

Caractérisation et optimisation de l'environnement mécanique tridimensionnel des cellules souches au sein des bioréacteurs d'ingénierie tissulaire osseuse

M. CRUEL^a, M. BENSIDHOUM^b, P. BECQUART^b, C. NOUGUIER-LEHON^a, H. PETITE^b, T. HOC^a

a. LTDS, CNRS UMR 5513, Ecole Centrale de Lyon, 36 av Guy de Collongue, 69134 Ecully
magali.cruel@ec-lyon.fr ; cecile.nouguier@ec-lyon.fr ; thierry.hoc@ec-lyon.fr

b. B2OA, CNRS UMR 7052, Université Paris Diderot, 10 av de Verdun, 75010 Paris
morad.bensidhoum@univ-paris-diderot.fr ; pierre.becquart@univ-paris-diderot.fr ;
herve.petite@univ-paris-diderot.fr

Résumé :

Les cellules souches mésenchymateuses utilisées en ingénierie tissulaire osseuse sont sensibles aux contraintes mécaniques, particulièrement au cisaillement. Il est donc possible d'optimiser leurs conditions de culture (géométrie des scaffolds, flux) pour stimuler les cellules au sein des bioréacteurs. Pour cela, une étude numérique de dynamique des fluides a été réalisée sur différents types de scaffolds granulaires. Elle a montré que ces scaffolds ont une efficacité équivalente à ceux de la littérature pour convertir le flux de milieu de culture en stimulation mécanique. Ces résultats numériques ont ensuite été mis en œuvre expérimentalement. Les expériences ont montré le rôle fondamental de la nature du biomatériau utilisé comme scaffold ainsi que de l'environnement tridimensionnel.

Abstract :

Mesenchymal stem cells used in bone tissue engineering are sensitive to mechanical stresses, especially to shear stress. It is therefore possible to optimize their culture conditions (scaffold geometry, flow) to stimulate cells in bioreactors. To that aim, a numerical study of computational fluid dynamics was run with different types of granular scaffolds. It showed that these scaffolds present the same efficiency as scaffolds from literature to convert fluid flow into mechanical stimulation. The numerical results were then implemented experimentally. Experimental results showed the fundamental role of the biomaterial used as a scaffold and of the tridimensional environment.

Mots clefs : Ingénierie tissulaire osseuse, cisaillement, mécanotransduction, bioréacteur, dynamique des fluides, scaffolds granulaires

1 Introduction

Le traitement des défauts osseux de grande taille pose d'importants problèmes cliniques. Un défaut osseux de taille supérieure à une dimension critique ne peut pas se réparer de lui-même. La solution la plus répandue actuellement consiste à réaliser une autogreffe. C'est encore aujourd'hui le traitement le plus efficace mais il présente de nombreux inconvénients : os prélevable limité, complications dans 10% des cas, ... Ces inconvénients ont motivé la recherche de méthodes alternatives, et en particulier le développement de l'ingénierie tissulaire. Le principe général est d'utiliser les propres cellules souches du patient et de les mettre en culture *in vitro* pour recréer un greffon osseux. La preuve de concept de cette méthode a été établie sur un modèle de gros animal de pertinence clinique [1].

En ingénierie tissulaire osseuse, les cellules sont ensemencées sur un scaffold, support tridimensionnel, et cultivées en bioréacteur, un dispositif qui leur fournit le microenvironnement biochimique et mécanique nécessaire à leur croissance, différenciation, production de matrice extracellulaire, ... Il est connu que les contraintes mécaniques, et en particulier le cisaillement, jouent un rôle fondamental dans la croissance cellulaire à travers le processus de mécanotransduction. Par ce mécanisme, les cellules convertissent le chargement mécanique en signaux biologiques appropriés.

In vivo, les cellules expérimentent des contraintes de cisaillement de l'ordre de 0.8 à 3 Pa [2]. De nombreuses expérimentations en deux dimensions ont mis en évidence des réponses positives des cellules à des niveaux de cisaillement compris entre 0.4 et 2 Pa [3-6]. A priori, ces valeurs peuvent servir de références pour concevoir les dispositifs de culture. Les bioréacteurs actuels nécessitent encore des améliorations. Plusieurs paramètres peuvent être contrôlés pour optimiser la stimulation mécanique des cellules : le flux, la géométrie tridimensionnelle des scaffolds, ... Dans ce contexte, des outils numériques ont été développés et sont largement utilisés depuis une dizaine d'année pour déterminer les contraintes mécaniques auxquelles les cellules sont soumises dans telle ou telle configuration de culture [7-10]. Dans ces configurations tridimensionnelles, les valeurs de cisaillement pour lesquels des effets positifs du flux ont été observés sont de l'ordre de 10^{-5} à 10^{-3} Pa.

Récemment, un nouveau type de scaffolds a été développé : les scaffolds granulaires, composés d'empilements de particules de biomatériau [11-12]. Ils sont avantageux du point de vue de l'ensemencement, de la viabilité cellulaire et de la manipulation en contexte clinique, par rapport aux scaffolds massifs poreux. Les contraintes mécaniques présentes lors de l'application d'un flux sur de tels scaffolds n'ont encore jamais été déterminées.

Les objectifs de ce travail étaient de comprendre à quelles contraintes mécaniques les cellules souches mésenchymateuses humaines sont les plus sensibles et de proposer des pistes d'amélioration des bioréacteurs existants en tirant partie de cette sensibilité. Pour cela, des expériences ont été réalisées sur des cultures de cellules souches mésenchymateuses, en 2D et en 3D, et de nombreux marqueurs biologiques de la réponse cellulaire aux stimuli mécaniques ont été analysés. Des simulations numériques du flux au sein d'un bioréacteur d'ingénierie tissulaire osseuse à scaffold granulaire ont également été réalisées pour comprendre les niveaux et distributions de contraintes mécaniques appliqués aux cellules, en fonction du flux et de la forme et de la taille des particules de biomatériau.

2 Matériels et méthodes

Un modèle numérique a été développé pour déterminer les niveaux et distributions de contraintes au sein des bioréacteurs à scaffolds granulaires. Différents empilements granulaires ont également été analysés : un empilement de cubes (Ccube), un empilement monodisperse de billes (C1bille) et un empilement bidisperse de billes (C2bille). La porosité, définie comme le rapport entre le volume de fluide sur le volume total de l'empilement, est de 54.2 %, 49.8 % et 46.9 % pour les configurations Ccube, C1bille et C2bille respectivement. La taille des pores en revanche n'est pas directement quantifiable en raison de leur forme concave due à la nature particulière des empilements. Les simulations de dynamique des fluides ont été réalisées avec le logiciel Comsol Multiphysics®. Cinq flux d'entrée compris entre 10 et 200 mL/min ont été testés. Les champs de vitesse et les cisaillements aux parois des particules ont été analysés. Les distributions des valeurs locales de cisaillement, les fonctions densité de probabilité ainsi que l'homogénéité spatiale des contraintes de cisaillement ont également été étudiées de manière à comparer les différentes configurations testées.

Expérimentalement, des cellules souches mésenchymateuses humaines ont été cultivées en 2D pendant 30 minutes sur différents substrats et soumises à des contraintes mécaniques de nature et de niveaux différents, de manière à identifier la contrainte la plus efficace en fonction du biomatériau. Les marqueurs précoces de l'ostéogénèse ont été analysés : expression de gènes caractéristiques de la mécanotransduction, phosphorylation de la protéine ERK1/2. Pour valider les résultats numériques et expérimentaux en 2D, des expériences en bioréacteurs en 3D ont été conçues. Les trois scaffolds granulaires testés numériquement ont été utilisés et plusieurs flux d'entrée ont été testés, en analysant les mêmes marqueurs biologiques que précédemment. Dans un premier temps, seules des expériences de très courte durée (30min à 3h30min) ont été réalisées pour évaluer l'effet du flux sur la réponse précoce des cellules et déterminer les conditions optimales de culture à mettre en place pour de futures expériences de plus longue durée.

3. Principaux résultats

3.1 Résultats numériques

Le cisaillement à la paroi des particules dans le cas des trois empilements étudiés et pour un flux d'entrée de 200 mL/min est présenté Figure 1. Les niveaux de cisaillement observés sont de l'ordre de 1 Pa. L'empilement bidisperse de billes génère des contraintes de cisaillement bien plus élevées que les deux autres configurations pour un même flux d'entrée. C'est aussi la configuration qui fournit la meilleure homogénéité des contraintes à la surface des particules de l'empilement.

L'analyse plus précise de ces données a permis de mettre en évidence une relation linéaire entre le cisaillement moyen et le flux d'entrée dans les trois cas, avec une pente plus élevée dans le cas de C2bille par rapport aux deux autres géométries. La pente obtenue est similaire à celles des résultats présentés dans la littérature pour des scaffolds non granulaires. Ainsi, les scaffolds granulaires sont aussi efficaces pour convertir le flux en contraintes de cisaillement appliquées aux cellules que les scaffolds massifs poreux. Cette similarité est confirmée par l'analyse des fonctions densité de probabilité suivies par le cisaillement aux parois, qui représentent la fréquence relative des différentes valeurs prises par le cisaillement, également comparables à celles des scaffolds poreux présentées par Voronov *et al.* [13] et Pham *et al.* [14].

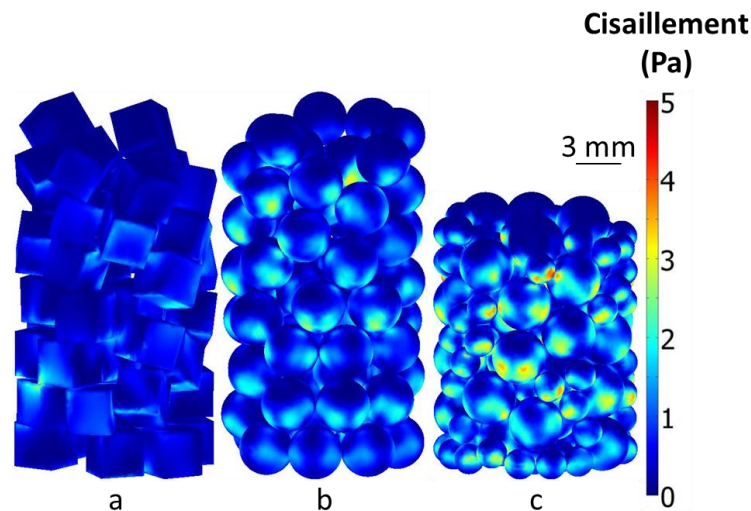


Figure 1 – Cisaillement à la paroi des particules pour un même flux d'entrée 200 mL/min pour les empilements de cubes (a), monodisperse de billes (b) et bidisperse de billes (c)

3.2 Résultats expérimentaux

Les résultats obtenus lors des expériences 2D sur polystyrène montrent que les cellules souches mésenchymateuses humaines sont particulièrement sensibles à une contrainte mécanique de cisaillement, de l'ordre du Pascal. Les expériences suivantes ont montré que l'effet du cisaillement sur l'activité des cellules était dépendant du substrat sur lequel elles se trouvaient. Par exemple, un corail de bénitier active la phosphorylation de ERK1/2 au repos contrairement à un corail de type Porites.

Les cultures en bioréacteurs ont ensuite montré que le flux de milieu de culture induisait une surexpression du gène PTGS2, de manière comparable à 10 ml/min et à 150 mL/min. Or d'après les résultats numériques, les niveaux de stimulations sont différents et les cellules cultivées en 2D sur polystyrène répondent de manière très différente à ces stimuli. Ceci met en évidence le rôle fondamental du biomatériau et de l'environnement tridimensionnel dans la réponse des cellules aux stimuli mécaniques.

4 Conclusion

Ces résultats sont fondamentaux pour identifier les stimuli auxquels les cellules utilisées en ingénierie tissulaire osseuse sont sensibles, pour mieux comprendre les contraintes expérimentées par ces cellules lors des cultures en bioréacteurs et pour optimiser les conditions de culture. Cette étude a montré que les scaffolds granulaires sont aussi efficaces que les scaffolds massifs poreux de la littérature pour convertir le flux de milieu de culture en stimulation mécanique pour les cellules. De plus, ils permettent d'atteindre des niveaux de stimulation mécanique similaires à ceux observés *in vivo*. En revanche, les effets du flux sur la réponse ostéogénique des cellules sont très dépendants de la nature du biomatériau et de sa géométrie.

Références

- [1] H. Petite, V. Viateau, W. Bensaïd, et al. Tissue-engineered bone regeneration. *Nature Biotechnology*, 959-963, 2000.
- [2] S. Weinbaum, S.C. Cowin, Y Zeng. A model for the excitation of osteocytes by mechanical loading-induced bone fluid shear stresses. *Journal of Biomechanics*, 339-360, 1994.
- [3] J. Klein-Nulend, M.H. Helfrich, J.G.H. Sterck, et al. Nitric oxide response to shear stress by human bone cell cultures is endothelial nitric oxide synthase dependent. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 108-114, 1998.
- [4] A.D. Bakker, K. Soejima, J. Klein-Nulend, et al. The production of nitric oxide and prostaglandin E2 by primary bone cells is shear stress dependent. *Journal of Biomechanics*, 671-677, 2001.
- [5] S. Kapur, D.J. Baylink, K.H.W. Lau. Fluid flow shear stress stimulates human osteoblast proliferation and differentiation through multiple interacting and competing signal transduction pathways. *Bone*, 241-251, 2003.
- [6] M. Grellier, R. Bareille, C. Bourget, et al. Responsiveness of human bone marrow stromal cells to shear stress. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 302-309, 2009.
- [7] B. Porter, R. Zauel, H. Stockman, et al. 3-D computational modeling of media flow through scaffolds in a perfusion bioreactor. *Journal of Biomechanics*, 543-549, 2005.
- [8] M. Cioffi, J. Küffer, S. Ströbel, et al. Computational evaluation of oxygen and shear stress distributions in 3D perfusion culture systems: Macro-scale and micro-structured models. *Journal of Biomechanics*, 2918-2925, 2008.
- [9] C. Jungreuthmayer, S.W. Donahue, M.J. Jaasma, et al. A comparative study of shear stresses in collagen-glycosaminoglycan and calcium phosphate scaffolds in bone tissue-engineering bioreactors. *Tissue Engineering part A*, 1141-1149, 2009.
- [10] F. Maes, T. Claessens, M. Moesen, et al. Computational models for wall shear stress estimation in scaffolds: A comparative study of two complete geometries. *Journal of Biomechanics*, 1586-1592, 2012.
- [11] B. David, D. Bonnefont-Rousselot, K. Oudina, M.C. Degat, M. Deschepper, V. Viateau, M. Bensidhoum, C. Oddou, H. Petite. A perfusion bioreactor for engineering bone constructs: an in vitro and in vivo study. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 505, 2011.
- [12] A.B. Yeatts and J.P. Fisher. Tubular perfusion system for the long-term dynamic culture of human mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part C Methods* 17, 337, 2011.
- [13] R.S. Voronov, S.B. VanGordon, V.I. Sikavitsas, et al. Distribution of flow-induced stresses in highly porous media. *Applied Physics Letters* 97, 2010.
- [14] N.H. Pham, R.S. Voronov, S.B. VanGordon, et al. Predicting the stress distribution within scaffolds with ordered architecture. *Biorheology*, 235-247, 2012.