont montré que le stretching induit une prolifération et un alignement cellulaire dans la direction de l'étirement [ALT 02a]. La synthèse des collagènes des types I et III a été observée pour les cultures

subissant un étirement cyclique alors que ce phénomène est peu marqué pour les cultures en conditions statiques. Ces résultats sont confirmés par de nombreux Groupes de recherche [KIM 02] [NAK 02] [WAN 04] [YAN 04] [IGN 05] [LEE 05].

L'utilisation des composites tissé/microfibres dans un bioréacteur devrait permettre de stimuler de façon importante la synthèse de la matrice extracellulaire afin de pouvoir développer une prothèse biologique. Le temps de culture *in vitro* d'une telle prothèse n'est pas encore défini mais nous avons de bonnes raisons de penser qu'il sera de plusieurs mois. Il a fallu 10 semaines de culture *in vitro* à Cao et *al.* pour développer un néo-tendon dont la force à la rupture est de 2 N [CAO 06]. Il nous faut bien évidemment élaborer des tissus dont les propriétés mécaniques sont plus importantes. L'étude menée par ces auteurs a été effectuée dans des conditions statiques ou quasi-statiques, car aucun effort cyclique n'a été appliqué au système. Le néo-tendon, ayant subi du fluage pendant toute la durée de la culture, est tout de même plus résistant que le néo-tendon témoin. Preuve est ainsi faite que des efforts mécaniques peuvent améliorer les propriétés biomécaniques des tissus cultivés. Des questions de taille restent cependant à résoudre à savoir :

- dans quelles proportions les cycles mécaniques peuvent remodeler le tissu *in vitro* et stimuler la synthèse collagénique ?
- les fibres de collagène formées ont-elles la capacité de s'assembler de façon à augmenter leur résistance mécanique ?
- quel est le temps de culture optimal avant de pouvoir implanter la prothèse biologique ?

A ces interrogations, seule l'expérimentation peut apporter les réponses ou tout du moins des éléments de réponse.

La culture *in vitro* du néo-tendon ou du néo-ligament devra vraisemblablement s'étendre sur plusieurs mois. Il semble préférable alors d'utiliser les scaffolds en soie qui se dégradent lentement (> 1 an) [ARA 04] [HOR 05], afin de conserver des performances mécaniques stables pendant le développement du néo-tissu.

4.5.3.5 Source cellulaire

Le choix de la source cellulaire est un facteur clé de la stratégie de régénération. En effet, le type cellulaire va déterminer les conditions biochimiques et mécaniques de la culture.

L'utilisation des cellules souches mésenchymateuses possède de réels avantages, comparée à d'autres types cellulaires (fibroblastes ligamentaires, de la peau, adipocytes, etc.). Ce type

cellulaire est facile à prélever, à isoler et à caractériser (les marqueurs spécifiques aux cellules souches humaines et de nombreux animaux sont disponibles sur le marché). La culture des cellules est rapide puisque ces cellules prolifèrent en l'espace de quelques jours à quelques semaines [VAN 04]. Ces cellules sont disponibles en grand nombre après un temps de culture raisonnable. En comparant la prolifération de fibroblastes ligamentaires, de fibroblastes, de la peau et de cellules souches mésenchymateuses, il a été prouvé que le dernier type cellulaire prolifère plus vite, sécrète plus de collagène, et que les cellules contiennent plus d'ADN que les autres types cellulaires [VAN 04] [GE 05b]. Puisqu'elles sont indifférenciées, il est nécessaire d'ajouter dans le milieu de culture des facteurs de croissance dirigeant la différenciation des cellules vers le fibroblaste ligamentaire. Altman et *al.* ont montré que l'application de stimulation mécanique permet de favoriser la synthèse de collagène des types I et II et de tenascine C [ALT 02a]. Les cellules souches mésenchymateuses semblent donc répondre à nos besoins.

Il convient cependant de considérer les autres types cellulaires. Il nous faut écarter les cellules fibroblastiques ligamentaires autologues puisqu'elles ne sont pas utilisables pour une application clinique de cette stratégie d'ingénierie tissulaire à cause de leur faible disponibilité et des difficultés de prélèvement. En revanche, les fibroblastes de la peau peuvent être une alternative intéressante en raison de la facilité de prélèvement. Ces cellules font preuve d'une capacité de prolifération permettant d'obtenir un nombre importants de cellule assez rapidement. Le principal attrait de ces cellules est qu'elles sont déjà différenciées, autorisant la synthèse des collagènes des types I et III sans nécessiter l'ajout de facteurs de différenciation. Il n'existe pas à ma connaissance d'étude *in vivo* comparant le comportement des fibroblastes de la peau et celui des cellules souches. Une telle étude pourrait voir l'émergence d'arguments en faveur ou en défaveur de l'un ou l'autre de ces types cellulaires.

Pour résumer ce paragraphe, nous avons élaboré un scaffold répondant toujours à notre cahier des charges. C'est-à-dire qu'il est biocompatible, tridimensionnel et poreux. Il imite la structure des tissus ligamentaires et tendineux puisqu'il est constitué de fibres de polyester alignées et dégradables. Nous avons développé une technique de fabrication originale, couplant le tissage et l'*electrospinning*, nous permettant de déposer des microfibres alignées adhérant correctement sur les mailles des tissés. Nous avons aussi montré l'alignement des cellules selon la direction des fibres. Nous avons observé les manifestations d'une importante synthèse matricielle des cellules, en réponse à leur alignement, par la présence de vésicules et de fibres extracellulaires.

4.6 Conclusion

Nous avons développé différents types de scaffolds, l'un biodégradable en PLGA (Vicryl) et l'autre en soie (Mersilk) pour l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament. Nous avons montré que ces structures tissées possèdent un comportement à traction similaire à celui du ligament dans le sens où elles se déforment jusqu'à 10% sans élévation de la contrainte. Nous avons soumis l'idée qu'il est possible d'ajuster certains paramètres tels que la force à rupture. La dégradation par hydrolyse des tissés Vicryl a aussi été étudiée, et nous avons montré que la viscosité intrinsèque du polymère et les propriétés mécaniques sont fortement liées puisque ces deux paramètres chutent régulièrement au cours de la dégradation. Nous avons relaté que ces scaffolds ont perdu l'essentiel de leurs propriétés mécaniques après 5 semaines d'immersion dans du milieu de culture. Les scaffolds Vicryl conservent cependant la forme de la courbe en « J » même lorsqu'ils sont dégradés.

Nous avons testé la biocompatibilité des scaffolds, et afin de résoudre les problèmes d'ensemencement dus à la grande porosité, nous avons développé deux techniques différentes de post-traitement des structures. La première technique se base sur l'encapsulation des cellules dans un gel d'alginate et l'autre méthode utilise la technique d'*electrospinning* pour déposer des microfibres sur les structures permettant un ensemencement par sédimentation.

Nous avons montré que les composites tissé/alginate sont biocompatibles et que l'apport de cellules souches mésenchymateuses, effectué par ces structures, améliore la régénération des tendons d'Achille du lapin. Les structures tissées, possédant une porosité entièrement interconnectée, permettent la croissance tissulaire *in vivo*.

Le développement des composites tissé/microfibres a permis l'obtention de structures imitant, d'un point de vue morphologique, l'organisation interne des ligaments et des tendons, puisque ces scaffolds sont composés de fibres alignées. Ces composites ont fait preuve de biocompatibilité sur plusieurs semaines et nous avons observé, pour des conditions statiques, l'alignement des cellules selon la direction des fibres. L'alignement cellulaire stimule la sécrétion extracellulaire puisque de nombreuses vésicules et fibres ont été observées.

Ces scaffolds seront utilisés dans un bioréacteur permettant l'application d'un étirement et d'une torsion cyclique. La suite des travaux traitera de la caractérisation des composants de la matrice extracellulaire et de l'impact de la traction-torsion sur la différenciation des cellules souches.

Conclusions

L'ingénierie tissulaire est un domaine en plein essor, possédant un intérêt clinique certain puisque cela permettrait de reconstruire des tissus à la demande. S'appuyant sur les techniques de la thérapie cellulaire, par l'utilisation de cellules autologues, l'ingénierie tissulaire semble pouvoir résoudre les problèmes de disponibilité des greffons et d'immunocompatibilité. Il existe plusieurs stratégies de reconstruction tissulaire, et celle ayant attiré notre attention se base sur l'emploi de systèmes de culture tridimensionnels, biocompatibles et biodégradables, suppléant à la fonction du tissu endommagé pendant que celui-ci se régénère. La régénération du tissu intervient généralement en deux phases successives, la première s'effectuant *in vitro* pour permettre une synthèse contrôlée de la matrice extracellulaire, et la seconde consistant à implanter le tissu biologique cultivé *in vitro*. Bien que de nombreuses études traitent de ce sujet, il n'y a jusqu'à aujourd'hui, que peu d'applications cliniques en raison des limitations rencontrées dès lors que des cellules sont cultivées dans des structures tridimensionnelles.

L'objectif de ce travail de thèse était de développer et d'évaluer des scaffolds en polyesters aliphatiques, matériaux biodégradables, possédant une architecture permettant la diffusion et la circulation des gaz et des nutriments jusqu'au centre des structures pendant la culture *in vitro*.

Je me suis alors intéressé à plusieurs techniques de fabrication ; *le solvent casting/leaching out*, *l'electrospinning* et le tissage ou plus exactement le tricotage de fils de polyester.

La première technique, *le solvent casting/leaching out*, bien que simple de mise en place, ne permettait pas l'élaboration de scaffolds où les cellules pouvaient se développer en raison du manque d'interconnexion entre les pores. J'ai modifié ce procédé en effectuant un traitement thermique sur le porogène, du sucre, pour obtenir des particules sphériques. La seconde étape de cette technique était de faire pénétrer une solution de polymère dans un assemblage de particules sphérolisées. Une fois le solvant évaporé, et le sucre éliminé, nous avons obtenu des scaffolds dont la porosité était ouverte, possédant des passages d'interconnexion entre les pores de 20 à 100 μm . J'ai effectué une évaluation mécanique et biologique qui a prouvé qu'il

était possible d'ajuster les propriétés mécaniques, et que les cellules pouvaient survivre au centre des structures. Une fois ces scaffolds implantés chez le rat, nous avons observé une colonisation tissulaire presque complète après 17 jours.

La seconde technique, *l'electrospinning*, que j'ai développée au laboratoire, permet la fabrication de microfibres de polymère. Une étude de cas a été utile pour vérifier quels étaient les paramètres dirigeant ce procédé et nous avons finalement déterminé les conditions adéquates pour la déposition de fibres possédant des diamètres supérieurs au micromètre. Un tambour rotatif a été fabriqué pour aligner ces fibres et pour obtenir des structures anisotropes. Nous avons procédé à une évaluation biologique qui a montré que les cellules adhèrent et prolifèrent sur ces structures fibreuses. Nous avons aussi, par un travail collaboratif, pu modifier la charge des fibres en utilisant un mélange de poly- ϵ -caprolactone et d'Eudragit RS. Les fibres obtenues sont alors positivement chargées, ce qui pourrait améliorer l'adhésion cellulaire, les cellules étant globalement négativement chargées.

La technique de tricotage a permis la conception de structures à la fois flexibles et résistantes à la traction. Une étude de la dégradation des scaffolds a montré la perte progressive des propriétés mécaniques au cours du temps. J'ai développé deux techniques permettant d'effectuer un ensemencement cellulaire simple. La première technique a consisté à encapsuler des cellules dans un gel d'alginate qui lui-même encapsule le scaffold. Une évaluation *in vivo* chez le lapin a montré le bienfait de l'apport, par ces scaffolds, de cellules souches mésenchymateuses au niveau d'une lésion pratiquée au tendon d'Achille du lapin. Ces scaffolds n'étant pas adéquats pour une culture *in vitro*, j'ai effectué, par *electrospinning*, un post-traitement des scaffolds tissés. Cette technique a permis la déposition d'une couche de microfibres alignées et adhérentes aux mailles de la structure. L'évaluation biologique a montré l'alignement des cellules selon la direction des fibres et une forte sécrétion extracellulaire

Perspectives

Les travaux présentés dans ce mémoire se sont essentiellement attachés à l'aspect matériaux des scaffolds élaborés par les différentes techniques. L'étude des interactions cellules/scaffolds n'a pas été très poussée puisqu'elle a consisté uniquement à vérifier la biocompatibilité des structures.

A mon sens, les prochains travaux devraient s'orienter vers la modification de surface des scaffolds. On pourrait éventuellement envisager le greffage de groupements hydrophiles pour les surfaces en contact avec les cellules permettant une adhésion accrue.

Il conviendrait aussi de vérifier l'état de différenciation des cellules souches sur les membranes fibreuses afin d'évaluer l'impact de cet environnement imitant la matrice extracellulaire.

Les prochains travaux concernant l'ingénierie tissulaire du tendon et du ligament utiliseront vraisemblablement les composites tissé/microfibres, il sera alors nécessaire de caractériser les sécrétions extracellulaires qui ont été observées. D'un point de vue mécanique, l'utilisation d'un polymère élastique dans la déposition des microfibres permettrait d'améliorer l'adhérence des fibres sur les mailles puisque ces dernières seraient moins rigides.

Références bibliographiques

- [ALB 89] B. Alberts, D. Bray, J. Lewis, M. Raff, K. Roberts, J.D. Watson, Cell adhesion, cell junctions, and the extracellular matrix, Chap. 14 in Molecular biology of the cell (second edition), Garland Publishing Inc, New York & London, 1989, p. 808-814.
- [ALT 02a] G.H. Altmann, R.L. Horan, I. Martin, J. Farhadi, P.R.H Stark, V. Volloch, J.C. Richmond, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, Cell differentiation by mechanical stress. The FASEB Journal 2002, 16, 270-272.2
- [ALT 02b] G.H. Altman, R.L. Horan, H.H. Lu, J. Moreau, I. Martin, J.C. Richmond, D.L. Kaplan, Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments. Biomaterials 2002, 23, 4131-4141.
- [ALT 03] G.H. Altman, F. Diaz, C. Jakuba, T. Calabro, R.L. Horan, J. Chen, H. Lu, J. Richmond, D.L. Kaplan, Silk-based biomaterials. Biomaterials 2003, 24, 401-416.
- [AND 61] C. Andrew, L. Bassett, I. Herrmann, Influence of oxygen concentration and mechanical factors on differentiation of connective tissues *in vitro*. Nature 1961, 190, 460-461.
- [ARA 04] T. Arai, G. Freddi, R. Innocenti, M. Tsukada, Biodegradation of Bombyx mori silk fibroin fibers and films. J. Appl. Polym. Sci. 2004, 91, 2383-2390.
- [AWA 03] H.A. Awad, G.P. Boivin, M.R. Dressler, F.N.L. Smith, R.G. Young, D.L. Butler, Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. J. Orthop. Res. 2003, 420-431.
- [BAB 06] V. Babak, F. Baros, F. Desbrieres, J. Huilier, H. Kildeeva, P. Maincent, 4th World Congress on Emulsions, Lyon, France, 2006, 270.
- [BAR 04] J.J.A. Barry, H.S. Gidda, C.A. Scotchford, S.M. Howdle, Porous methacrylate scaffolds : supercritical fluid fabrication and *in vitro* chondrocyte responses. Biomaterials 2004, 25, 3559-3568.
- [BAS 06] C.A. Bashur, L.A. Dahlgren, A.S. Goldstein, Effect of fiber diameter and orientation on fibroblast morphology and proliferation on electrospun poly(D,L-lactic-co-glycolic) acid meshes. Biomaterials 2006, 27, 5681-5688.

- [BEL 03] G. Bellier, P. Christel, P. Colombet, P. Djian, J.-P. Franceschi, A. Sbihi, La reconstruction du ligament croisé antérieur par greffe à deux faisceaux utilisant les tendons de la patte d'oie. *Maîtrise Orthopédique* Novembre 2003, n° 128.
- [BER 95] J.E. Bergsma, W.C de Bruijn, R.R.M. Bos, G. Boering, Late degradation response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 1995, 16, 25-31.
- [BHA 06] S.R. Bhattarai, N. Bhattarai, P. Viswanathamurthi, H.W. Yi, P.H. Hwang, H.Y. Kim, Hydrophilic nanofibrous structures of polylactide, fabrication and cell affinity. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2006, 78, 247-257.
- [BIR 97] D.E. Birk, R. Mayne, Localization of collagen types I, III and V during tendon development. Changes in collagen types I and III are correlated with changes in fibril diameter. *Eur. J. Cell Biol.* 1997, 72, 352-361.
- [BÖL 05] N. Bölgen, Y.Z. Menceloğlu, K. Acatay, I. Vargel, E. Pişkin, *In vitro* and *in vivo* degradation of non-woven materials made of poly(ϵ -caprolactone) nanofibers prepared by electrospinning under different conditions. *J. Biomater. Sci. Polymer Edn*, 2005, 16, 1537-1555.
- [BRA 97] K.I. Draget, G. Skjåk-braek, O. Smidsrød, Alginate based new materials. *Inter. J. Biol. Macrom.* 1007, 21, 47-55.
- [BRI 05] R. Brigido Diego, M. Perez Olmedilla, A. Serrano Aroca, J.L. Gomez Ribelles, M. Monleon Pradas, G. Gallego Ferrer, M. Salmeron Sanchez, Acrylic scaffolds with interconnected spherical pores and controlled hydrophilicity for tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2005, 16, 693-698.
- [CAI 03] Z. Cai, G. Cheng, Novel method to produce poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds with controlled multi-pore size. *J. Mater. Sci. Letters* 2003, 22, 153-155.
- [CAL 04] S. Calve, R.G. Dennis, P.E. Kosnik, K. Baar, K. Grosh, E.M. Arruda, Engineering of functional tendon. *Tissue Engineering* 2004, 10, 755-761.
- [CAO 06] D. Cao, W. Liu, X. Wei, F. Xu, L. Cui, Y. Cao, *In vitro* tendon engineering with avian tenocytes and polyglycolic acids : A preliminary report. *Tissue Engineering* 2006, 12, 1369-1377.
- [CAR 04] J.S. Cartmell, M.G. Dunn, Development of cell-seeded patellar tendon allografts for anterior cruciate ligament reconstruction. *Tissue Engineering* 2004, 10, 1065-1075.

- [CAS 04] C.L. Casper, J.S. Stephens, N.G. Tassi, D.B. Chase, J.F. Rabolt, Controlling surface morphology of electrospun polystyrene fibers. Effect of humidity and molecular weight in the electrospinning process. *Macromolecules* 2004, 37, 573-578.
- [CHE 01] G. Chen, T. Ushida, T. Tateishi, Preparation of poly(L-lactic acid) and poly(DL-lactic-co-glycolic acid) foams by use of ice microparticulate. *Biomaterials* 2001, 22, 2563-2567.
- [CHE 03] G. Chen, U. Takashi, R. Hirochika, Y. Shirasaki, N. Ochiai, T. Tateishi, The use of a novel PLGA/collagen composite web as a scaffold for engineering of articular cartilage tissue with adjustable thickness. *J. Biomed. Mat. Res.* 2003, 67A, 1170-1180.
- [CHE 04] V.J. Chen, P.X. Ma, Nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds with interconnected spherical macropores. *Biomaterials* 2004, 25, 2065-73.
- [CHE 05] G. Chen, D. Liu, N. Maruyama, H. Ohgushi, J. Tanaka, T. Tateishi, Cell adhesion of bone marrow cells, chondrocytes, ligament cells and synovial cells on a PLGA-collagen hybrid mesh. *Mater. Sci. Eng. C* 2005, 24, 867-873.
- [CHI 07] J.B. Chiu, C. Liu, B.S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou, Functionalization of poly(L-lactide) nanofibrous scaffold with bioactive collagen molecules, *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2007, in press.
- [CHU 82] C.C. Chu, The *in vitro* degradation of poly(glycolic acid) sutures-effect of pH. *J. Biomed. Mater. Res.* 1982, 16, 117-124.
- [CIO 06] M. Ciobanu, A. Siove, V. Gueguen, L.J. Gamble, D.G. Castner, V. Migonney, Radical graft polymerization of styrene sulfonate on poly(ethylene terephthalate) films for ACL applications : « Grafting from » and chemical characterization. *Biomacromol.* 2006, 7, 755-760.
- [COO 05] J.A. Cooper, H.H. Lu, F.K. Ko, J.W. Freeman, C.T. Laurencin, Fiber-based tissue-engineering scaffold for ligament replacement : design considerations and *in vitro* evaluation. *Biomaterials* 2005, 26, 1523-1532.
- [COS 07] J.W. Costerton, The role of bacterial biofilms in regenerative medicine. International symposium on bioengineering and regenerative medicine, Mulhouse 24-26 septembre 2007.

- [CRI 05] S. Cristino, F. Grassi, A. Piacenti, B. Grigolo, S. Santi, M. Ricio, E. Tognana, A. Facchini, G. Lisignoli, Analysis of mesenchymal stem cells grown on a three-dimensional HYAFF 11® -based prototype ligament scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2005, 73, 275-283.
- [CRO 05] B.B. Crow, A.F. Borneman, D.L. Hawkings, G.M. Smith, K.D. Nelson, Evaluation of *in vitro* drug release, pH change, and molecular weight degradation of poly(L-lactic acid) and poly(D,L-lactide-co-glycolide) fibers.
- [CRO 06] T.I. Croll, A.J. O'Connor, G.W. Stevens, J.J. Cooper-White, A blank state? Layer by layer deposition of hyaluronic acid and chitosan onto various surfaces. *Biomacromolecules* 2006, 7, 1610-1622.
- [DEM 02] M.M. Demir, I. Yilgor, E. Yilgor, B. Erman, Electrospinning of polyurethane fibers. *Polymer* 2002, 43, 3303-3309.
- [DEN 05] M. Deng, J. Zhou, G. Chen, D. Burkley, Y. Xu, D. Jamiolkowski, T. Barbolt, Effect of load and temperature on *in vitro* degradation of poly(glycolide-co-L-lactide) multifilament braids. *Biomaterials* 2005, 26, 4327-4336.
- [DES 87] J.-D. Desse, Traitement chirurgical des ruptures fraîches du ligament croisé antérieur par suture renforcée d'une plastie au tendon rotulien (A propos de 63 cas), Thèse de Médecine, Faculté de Médecine de Nancy, 1987.
- [DUN 95] M.G. Dunn, J.B. Liesch, M.L. Tiku, J.P. Zawadsky, Development of fibroblast-seeded ligament analogs for ACL reconstruction. *J. Biomed. Mater. Res.* 1995, 29, 133-1371.
- [DUT 06] V.B. Duthon, C. Barea, S. Abrassart, J.H. Fasel, D. Fritschy, J. Ménétrey, Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surg. Sport Traumatol. Arthrosc* 2006, 14, 203-213.
- [FON 99] H. Fong, I. Chun, D.H. Reneker, Beaded nanofibers formed during electrospinning. *Polymer* 1999, 40, 4585-4592.
- [FOR 34] A. Formhals, Process and apparatus for preparing artificial threads. US Patent 1934, 1, 975, 504.
- [FRA 97] C.B. Frank, D.W. Jackson, Thescience of reconstruction of the anterior cruciate ligament. *J. Bone Joint Surg.* 1997, 79, 1556-1576.
- [FRO 02] J.D. Fromstein, K.A. Woodhouse, Elastomeric biodegradable polyurethane blends for soft tissue applications. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2002, 13, 391-406.

- [FUN 05] T. Funakoshi, T. Majima, N. Iwasaki, S. Yamane, T. Masuko, A. Minami, K. Harada, H. Tamura, S. Tokura, S.-I. Nishimura, Novel chitosan-based hyaluronan hybrid polymer fibers as a scaffold in ligament tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2005, 74, 338-346.
- [GAO 98] J. Gao, L. Niklason, R. Langer, Surface hydrolysis of poly(glycolic acid) meshes increases the seeding density of vascular smooth muscle cells, *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 42, 417-424.
- [GAR 04] J.M. Garza, P. Schaaf, S. Muller, V. Ball, J.-F. Stoltz, J.-C. Voegel, P. Lavallo, Multicompartment films made of alternate polyelectrolyte multilayers of exponential and linear growth. *Langmuir* 2004, 20, 7298-7302.
- [GE 05a] Z. Ge, J.C.H. Goh, L. Wang, E.P.S. Tan, E.H. Lee, Characterization of knitted polymeric scaffolds for potential use in ligament tissue engineering. *J. Biomat. Sci.: Polym. Ed.* 2005, 16, 1179-1192.
- [GE 05b] Z. Ge, J.C. Goh, E.H. Lee, Selection of cell source for ligament tissue engineering. *Cell. Transplant.* 2005, 14, 573-583.
- [GEF 06] A. Gefen, J. Chen, D. Elad, State of knowledge in structural mechanics of penile erection, and some areas of ignorance. 5th world congress of Biomechanics, Munich, Germany, 29 juillet- 4 août, *J. Biomech.* 2006, 39, S345.
- [GEN 03] E. Gentleman, A.N. Lay, D.A. Dicherson, E.A. Nauman, G.A. Livesai, K.C. Dee, Mechanical characterization of collagen fibers and scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2003, 24, 3805-3813.
- [GEN 06] E. Gentleman, G.A. Liversay, K.C. Dee, E.A. Nauman, Development of ligament-like structural organization and properties in cell-seeded collagen scaffolds *in vitro*. *Ann. Biomed. Eng.* 2006, 34, 726-736.
- [GIN 87] R. Ginde, R.K. Gupta, *In vitro* degradation of poly(glycolic acid) pellets and fibres. *J. Appl. Polym. Sci.* 1987, 33, 2411-2429.
- [GIS 02] K. Gisselält, B. Edberg, P. Flodin, Synthesis and properties of degradable poly(urethane urea)s to be used for ligament reconstructions. *Biomacromolecules* 2002, 3, 951-958.
- [GLO 88] R. Glousman, C. Shields, R. Kerlan, F. Jobe, S. Lombardo, L. Yocim, J. Tibone, R. Gambardella, Gore-Tex prosthetic ligament in anterior cruciate deficient knees. *Am. J. Sports Med.* 1988, 16, 321-326.

- [GOH 03] J.C-H. Goh, H-W. Ouyang, S-H. Teo, C.K.C. Chan, E-H. Lee, Tissue engineering approach to the repair and regeneration of tendons and ligaments. *Tissue Engineering* 2003, 9, S31-S44.
- [GÖP 96] A. Göpferich, Mechanisms of polymer degradation and erosion. *Biomaterials* 1996, 17, 103-114.
- [GRE 05] G. Grenier, M. Rémy-Zoldhadri, D. Larouche, R. Gauvin, K. Baker, F. Bergeron, D. Dupuis, E. Langelier, D. Rancourt, F.A. Auger, L. Germain, Tissue reorganization in response to mechanical load increases functionality. *Tissue Engineering* 2005, 11, 90-100.
- [GRO 04] K.A. Gross, L.M. Rodriguez-Lorenzo. Biodegradable composite scaffolds with an interconnected spherical network for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2004, 25, 4955-4962.
- [GUP 07] B. Gupta, N. Regavade, J. Hilborn, Poly(lactic) fiber: An overview. *Prog. Polym. Sci.* 2007, 32, 455-482.
- [HAC 07] M. Hacker, M. Ringhofer, B. Appel, M. Neubauer, T. Vogel, S. Young, A.G. Mikos, T. Blunk, A. Göpferich, M.B. Schulz, Solid lipid templating of macroporous tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* 2007, 28, 3497-3507.
- [HAR 98] L.D. Harris, B.S. Kim, D.J. Mooney, Openpore biodegradable matrices formed with gas foaming. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 42, 396-402.
- [HAR 04] J. Harrison, S. Patanawong, J.S. Forsythe, K.A. Gross, D.R. Nisbet, H. Beh, T.F. Scott, A.O. Trounson, R. Mollard, Colonization and maintenance of murine embryonic stem cells on poly(α -hydroxy esters), *Biomaterials* 2004, 24, 4963-4970.
- [HE 05] W. He, Z. Ma, T. Yong, W.E. Teo, S. Ramakrishna, Fabrication of collagene coated biodegradable polymer nanofiber mesh and its potential for endothelial cells growth. *Biomaterials* 2005, 26, 7606-7615.
- [HEL 85] R. Hellio, A. Ryter, Role of particles electrostatic charge in adhesion and ingestion of dictyostelium discoideum amoeboid cells. *J. Cell Sci.* 1985, 79, 327-342.
- [HOL 00] S.J. Hollister, R.A. Levy, T.M.G. Chu, J.W. Halloran, S.E. Feinberg, An image based approach to design and manufacture craniofacial scaffolds. *Int. J. Oral/Maxillofac. Surg.* 2000, 29, 67-71.

- [HOR 05] R.L. Horan, K. Antle, A.L. Collette, Y. Wang, J. Huang, J.E. Moreau, V. Volloch, D.L. Kaplan, G.H. Altmann, *In vitro* degradation of silk fibroin. *Biomaterials* 2005, 26, 3385-3393.
- [HOU 03] Q. Hou, D.K. Grijpma, J. Feijen, Preparation of interconnected highly porous polymeric structures by a replication and freeze drying process. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 2003, 67, 732-740.
- [HUA 02] F.J. Hua, G.E. Kim, J.D. Lee, Y.K. Son, D.S. Lee, Macroporous poly(L-lactide) scaffold 1. Preparation of macroporous scaffold by liquid-liquid phase separation of a PLLA-Dioxane-Water system. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 2002, 63, 161-167.
- [HUA 03] F.J. Hua, T.G. Park, D.S. Lee, A facile preparation of highly interconnected macroporous poly(D,L-lactic acid-co-glycolic acid) scaffolds by liquid-liquid phase separation of a PLGA-dioxane-water ternary system. *Polymer* 2003, 44, 1911-1920.
- [HUT 01] D.W. Hutmacher, J.T. Schantz, I. Zein, K.W. Ng, S.H. Teoh, K.C. Tan, Mechanical properties and cell cultural response of poly- ϵ -caprolactone scaffolds designed and fabricated *via* fused deposition modeling. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 55, 203-216.
- [HUT 03] D.W. Hutmacher, K.W. Ng, C. Kaps, M. Sittinger, S. Kläring, Elastic cartilage engineering using novel scaffold architectures in combination with biomimetic cell carrier. *Biomaterials* 2003, 24, 4445-4458.
- [IGN 05] A. Ignatius, H. Blessing, A. Liedert, C. Schmidt, C. Neidlinger-Wilke, D. Kaspar, B. Friemert, L. Claes, Tissue engineering of bone : effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices. *Biomaterials* 2005, 311-318.
- [INA 05] R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Structure and properties of electrospun PLLA single nanofibers. *Nanotechnology* 2005, 16, 208-216.
- [JEO 07] S.I. Jeong, S.Y., Kim, S.K. Cho, M.S. Chong, K.S. Kim, H. Kim, S.B. Lee, Y.M. Lee, Tissue-engineered vascular grafts composed of marine collagen and PLGA fibers using pulsatile perfusion bioreactor. *Biomaterials* 2007, 28, 115-1122.
- [KAN 06] H.G. Kang, S.Y. Kim, Y.M. Lee, Novel porous gelatine scaffolds by overrun/particulate leaching process for tissue engineering applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 2006, 79, 388-397.

- [KAR 01] J. Kärtus, T. Movin, J. Karlsson, Donor-site morbidity and anterior knee problems after anterior cruciate ligament reconstruction using autografts. *Arthroscopy : J. Arthrosc. Rel. Surg.* 2001, 17, 971-980.
- [KAT 04] D.S. Katti, K.W. Robinson, F.K. Ko, C.L. Laurencin, Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery : Optimization of fabrications parameters. *J. Biomed Mater. Res. Part B* 2004, 70, 286-296.
- [KHA 02] G. Khang, J.-H. Choe, J.M. Rhee, H.B. Lee, Interaction of different types of cells on physicochemically treated poly(L-lactide-co-glycolide) surfaces. *J. Appl. Polym. Sci.* 2002, 85, 1253-1262.
- [KHI 05] M.-S. Khil, S.R. Bhattarai, H.-Y. Kim, S.-Z. Kim, K.-H. Lee, Novel fabricated matrix *via* electrospinning for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 2005, 72, 117-124.
- [KID 05] S. Kidoaki, I.K. Kwon, T. Matsuda, Mesoscopic spatial design of nano- and microfiber meshes for tissue engineering matrix and scaffold based on newly devised multilayering and mixing electrospinning techniques. *Biomaterials* 2005, 26, 37-46.
- [KIM 98] S.S. Kim, H. Utsunomiya, J.A. Koski, B.M. Wu, M.J. Cima, J. Sohn, K. Mukai, L.G. Griffith, J.P. Vacanti, Survival and function of hepatocytes on a novel three-dimensional synthetic biodegradable scaffold with an intrinsic network of channels. *Annals of Surgery* 1998, 22, 8-13.
- [KIM 02] S.-G. Kim, T. Akaike, T. Sasagawa, Y. Atomi, H. Kurosawa, Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Structure and Function* 2002, 27, 139-144.
- [KIM 07] G.H. Kim, W.D. Kim, Highly porous 3D nanofiber scaffold using an electrospinning technique. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 2007, 81, 104-110.
- [KWO 01] I.K. Kwon, K.D. Park, S.W. Choi, S.-H. Lee, E.B. Lee, J.S. Na, S.H. Kim, Y.H. Kim, Fibroblast culture on surface modified poly(glycolide-co- ϵ -caprolactone) scaffold for soft tissue regeneration. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn.* 2001, 12, 1147-1160.
- [KWO 05] I.K. Kwon, S. Kidoaki, T. Matsuda, Electrospun nano- to microfiber fabrics made of biodegradable copolyesters : structural characteristics, mechanical properties and cell adhesion potential. *Biomaterials* 2005, 26, 3929-3939.
- [LAN 93] R. Langer, J.P. Vacanti, *Tissue Engineering. Science* 1993, 260, 920-926.

- [LAN 06] J. Lannutti, D. Reneker, T. Ma, D. Tomasko, D. Farson, Electrospinning for tissue engineering scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* 2006, 27, 504-509.
- [LAU 99] C.T. Laurencin, A.M.A. Ambrosio, M.D. Borden, J.A. Cooper Jr, Tissue engineering : Orthopedic applications. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 1999, 1, 19-46.
- [LAU 05] C.T. Laurencin, J.W. Freeman, Ligament tissue engineering : An evolutionary materials science approach. *Biomaterials* 2005, 26, 7530-7536.
- [LEE 97] J.H. Lee, J.W. Lee, G. Khang, H.B. Lee, Interaction of cells on chargeable functional group gradient surfaces. *Biomaterials*, 1997,18, 351-358.
- [LEE 02a] C.R. Lee, S. Grodzinsky, M. Spector, Biosynthetic response of passaged chondrocytes in a type II collagen scaffold to mechanical compression. *J. Biomed. Mat. Res.* 2002, 64A, 560-569.
- [LEE 02b] S.J. Lee, G. Khang, Y.M. Lee, H.B. Lee, Interaction of human chondrocytes and NIH/3T3 fibroblasts on chloric-acid-treated biodegradable polymer surfaces. *J. Biomater. Sci. Polym. Edn* 2002, 13, 197-212.
- [LEE 03] K.H. Lee, H.Y. Kim, H.J. Bang, Y.H. Jung, S.G. Lee, The change of bead morphology on electrospun polystyrene fibers. *Polymer* 2003, 44, 4029-4034.
- [LEE 05] C.H. Lee, H.J. Shin, I.H. Cho, Y.-M. Kang, I.A. Kim, K.-D. Park, J.-W. Shin, Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials* 2005, 26, 1261-1270
- [LEO 04] G. Leone, R. Barbucci, A. Borzachelio, L. Ambrosio, P.A. Netti, C. Migliaresi, Preparation and physico-chemical characterization of microporous polysaccharidic hydrogels. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2004, 15, 463-467.
- [LER 76] J. Leray, M. Vert, D. Blanquaert, Nouveau matériau de prothèse osseuse et son application, French Patent Appl. 1976, 76, 281,63.
- [LEW 05] M.C. Lewis, B.D. MacArthur, J. Malda, G. Pettet, C.P. Please, Heterogeneous proliferation within engineered cartilaginous tissue: the role of oxygen tension. *Biotechnology and Bioengineering* 2005, 95, 607-615.
- [L'HE 06] N. L'Heureux, N. Dusserre, G. Konig, B. Victor, P. Keire, T.N. Wight, N.A.F. Chronos, A.E. Kyles, C.R. Gregory, G. Hoyt, R.C. Robbins, T.N. McAllister, Human Tissue Engineered Blood Vessel For Adult Arterial Revascularization. *Nat Med.* 2006, 12, 361-365.
- [LI 95] S. Li, M. Vert, Biodegradation of aliphatic polyester, *Degradable polymers principles and applications*, Chapman & Hall Edts, 1995, Chap 5, 43-87.

- [LI 04a] D. Li, Y. Xia, Electrospinning of Nanofibers : Reinventing the Wheel?. *Advanced Materials* 2004, 16, 1151 – 1170.
- [LI 04b] D. Li, Y. Wang, Y. Xia, Electrospinning nanofibers as uniaxially aligned arrays and layer-by-layer stacked films. *Adv. Mater.* 2004, 16, 361-366.
- [LI 06] W.-J. Li, J.A. Cooper, R.L. Mauck, R.S. Tuan, Fabrication and characterization of six electrospun poly(α -hydroxyester)-based fibrous scaffolds for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia* 2006, 2, 377-385.
- [LI 07] W.J. Li, R.L. Mauck, J.A. Cooper, X. Yuan, R.S. Tuan, Engineering controllable anisotropy in electrospun biodegradable nanofibrous scaffolds for musculoskeletal tissue engineering, *J. Biomech.* 2007, 40, 1686-1693.
- [LIA 06] R. Liang, S.L.-Y. Savio, Y. Takadura, D.K. Moon, F. Jia, S.D. Abramowitch, Long-term effects of porcine small intestine submucosa on the healing of medial collateral ligament : A functional tissue engineering study. *J. Orthop. Res.* 2006, 24, 811-819
- [LIU 06] X. Liu, Y. Won, P.X. Ma, Porogen-induced surface modification of nano-fibrous poly(L-lactic acid) scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials* 2006, 27, 3980-3987.
- [LIU 07] H. Liu, H. Fan, Y. Wang, S.L. Toh, J.C.-H. Goh, The interaction between a combined knitted silk scaffold and microporous silk sponge with human mesenchymal stem cells for ligament tissue engineering. *Biomaterials* 2007, doi:10.1016/j.biomaterials.2007.10.035.
- [LU 99] X.J. Lu, B. Flautre, K. Anselme, P. Hardouin, A. Gallur, M. Descamps, Role of interconnection in porous bioceramics on bone recolonization *in vitro* and *in vivo*. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 1999, 10, 111-120.
- [MA 01] P.X. Ma, J-W. Choi, Biodegradable polymer scaffolds with well-defined interconnected spherical pore network. *Tissue Engineering* 2001, 7, 23-33.
- [MA 03] Z. Ma, C. Gao, Y. Gong, J. Shen, Paraffin spheres as porogen to fabricate poly(L-lactic acid) scaffolds with improved cytocompatibility for cartilage tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 2003, 67, 610-617.
- [MA 05] Z. Ma, M. Kotaki, R. Inai, S. Ramakrishna, Potential of nanofiber matrix as tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering* 2005, 11, 101-109.

- [MAJ 05] T. Majima, T. Funakosi, N. Iwasaki, S.-T. Yamane, K. Harada, S. Nonaka, A. Minami, S.-I. Nishimura, Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering. *J. Orthop. Sci.* 2005, 10, 302-307.
- [MAL 04] J. Malda, T.B. Woodfield, F. van der Vloodt, F.K. Kooy, D.E. Martens, J. Tramper, C.A. Blitterswijk, J. Riesle, The effect of PEGT/PBT scaffold architecture on oxygen gradients in tissue engineered cartilaginous constructs. *Biomaterials* 2004, 25, 5773-5780.
- [MAR 75] N.G. Maroudas, Adhesion and spreading of cells on charged surfaces. *J. Theor. Biol.* 1975, 49, 417-424.
- [MAR 95] Y. Marois, B. Cronier, R. Guidoin, A.Y. Bémabger, M. Marois, N. Poddevin, M.Y. King, J.P. Delagoutte, Synovial healing responses to synthetic ligamentous fibres implanted in the knee joint of the rat. *Actualité en Biomatériaux* 1995, 339-348.
- [MAS 02] F.A. Maspero, K. Ruffieux, B. Müller, E. Wintermantel, Resorbable defect analog PLAGA scaffolds using CO₂ as solvent: Structural characterization. *J. Biomed Mater. Res* 2002, 68, 89-98
- [MAT 02] J.A. Matthews, G.E. Wnek, D.G. Simpson, G.L. Bowlin, Electrospinning of collagen nanofibers. *Biomacromol.* 2002, 3, 232-238.
- [MEG 02] S. Megelski, J.S. Stephens, D.B. Chase, J.F. Rabolt, Micro- and nanostructured surface morphology on electrospun polymer fibers. *Macromolecules* 2002, 35, 8456-8466.
- [MIK 94] A.G. Mikos, A.J. Thorsen, L.A. Czerwonska, Y. Bao, R. Langer, D.N. Winslow, J.P. Vacanti, Preparation and characterizations of poly(-L-lactic acid) foams. *Polymer* 1994, 35, 1068-1077.
- [MIL 77] R. Miller, J.M. Brady, D.E. Cutright, Degradation rate of oral resorbable implants (polylactates and polyglycolates) : rate modification with changes in PLA/PGA copolymer ratios. *J. Biomed. Mater. Res.* 1977, 11, 711-719.
- [MIT 04] C. Mit-uppatham, M. Nithitanakul, P. Supahol, Ultrafine Electrospun Polyamide-6 fibers : Effect of solution conditions on morphology and average fiber diameter. *Macromol. Chem. Physic.* 2004, 205, 2327-2338.
- [MO 04] X. Mo, H.-J. Weber, Electrospinning P(LLA-CL) Nanofiber : a tubular scaffold fabrication with circumferential alignment. *Macromol. Symp.* 2004, 217, 413-416.

- [MOO 96] D.J. Mooney, D.F. Baldwin, N.P. Suh, J.P. Vacanti, R. Langer, Novel approach to fabricate porous sponges of poly(D,L-lactic-co-glycolic acid) without the use of organic solvents. *Biomaterials* 1996, 17, 1417-1422.
- [MOR 06] L. Moroni, J.R. de Wijn, C.A. van Blitterswijk, 3D-fiber deposited scaffolds for tissue engineering : influence of pores geometry and architecture on dynamic mechanical properties. *Biomaterials* 2006, 27, 974-985.
- [MUR 02] W.L. Murphy, R.G. Dennis, I.L. Kileny, D.J. Mooney, Salt fusion: An approach to improve pore interconnectivity within tissue engineering scaffolds. *Tissue Engineering* 2002, 8, 43-52.
- [MUS 04] V. Musahl, S.D. Abramowitch, T.W. Gilbert, E. Tsuda, J.H.-C. Wang, S.F. Badylak, S.L.-Y. Woo, The use of porcine small intestinal submucosa to enhance the healing of the medial collateral ligament-a functional tissue engineering study in rabbits. *J. Orthop. Res.* 2004, 22, 214-220.
- [NAK 02] T. Nakatani, T. Marui, T. Hitora, M. Doita, K. Nishida, M. Kurosaka, Mechanical stretching force promotes collagen synthesis by cultured cells from human ligamentum flavum *via* transforming growth factor- β 1. *J. Orthop. Res.* 2002, 20, 1380-1386.
- [NAM 99] Y.S. Nam, T.G. Park, Biodegradable polymeric microcellular foams by modified thermally induced phase separation method. *Biomaterials* 1999, 20, 1783-1790.
- [NER 07] N.L. Nerurkar, D.M. Elliot, R.L. Mauck, Mechanics of oriented electrospun nanofibrous scaffolds for annulus fibrosus tissue engineering. *J. Orthop. Res.* 2007, 25, 1018-1028.
- [NÖT 05] U. Nöth, K. Schupp, A. Heymer, S. Kall, F. Jacob, N. Schütze, B. Baumann, T. Barthel, J. Eulert, C. Heindrich, Anterior cruciate ligament constructs fabricated from human mesenchymal stem cells in a collagene type I hydrogel. *Cytherapy* 2005, 7, 447-455.
- [OH 07] S.H. Oh, I.K. Park, J.M. Kim, J.H. Lee, *In vitro* and *in vivo* characteristics of PCL scaffolds with pore size gradient fabricated by centrifugation method. *Biomaterials* 2007, 28, 1664-1671.
- [OLS 88] E.J. Olson, J.D. Kang, F.H. Fu, H.I. Georgescu, G.C. Mason, C.H. Evans, The biochemical and histological effects of artificial ligament wear particles : *In vitro* and *in vivo* studies. *Am. J. Sports Med.* 1988, 16, 558-570.

- [OUY 02] H.W. Ouyang, J.C.H. Goh, X.M. Mo, S.H. Mo, S.H. Teoh, E.H. Lee, Characterization of anterior cruciate ligament cells and bone marrow stromal cells on various biodegradable polymeric films. *Mater. Sci. Eng. C* 2002, 20, 63-69.
- [OUY 03] H.W. Ouyang, J.C.H. Goh, A. Thambyah, S.H. Teoh, E.H. Lee, Knitted polylactide-co-glycolide scaffold loaded with bone marrow stromal cells in repair and regeneration of rabbit Achilles tendon. *Tissue Engineering* 2003, 9, 431-439.
- [OUY 05] H.W. Ouyang, S.L. Lok, J. Goh, T.E. Tay, K. Moe, Assembly of bone marrow stromal cell sheets with knitted poly(L-lactide) scaffold for engineering ligament analogs. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 2005, 75, 264-271.
- [PAR 05] G.E. Park, M.A. Pattison, K. Park, T.J. Webster, Accelerated chondrocyte function on NaOH-treated PLGA scaffold. *Biomaterials* 2005, 26, 3075-3082.
- [PAU 92] L.E. Paulos, T.D. Rosenberg, S.R. Grewe, D.S. Tearse, C.L. Beck, The Gore-tex anterior cruciate ligament prosthesis : A long term followup. *Am. J. Sports Med.* 1992, 20, 246-252.
- [PAV 07] G. Pavon-djavid, L.J. Gamble, M. Ciobanu, V. Gueguen, D.G. Castner, V. Migonney, Bioactive poly(ethylene terephthalate) fibers and fabrics : Grafting, chemical characterization, and biological assessment. *Biomacromol.* 2007, 8, 3317-3325.
- [PHA 06] Q.P. Pham, U. Sharma, A.G. Mikos, Electrospun poly(ϵ -caprolactone) microfiber multilayer nanofiber/microfiber scaffolds: Characterization of scaffolds and measurement of cellular infiltration. *Biomacromolecules* 2006, 7, 2796-2805.
- [PIT 81] C.G. Pitt, M.M. Gratzel, G.L. Kimmel. Aliphatic polyesters. 2. The degradation of poly(DL-lactide), poly(ϵ -caprolactone) and their copolymers *in vivo*. *Biomaterials* 1981, 2, 215-220.
- [POD 94] N. Poddevin, Y. Marois, B. Cronier, J.P. Delagoutte, A.Y. Bélanger, M.W. King, R. Guidoin, Rupture of current ACL prostheses. A retrospective analysis of 89 surgically excised explants. *Actualité en Biomatériaux* 1994, 313-326.
- [PRO 06] P.P. Provenzano, R. Vanderby Jr, Collagen fibril morphology and organization : implication for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biology* 2006, 25, 71-84.

- [QUY 06] P.P. Quynh, U. Sharma, A.G. Mikos, Electrospinning of polymeric nanofibers for tissue engineering applications : A review. *Tissue Engineering* 2006, 12, 1197-1211.
- [RAM 05a] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, Z. Ma, An introduction to electrospinning and nanofibers, World Scientific, 2005, p.100.
- [RAM 05b] S. Ramakrishna, K. Fujihara, W.-E. Teo, T.-C. Lim, Z. Ma, An introduction to electrospinning and nanofibers, World Scientific, 2005, p.105.
- [REN 96] D.H. Reneker, I. Chun, Nanometre diameter fibres of polymer, produced by electrospinning. *Nanotechnology* 1996, 7, 216-223.
- [RIN 07] J. Ringe, M. Sittinger, Tissue engineering of cartilage: State of the art and future challenge. International symposium on bioengineering and regenerative medicine, Mulhouse 24-26 septembre 2007.
- [ROH 03] D. Rohner, D.W. Hutmacher, T.K. Chang, M. Oberholzer, B. Hammer, *In vivo* efficacy of bone-Marrow-coated polycaprolactone scaffolds for the reconstruction of orbital defect in the pig. *J. Biomed. Mater. Res. B* 2003, 66, 574-580.
- [ROS 04] F.R. Rose, L.A. Cyster, D.M. Grant, C.A. Scotchford, S.M. Howdle, K.M. Shakesfeff, *In vitro* assessment of cell penetration into porous hydroxyapatite scaffolds with a central aligned channel. *Biomaterials* 2004, 25, 5507-5514.
- [SAH 06] S. Sahoo, H. Ouyang, J.C. Goh, T.E. Tay, S.L. Toh, Characterization of a novel polymeric scaffold for potential application in tendon/ligament tissue engineering. *Tissue Engineering*. 2006, 12, 91-99.
- [SCH 07] E. Schnell, K. Klinkhammer, S. Balzer, G. Brook, D. Klee, P. Dalton, J. Mey, Guidance of glial cell migration and axonal growth on electrospun nanofibers of poly- ϵ -caprolactone and a collagen/poly- ϵ -caprolactone blend. *Biomaterials* 2007, 28, 3012-3025.
- [SER 04] M.C. Serrano, R. Pagani, M. Vallet-Regí, J. Peña, A. Rámila, I. Izquierdo, M.T. Portolés, *In vitro* compatibility assessment of poly(ϵ -caprolactone) films using L929 mouse fibroblasts. *Biomaterials* 2004, 25, 5603-5611.
- [SHE 88] R.M. Shelton, A.C. Pasmussen, J.E. Davies, Protein adsorption at the interface between charged polymer substrat and migrating osteoblasts. *Biomaterials* 1988, 9, 24-29.

- [SHI 90] K. Shino, M. Masahiro, S. Horibe, M. Hamada, K. Ono, Reconstruction of the anterior cruciate ligament using allogeneic tendon : Long term followup. *Am. J. Sports Med.* 1990, 18, 457-465.
- [SHI 01] Y.M. Shin, M.M. Hohmann, M.P. Brenner, G.C. Rutledge, Electrospinning : A whipping fluid jet generates submicron polymer fibers. *Appl. Phys. Lett.* 2001, 78, 1149-1151.
- [SIL 03] F.H. Silver, J.W. Freeman, G.P. Seehra, Collagen self assembly and the development of tendon mechanical properties. *J. Biomech.* 2003, 36, 1529-1553.
- [SIN 04] L. Singh, V. Kumar, B.D. Ratner, Generation of microcellular 85/15 poly(D,L-lactide-co-glycolide) foams for biomedical applications. *Biomaterials* 2004, 25, 2611-2617.
- [STO 04] S. Stokols, M.H. Tuszinski, The fabrication and characterization of linearly oriented nerve guidance scaffolds for spinal cord injury. *Biomaterials* 2004, 25, 5839-5846.
- [STR 89] L. Stryer, *Connective-tissue proteins*, Chap. 11, *Biochemistry (Third Edition)*, W.H. Freeman and Company, New York, 1989, p. 261-274.
- [SUN 07] T. Sun, D. Norton, R.J. McKean, J.W. Haycock, A.J. Ryan, Development of a 3D cell culture system for investigating cell interactions with electrospun fibers. *Biotech. Bioeng.* 2007, 97, 1318-1328.
- [TAY 64] G. Taylor, Disintegration of water drops in an electric field. *Proc. R. Soc.* 1964, A-280, 33-97.
- [TEO 05] W.E. Teo, S. Ramakrishna, Electrospun fibre bundle made of aligned nanofibers over two fixed points. *Nanotechnology* 2005, 16, 1878-1884.
- [THE 01] A. Theron, E. Zussman, A. Yarin, Electrostatic field-assisted alignment of electrospun nanofibers. *Nanotechnology* 2001, 12, 384-390.
- [THO 95] R.C. Thomson, M.J. Yaszemski, J.M. Powers, A.G. Mikos, Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone. *J Biomater Sci* 1995, 7, 23-38.
- [THO 98] R.C. Thomson, M.J. Yaszemski, J.M. Powers, A.G. Mikos, Hydroxyapatite fiber reinforced poly(alpha-hydroxy ester) foams for bone regeneration. *Biomaterials* 1998, 19, 1935-1943.
- [TRI 04] K. Trieb, H. Bladovec, G. Brand, M. Sabeti, M. Dominkus, R. Kotz, *In vivo* and *in vitro* cellular ongrowth into a new generation of artificial ligaments. *Eur. Surg. Res.* 2004, 36, 148-151.

- [TSU 03] H. Tsuji, T. Ishida, N. Fukuda, Surface hydrophilicity and enzymatic hydrolyzability of biodegradable polyesters: 1. Effects of alkaline treatment, *Polym. Int.* 2003, 52, 843-852.
- [TU 03] C. Tu, Q. Cai, J. Yang, Y. Wan, J. Bei, S. Wang, The fabrication and characterization of poly(lactic acid) scaffolds for tissue engineering by improved solid-liquid phase separation. *Polymers for Advanced Technologies* 2003, 14, 565-573.
- [VAN 04] F. Van Eijk, D.B.F. Saris, J. Riese, W.-J. Willens, C.A. Van Blitterswijk, A.J. Verbout, W.J.A. Dhert, Tissue engineering of ligaments : A comparison of bone marrow stromal cells, anterior cruciate ligament, and skin fibroblasts as cell source. *Tissue Engineering* 2004, 10, 893-903.
- [VAN 07] C. Van Blitterswijk, International symposium on bioengineering and regenerative medicine, Mulhouse 24-26 septembre 2007.
- [VER 06] M. Vert, Polymer degradation in the context of tissue engineering scaffolding. *Tissue engineering and regenerative medicine International Society, European Chapter Meeting, Rotterdam, 8-11 octobre 2006*, p. 128.
- [WAN 04] J.H.-C. Wang, G. Yang, Z. Li, W. Shen, Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction. *J. Biomech.* 2004, 37, 573-576.
- [WEN 01] J. Weng, M. Wang, Producing chitin scaffolds with controlled pore size and interconnectivity for tissue engineering. *J. Mater. Sci. Letters* 2001, 20, 1401-1403.
- [WIL 05] J.M. Williams, A. Adewunmi, R.M. Schek, C.L. Flanagan, P.H. Krebsbach, S.E. Feinberg, S.J. Hollister, S. Das, Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated *via* selective laser sintering. *Biomaterials*, 2005, 26, 4817-4827.
- [WOO 91] S.L. Woo, J.M. Hollis, D.J. Adams, R.M. Lyon, S. Takai, Tensile properties of the human femur-anterior cruciate ligament complex. The effects of specimen age and orientation. *Am. J. Sport Med.* 1991, 19, 217-225.
- [WOO 99] S.L. Woo, K. Hildebrand, N. Watanabe, J.A. Fenwick, C.D. Papageorgiou, J. H.-C. Wang, Tissue engineering of ligament and tendon healing. *Clinic. Orthop. Rel. Res.* 1999, 367S, S312-S323.

- [WU 06] L. Wu, D. Jing, J. Ding, A “room-temperature” injection molding/particulate leaching approach for fabrication of biodegradable three-dimensional porous scaffolds. *Biomaterials* 2006, 27, 185-191.
- [WUT 06] P. Wutticharoenmonkol, N. Sanchavanakit, P. Pavasant, P. Supaphol, Preparation and characterization of novel bone scaffolds based on electrospun polycaprolactone fibers filled with nanoparticles. *Macromol. Biosci.* 2006, 6, 70-77.
- [XU 04] C.Y. Xu, R. Inai, M. Kotaki, S. Ramakrishna, Aligned biodegradable nanofibrous structure: a potential scaffold for blood vessel engineering. *Biomaterials* 2004, 25, 877-886.
- [YAN 01] S. Yang, K.F. Leong, Z. Du, C.K. Chua, The design of scaffolds for use in Tissue Engineering. Part I. Traditional factors. *Tissue engineering* 2001, 7, 679-689.
- [YAN 04] G. Yang, R.C. Crawford, J.H.-C. Wang, Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum free conditions. *J. Biomech.* 2004, 37, 1543-1550.
- [YAN 05] F. Yang, R. Murugan, S. Wang, S. Ramakrishna, Electrospinning of nano/micro scale poly(L-lactic acid) aligned fibers and their potential in neural tissue engineering. *Biomaterials* 2005, 26, 2603-2610.
- [YOO 04] J.J. Yoon, S.H. Song, D.S. Lee, T.G. Park, Immobilization of cell adhesive RGD peptide onto the surface of highly porous biodegradable polymer scaffolds fabricated by gas foaming/salt leaching method. *Biomaterials* 2004, 25, 5614-5620.
- [YOU 98] R.G. Young, D.L. Butler, W. Weber, A.I. Caplan, S.L. Gordon, D.J. Fink, Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J. Orthop. Res.* 1998, 16, 406-413.
- [ZAN 06a] T. Zantop, W. Peterson, J.K. Sekiya, V. Musahl, F.H. Fu, Anterior cruciate ligament anatomy and function relating to anatomical reconstruction. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc.* 2006, 14, 982-992.
- [ZAN 06b] T. Zantop, T.W. Gilbert, M.C. Yoder, S.F. Badylak, Extracellular matrix scaffolds are repopulated by bone marrow-derived cells in a mouse model of Achilles tendon reconstruction. *J. Orthop. Res.* 2006, 24, 1299-1309.

- [ZAR 01] L.D. Zardickas, D.E. Parsell, L.D. Dillon, D.W. Mitchell, L.A. Nunnery, R. Poggie, Structure, metallurgy, and mechanical properties of a porous tantalum foam. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 58, 180-187.
- [ZEI 02] I. Zein, D.W. Hutmacher, S.H. Teoh, K.C. Tan, Poly- ϵ -caprolactone scaffolds designed and fabricated *via* fused deposition modeling. *Biomaterials* 2002, 23, 1169-1185.
- [ZEL 17] J. Zeleny, Instability of electrified liquid surface. *Phys. Rev.* 1917, 10, 1-6.
- [ZEN 03] J. Zeng, X. Chen, X. Xu, Q. Liang, X. Bian, L. Yang, X. Jing, Ultrafine fibers electrospun from biodegradable polymers. *J. Appl. Polym. Sci.* 2003, 89, 1085-1092.
- [ZHA 99] R. Zhang, P.X. Ma, Poly(α -hydroxyl acids)/hydroxyapatite porous composites for bone tissue engineering. I. Preparation and morphology. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 44, 446-455.
- [ZHA 00] R. Zhang, P.X. Ma, Synthetic nano-fibrillar extracellular matrices with predesigned macroporous architectures. *J. Biomed. Mater. Res.* 2000, 52, 430-438.
- [ZHA 04] S.L. Zhao, X.H. Wu, L.G. Wang, Y. Huang, Electrospinning of ethyl-cyanoethyl cellulose/ tetrahydrofuran solutions. *J. Appl. Polym. Sci.* 2004, 91, 242-246.
- [ZHA 05a] J. Zhang, L. Wu, D. Jing, J. Ding, A comparative study of porous scaffolds with cubic and spherical macropores. *Polymer* 2005, 46, 4979-4985.
- [ZHA 05 b] Y.Z. Zhang, H. Ouyang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Z.-M. Huang, Electrospinning of gelatin fibers and gelatin/PCL composite fibrous scaffold. *J. Biomed. Mater. Res. Part B* 2005, 72, 156-165.
- [ZHA 05c] Y.Z. Zhang, J. Venugopal, Z.-M. Huang, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Characterization of the surface biocompatibility of the electrospun PCL-collagen nanofibers using fibroblasts. *Biomacromolecules* 2005, 6, 2583-2589.
- [ZHA 06] Y.Z. Zhang, X. Wang, Y. Feng, J. Li, C.T. Lim, S. Ramakrishna, Coaxial Electrospinning of (fluorescein Isothiocyanate-Conjugated Bovine Serum Albumin)-Encapsulated Poly(ϵ -caprolactone) nanofibers for sustained release. *Biomacromolecules* 2006, 7, 1049-1057.
- [ZHO 05] Q.L. Zhou, Y.H. Gong, C.Y. Gao, Microstructure and mechanical properties of poly(L-lactide) scaffolds fabricated by gelatin *leaching out* method. *J. Appl. Polymer Sci.* 2005, 98, 1373-1379.

- [ZHO 07] W.Y. Zhou, S.H. Lee, M. Wang, W.L. Cheung, W.Y. Ip, Selective laser sintering of porous tissue engineering scaffolds from poly(L-lactide)/carbonated hydroxyapatite nanocomposite microspheres. *J. Mater. Sci. Mater Med.* 2007, in press.
- [ZON 02] X.H. Zong, K. Kim, D.F. Fang, S.F. Ran, B.S. Hsiao, B. Chu, Structure and process relationship of electrospun bioabsorbable nanofiber membranes. *Polymer* 2002, 43, 4403-4412.
- [ZON 03] X.H. Zong, S. Ran, D. Fang, B. Hsiao, B.S. Chu, Control of structure, morphology and property in electrospun poly(glycolide-co-lactide) non woven *via* post draw treatment. *Polymer* 2003, 44, 4959-4967.
- [ZON 05] X. Zong, H. Bien, C.-Y. Chung, L. Yin, D. Fang, B.S. Hsiao, B. Chu, E. Entcheva, Electrospun fine textured scaffolds for heart tissue constructs. *Biomaterials* 2005, 26, 5330-5338.

Annexe 1

Procédure de tissage

Il y a plusieurs points importants à vérifier lors du tissage comme la taille du fil donc de la maille, la tension du fil en amont et en aval de la structure, la disposition des aiguilles, leur ouverture, etc.

Coton : maille n°6

Fil de suture : maille n°1

1^{ère} étape

Mettre le chariot à droite. Brosses baissées, mannette en position O.

Aligner le nombre d'aiguilles voulues en position B.

Faire un aller-retour avec le chariot.

Passer le fil dans le chariot. Mettre une aiguille sur deux en position D. Passer le fil sur les aiguilles qui ressortent de la machine. Attacher un poids à l'extrémité du fil. Faire 1 ou 2 allers-retours. Il faut vérifier à chaque passage que les aiguilles ne supportent qu'une maille. Aussi il est important que le fil soit tendu, pour ne pas faire sauter les mailles. Ainsi le bras flexible dans lequel passe le fil doit être à peu près à l'horizontal.

2^{ème} étape

Le chariot est à droite. Brosses relevées, mannette de gauche en position Δ. Faire un aller-retour et vérifier la structure.

Ensuite il suffit de faire autant de passages qu'on désire. Le chariot doit se retrouver à droite pour avoir un nombre pair de rang.

3^{ème} étape

Finition. Il faut « fermer » les mailles restantes. Le fil en amont et en aval doit rester tendu pour faciliter l'opération. Avec une aiguille, on passe les mailles les unes dans les autres et on finit par un double nœud.

Annexe 2

Protocole de coloration HES

Une fois les coupes histologiques déposées sur une lame de verre, elles sont immergées successivement dans un bain de fixation et des bains de coloration :

Fixation des lames (1 min, glutaraldéhyde 2,5%)

Rinçage à l'eau

Coloration hématoxyline 1 min

Rinçage à l'eau

Rinçage à l'alcool 30 s

Coloration éosine 30 s

Rinçage à l'eau

Rinçage à l'alcool 30 s

Coloration Safran 30 s

Rinçage alcool 30 s

Rinçage alcool absolu

Rinçage Toluène, 5 s

Les lames une fois colorées et séchées, l'utilisation d'une colle et d'une plaque de verre permet de monter les lames et de les conserver.

Liste d'Activité

Cédryck Vaquette

LEMTA, UMR 7563 CNRS-UHP-INPL
Novembre 2007

Publications dans des journaux à comité de lecture

- P.1. C. Vaquette, S. Fawzi-Grancher, P. Lavallo, C. Frochot, M.-L. Viriot, S. Muller, X. Wang, *In vitro biocompatibility of different polyester membranes*, **Biomedical Material Engineering**, 2006;16, S131-136.
- P.2. C. Vaquette, V.G. Babak, F. Baros, O. Boulanouar, D. Dumas, P. Fievet, P. Maincent, X. Wang, *Zeta-potential of electrospun nano- and microfibers from biopolymers and their blends used as scaffolds in tissue engineering*, **Mendeleev Communication**, sous presse.
- P.3. C. Vaquette, C. Frochot, R. Rahouadj, X. Wang, *An innovative method to obtain porous PLLA scaffolds with highly spherical and interconnected pores*, **J. Biomed. Mater. Res. Part B : Appl. Biomat.**, sous presse.
- P.4. C. Vaquette, C. Frochot, R. Rahouadj, S. Muller, X. Wang, *Mechanical and biological characterization of a porous poly-L-lactic acid-co- ϵ -caprolactone scaffold for tissue engineering*, **Soft Materials**, sous presse.

Publications dans des congrès

- P.5. C. Vaquette, R. Rahouadj, X. Wang, *A knitted scaffold for ligament tissue engineering*, **J. Biomechanics**, 2006, 39, S222.
- P.6. C. Kahn, C. Vaquette, S. Slimani, R. Rahouadj X. Wang, *Mechanical characterisation of rabbit Achilles tendon for functional tissue engineering*, **J. Biomechanics**, 2006, 39, S221-S222.

Participations à des congrès

* *Personne qui a communiqué.*

■ Communications orales

En International

- C.1. C. Vaquette*, R. Rahouadj, X. Wang, *A knitted structure for ligament tissue engineering*, 5th World Congress of Biomechanic, Munich, 29 juillet- 4 août 2006.
- C.2. C. Vaquette*, C. Kahn, C. Frochot, R. Rahouadj, X. Wang, *An innovative method to obtain porous PLLA scaffold with spherical and interconnected pores*, Annual TERMIS Meeting (The European Chapter of Tissue Engineering and Regenerative Medicine International Society), Rotterdam, 8-11 octobre 2006.

En National

- C.3. C. Vaquette*, R. Rahouadj, C. Frochot, X. Wang *Mise au point d'un scaffold utilisable pour l'ingénierie tissulaire du ligament*, GDR2760 Interaction Fluide Structure Biologique, Marseille, 18-19 janvier 2006.
- C.4. C. Vaquette*, R. Rahouadj, C. Frochot, X. Wang, *Matrice biodégradable tissée pour l'ingénierie tissulaire du ligament et du tendon*, Journée Thématique de la Société de Biomécanique "Biomécanique et Ingénierie Tissulaire : une révolution en orthopédie?", Paris, 29 mai 2006.

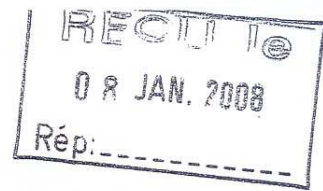
▪ **Posters**

En International

- C.5. C. Vaquette*, S. Fawzi-Grancher, P. Lavalley, C. Frochot, M.-L. Viriot, S. Muller, X. Wang, *In vitro biocompatibility of different polyester membranes*, 2^{ème} Colloque International "Ingénierie Médicale et Thérapie", Nancy , 10-11 mai 2005.
- C.6. C. Vaquette*, C. Frochot, X. Wang, *Poly-ε-caprolactone nanofibers obtained by electrospinning for potential use in ligament/tendon tissue engineering*, 3^{ème} Colloque International "Ingénierie Médicale et Thérapie", Nancy, 15-16 mai 2006.
- C.7. C. Vaquette, C. Kahn, C. Frochot, M.L. Viriot *, R. Rahouadj, X. Wang, *An innovative method to obtain porous PLLA scaffold with spherical and interconnected pores*, Congress "Engineering tissues : replace - repair – regenerate", Sea Pines - Hilton Head Island, SC (USA), 7-11 mars 2007.
- C.8. C. Vaquette*, N. Tran, C. Kahn, C. Frochot, R. Rahouadj, X. Wang, *PLLA biodegradable scaffolds with interconnected spherical pores : an in vitro and an in vivo study*, International Symposium Bioengineering and Regenerative Medicine, Mulhouse, 24-26 septembre 2007. **Prix des meilleurs posters.**

En National

- C.9. C. Vaquette*, R. Rahouadj, C. Frochot, X. Wang, *Knitted PLGA structures for potential use in ligament tissue engineering*, Journée de l'Ecole Doctorale EMMA 2006, Nancy, 11 mai 2006.
- C.10. C. Vaquette*, C. Kahn, C. Frochot, M.-L. Viriot, R. Rahouadj, X. Wang, *An innovative method to obtain porous PLLA scaffold with spherical and interconnected pores*, Journée de l'Ecole Doctorale EMMA 2007, 10 mai 2007, Nancy. **Prix du meilleur poster.**



Rapport de Madame Véronique MIGONNEY, Professeur à l'Université Paris 13 sur le mémoire présenté par Monsieur Cédryck VAQUETTE « **Elaboration et caractérisation de structures tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire** »

Le travail présenté par Monsieur Cédryck VAQUETTE a pour objectif de déterminer parmi différents matériaux et différentes techniques d'élaboration lesquels seront les plus appropriés pour élaborer des structures tridimensionnelles destinées à l'ingénierie tissulaire.

Monsieur Cédryck VAQUETTE présente son travail de thèse dans un mémoire très volumineux, présenté de façon originale en quatre parties principales. Chaque partie est précédée d'une introduction bibliographique qui permet de situer clairement les travaux présentés par rapport à l'état de l'art et de mettre judicieusement en évidence l'intérêt de la démarche proposée.

La première partie est consacrée à la présentation, l'étude et la sélection des matériaux destinés aux différentes applications visées en ingénierie tissulaire. Cette partie qui met en évidence l'importance de la biocompatibilité des matériaux constitue une étape essentielle de la démarche de Monsieur Cédryck VAQUETTE pour la réalisation de son projet de recherche qui est très ambitieux et très prometteur. L'intérêt grandissant de l'ingénierie tissulaire pour pallier certaines déficiences de tout ou partie de tissu ou d'organe et les problèmes rencontrés lors du recours aux greffes sont présentés de manière tout à fait pertinente. De plus, Monsieur Cédryck VAQUETTE a la franchise de mettre à jour les difficultés de cette discipline toujours émergente. Cette étude fournie permet donc à Monsieur Cédryck VAQUETTE de dégager les dernières orientations dans l'élaboration des matériaux pour l'ingénierie tissulaire mais on peut cependant lui reprocher de n'avoir abordé que les matériaux polymères. En effet, même si les polymères sont ceux qu'il va utiliser par la suite il aurait été intéressant d'aborder les matériaux biodégradables au sens large : polymères et céramiques.

La seconde partie du document décrit la fabrication de structures poreuses destinées à servir de support tridimensionnel pour la culture cellulaire. Après une description et une analyse des différents procédés classiquement utilisés Monsieur Cédryck VAQUETTE propose une technique dérivée de celles existantes mais modifiée et améliorée dans le laboratoire pour créer des structures poreuses. Les propriétés de ces structures ont été analysées de façon extrêmement rigoureuse tant du point de vue mécanique que du point de vue réponse biologique.

La troisième partie du document est plus détaillée car elle expose des techniques de déposition de micro et nano fibres dans un champ électrique, l'électrofilage ou « electrospinning » qui est de plus en plus utilisé pour réaliser des structures destinées à l'ingénierie tissulaire. Les paramètres déterminant les propriétés finales de ces structures sont étudiés. Le procédé d'electrospinning est présenté de façon tout à fait objective ce qui permet à Monsieur Cédryck VAQUETTE de proposer une technique originale de modification du procédé en modifiant le potentiel zêta des fibres déposées. Ce procédé sera ensuite utilisé pour réaliser les « scaffolds » nécessaires à la partie ingénierie tissulaire des tendons et ligaments qui sera développée dans la quatrième partie du mémoire.

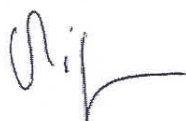
La quatrième partie est la plus développée et consiste à développer la démarche d'ingénierie tissulaire spécifique des tendons et des ligaments. La partie bibliographique est très bien documentée et les différentes approches actuelles pour répondre à ces pathologies particulières de rupture des tendons et des ligaments -qu'elles utilisent des structures naturelles ou synthétiques- sont bien présentées ainsi que leurs particularités et leurs limites. Ensuite, l'intérêt de l'ingénierie tissulaire de même que les stratégies proposées par Monsieur Cédryck VAQUETTE apparaissent tout naturellement. La fabrication de structures tissées est l'approche choisie car elle permet d'offrir flexibilité et résistance à la traction. Elle a été réalisée selon une technique originale qui couple tissage et électrospinning. Les propriétés mécaniques – déterminantes pour ces applications- ainsi que la dégradation de ces structures sont très rigoureusement étudiées. Enfin l'étude de la biocompatibilité des « scaffolds » a été réalisée dans le cas de deux structures traitées selon une technique élaborée pour résoudre les problèmes d'ensemencement des cellules et pour obtenir des structures mimant l'organisation des tissus biologiques. Les structures finalement choisies et testées sont un composite tissé/alginate gélifié et un scaffold tissé/microfibres. L'évaluation biologique montre un alignement cellulaire selon la direction des fibres ainsi qu'une forte sécrétion extra cellulaire. La partie évaluation biologique devra être poursuivie *in vivo* dans un modèle fonctionnel afin de confirmer l'intérêt de ces nouvelles structures. En fin de mémoire Monsieur Cédryck VAQUETTE réalise une étude critique des travaux réalisés et des résultats qu'il a obtenus dans une conclusion générale de l'ensemble du document.

En conclusion, après avoir étudié les différentes approches possibles Monsieur Cédryck VAQUETTE a élaboré des « scaffolds » pour l'ingénierie tissulaire des tendons et ligaments en utilisant des techniques très délicates qu'il a su maîtriser, adapter et optimiser. Cette étude est tout à fait novatrice et ambitieuse dans un domaine d'application peu abordé en France. Elle devrait permettre de fabriquer des supports d'ingénierie tissulaire selon un procédé novateur, pour des applications en chirurgie orthopédique dès lors que l'analyse des propriétés biologiques *in vivo* pourra être abordée.

Le mémoire de Monsieur Cédryck VAQUETTE est très bien construit et met en évidence une démarche scientifique claire et rigoureuse. Les objectifs sont toujours très clairement présentés grâce à l'étude bibliographique conséquente et bien menée au début de chaque chapitre. Les conclusions sont tout à fait convaincantes et le mémoire met en évidence une quantité de travail expérimental très importante, soutenue par une discussion soignée et argumentée. La caractéristique majeure de ce travail reste cependant l'innovation dans une voie de recherche difficile et peu explorée en France

Pour toutes ces raisons, je donne un avis très favorable à la soutenance de la thèse de Monsieur Cédryck VAQUETTE devant le jury de l'Université de Nancy.

Villetaneuse, le 08 janvier 2008



Véronique MIGONNEY
Professeur, Université Paris 13

Christian ODDOU
Professeur Émérite

Créteil, le 7 janvier 2008

MACROBUTTON



RAPPORT CONCERNANT LE MÉMOIRE DE THÈSE INTITULÉ
Elaboration et caractérisation de structures tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire

Présenté par :

Monsieur Cédryck VAQUETTE

En vue de l'obtention du grade de docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine
(Spécialité Mécanique et Energétique)

Malgré des taux croissants d'interventions de plus en plus nombreuses et performantes quant à leurs succès à long terme, les remplacements prothétiques en chirurgie restent l'objet de pertinentes recherches dans le domaine de la mécano-biologie et de l'ingénierie tissulaire. Ce domaine de recherche pluridisciplinaire met en commun les connaissances des sciences de l'ingénieur et celles des sciences de la vie dans le but de développer des substituts biologiques permettant de restaurer ou améliorer les fonctions des tissus et des organes. La performance de ces substituts dépend fondamentalement de l'utilisation du matériau substrat, biocompatible et dégradable, généralement polymérique poreux et fibreux dans lequel sont cultivées les cellules souches. Outre le fait d'être un support structurel aux tissus néo-formés, ce matériau a pour finalité de fournir aux cellules un microenvironnement (mécanique et physico-chimique) adéquat à leur prolifération, différenciation et synthèse de matrice extra-cellulaire. C'est dans ce contexte général d'un domaine de recherche émergent et nécessairement pluridisciplinaire (triptyque mécanique, physico-chimie des matériaux, biologie cellulaire) que se situe ce travail novateur visant des applications au système ostéo-articulaire du type tendons et ligaments, voire cartilage.

Dans ce large champ de l'Ingénierie Tissulaire, de la Biomécanique et des Biomatériaux, ce mémoire relate des travaux pluridisciplinaires ayant comme objectifs la conception et la réalisation d'organoïdes destinés au remplacement de ces tissus articulaires en se basant sur une approche impliquant différentes échelles, de la molécule au système intégré. Le matériau substrat et le bioréacteur nécessaires à l'élaboration de l'organoïde doivent se révéler parties « ad hoc » d'un système permettant une "bonne culture", c. à d. un bon développement des cellules. Tout le problème en génie tissulaire est de définir et d'interpréter, dans le cadre d'études coopératives comme celles ici présentées, ce qui se cache derrière les termes « ad hoc » (travail relevant plutôt du secteur Sciences de l'Ingénieur) et « bonne culture » (travail relevant plutôt du secteur Sciences de la Vie). C'est ce que tente de

résoudre partiellement cette intéressante recherche, essentiellement conçue comme visant à définir un cahier des charges contribuant à l'évaluation et au développement des « meilleurs substrats » en matériaux biodégradables, structurés, polymériques et poreux.

Relatant un travail de pionnier dans ce domaine, en particulier par son approche expérimentale de « biomatérialiste », ce mémoire met un accent louable sur les aspects liés à la microarchitecture des milieux étudiés. Il se distingue par la richesse des éléments d'informations clairement synthétisés dans l'ensemble du mémoire. En particulier dans l'introduction générale et la première partie, cette revue synthétique permet de justifier du choix des matériaux utilisés dans cette stratégie d'ingénierie tissulaire en faveur des polyesters aliphatiques biocompatibles et biodégradables. Cédryck VAQUETTE s'efforce ici de nous convaincre de la nécessité de construire à partir de ces matériaux une structure poreuse et architecturée dont les propriétés de transport et les propriétés mécaniques permettent de créer un micro-environnement « ad hoc » lors de la culture des cellules. Nul doute que les chercheurs du génie tissulaire et cellulaire trouveront là, rassemblée et synthétisée de façon notable, une somme de connaissances tout à fait d'actualité.

Trois volets principaux constituent la trame du mémoire: le premier traite de la fabrication de mousses très poreuses possédant des pores sphériques et très interconnectés. Le second décrit la mise en œuvre de la technique « d'électrospinning » permettant l'obtention de structures fibreuses à microarchitecture très aléatoire ou très orientée et dont l'état de charge électrique des composants fibreux peut être contrôlé. Le troisième relate avec force détail le développement, à partir de fils de suture d'origine naturelle ou artificielle, de substrats tissés fortement poreux dont l'architecture ressemble à celle des structures ligamentaires et tendineuses. Les points forts à noter dans cet ensemble sont relatifs à l'aspect technologique novateur concernant les méthodologies développées pour la fabrication des « structures » ainsi réalisées. Cela restera un acquis certain pour le groupe de recherche qui devrait être incité à une démarche de prise de brevets à la suite de ces travaux. Des points faibles, « revers de la médaille » de toute recherche à caractère très pluridisciplinaire et technologique, sont néanmoins à mentionner et concernent du seul point de vue de la Biomécanique la relative faiblesse de la caractérisation et de la quantification des structures fabriquées : Il eut été certainement intéressant pour la suite des projets de recherche dans ce domaine d'avoir au plan de la perméabilité et de la poro-élasticité plus de « données interprétées » sur les relations comportement-structure de ces milieux.

En conclusion, ce mémoire est le fruit d'un travail expérimental considérable qui a permis de "défricher" le domaine particulier du génie tissulaire à finalité ostéo-articulaire. En effet, le fait d'avoir conçu et réalisé des matériaux à micro-architecture complexe "ressemblant" aux milieux physiologiques qu'ils sont censés remplacer est un atout certain permettant des études plus spécifiques ultérieures. Des solutions à la fois conceptuelles et expérimentales pour ces futures études sont proposées, qui devraient permettre une meilleure caractérisation, si possible non destructrice, du comportement « biologique » de ces milieux sous sollicitations dynamiques. Les domaines de la physiologie du système ostéo-articulaire et de la chirurgie correspondante devraient largement bénéficier des études ici présentées.

Pour l'ensemble de ces raisons, il est donné un avis très favorable à la présentation de ce mémoire en vue de l'obtention du grade de docteur de l'Institut National Polytechnique de Lorraine dans la spécialité Mécanique et Energétique.

C. O

C. Oddou

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :

Madame Véronique MIGONNEY, Professeur, LBPS, Institut Galilée, Villetaneuse

Monsieur Christian ODDOU, Professeur, B2OA, Université Paris 12, Créteil

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur VAQUETTE Cédryck

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE,
une thèse intitulée :

**"Elaboration et caractérisation de structures tridimensionnelles pour l'ingénierie
tissulaire"**

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Mécanique et énergétique** »

Fait à Vandoeuvre, le 08 janvier 2008

Le Président de l'I.N.P.L.,

F. LAURENT



NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 5 4 5 0 1
VANŒUVRE CEDEX

