

Ingénierie tissulaire des ligaments : Conception d'un bioréacteur et étude des propriétés mécaniques

Cyril Kahn

▶ **To cite this version:**

Cyril Kahn. Ingénierie tissulaire des ligaments : Conception d'un bioréacteur et étude des propriétés mécaniques. Autre. Institut National Polytechnique de Lorraine, 2009. Français. NNT : 2009INPL010N . tel-01748711

HAL Id: tel-01748711
https://hal.univ-lorraine.fr/tel-01748711

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

Nancy-Université INPL
Institut National Polytechnique de Lorraine

Laboratoire d'Energétique et de Mécanique Théorique et Appliquée
Ecole doctorale EMMA

Doctorat de l'Institut National Polytechnique de Lorraine

Spécialité Mécanique et Energétique

par

Cyril J.F. KAHN
Ingénieur ENSEM

Ingénierie Tissulaire des Ligaments

Conception d'un Bioréacteur et Etude des Propriétés Mécaniques

Thèse dirigée par : **Xiong WANG et Rachid RAHOUADJ**

Soutenue publiquement le 02 février 2009

Composition du jury

Rapporteurs :	**N. BENKIRANE-JESSEL**	Chargé de Recherches INSERM, Faculté de Médecine, Strasbourg
	C. ODDOU	Professeur, Université de Paris 12, Créteil
Examinateurs :	**C. GIGANT-HUSELSTEIN**	Maître de Conférences, UHP, Nancy
	A. MARC	Directeur de Recherches CNRS, I.N.P.L., Nancy
	R. RAHOUADJ	Maître de Conférences, I.N.P.L., Nancy (Co-directeur de thèse)
	X. WANG	Professeur, U.H.P., Nancy (Directeur de thèse)

REMERCIEMENTS

Un travail de recherches ne se fait jamais seul, ceci est encore plus vrai dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, où il est nécessaire de réunir des compétences aussi diverses que les sciences du vivant et les sciences de l'ingénieur que ce soit en physique, en mécanique ou chimie. Afin d'y parvenir, des collaborations sont nécessaires.

En conséquence, je voudrais remercier les différents membres des laboratoires où j'ai été amené à travailler et qui m'ont aidé à réaliser mes travaux de recherches.

Je tiens à remercier en premier lieu, mes directeurs de thèse Messieurs Rachid RAHOUADJ et Xiong WANG, pour m'avoir permis de réaliser ce travail de thèse extrêmement enrichissant par la diversité des approches possibles.

Je voudrais exprimer ma gratitude à Nadia BENKIRANE-JESSEL, Chargé de Recherche INSERM, et Christian ODDOU, Professeur, pour avoir accepté d'être les rapporteurs de ma thèse.

Je remercie également Annie MARC, Directeur de Recherches CNRS, et Céline GIGANT-HUSELSTEIN, Maître de Conférences de l'UHP, pour avoir accepté de faire partie du jury de thèse.

Je souhaiterais exprimer ma profonde gratitude aux personnels du Département de Chimie Physique de la Réaction (DCPR, Nancy-Université) et du Laboratoire de Chimie Physique Macromoléculaire (LCPM, Nancy-Université) qui m'ont très gentiment accueilli dans leur laboratoire pour réaliser les dépositions de fibres par electrospinning. Mes remerciements s'adressent tout particulièrement à :

Gabriel WILD, pour m'avoir accueilli au sein du DCPR.

Céline FROCHOT, pour l'aide qu'elle n'a jamais hésitée à me donner ainsi que pour sa gentillesse.

Brigitte JAMART, pour m'avoir accueilli au sein du LCPM.

Jean-Luc SIX, pour m'avoir permis de terminer les études faites sur l'electrospinning.

Jérome BABIN et Rudy COVIS, pour l'aide qu'ils m'ont apportée au sein du LCPM.

Que Serge CORBEL accepte mes remerciements pour m'avoir prêté l'alimentation haute tension nécessaire à l'electrospinning.

Merci aussi à tout le personnel technique et administratif de ces laboratoires.

Je souhaite aussi remercier le personnel de l'Ecole de Chirurgie, Nguyen TRAN, Frédérique et Aude pour leur aide en expérimentation animale et pour le travail d'histologie réalisé.

Mes remerciements vont aux membres du LEMTA et particulièrement à Cédryck VAQUETTE avec qui j'ai étroitement collaboré lors des études *in vivo* sur les lapins. Qu'il soit encore remercié pour son amitié.

Je souhaite aussi remercier Lei ZHANG pour son professionnalisme et sa patience lors des nombreuses discussions sur les différentes techniques d'analyse biomoléculaire.

Que Nian WANG et Dominique DUMAS soient remerciés pour leur aide dans l'analyse biomoléculaire des cultures sur matrice de support.

Merci également à Christian MOYNE, pour m'avoir accueilli au sein du LEMTA et pour avoir toujours soutenu notre équipe

Que le personnel administratif et technique soit remercié et particulièrement Anne-Marie LOUIS-DAM pour sa jovialité, Alain GERARD, Michel MARCHAND, Alain DELCONTE, Jean-Yves MOREL et son équipe reçoivent ma sincère reconnaissance pour l'aide qu'ils m'ont apportée dans la conception et la réalisation des différentes parties du bioréacteur de ligament et des accessoires construits pour les essais mécaniques.

Merci aussi à Ghania, Nina, Yoann, Tony et Nadjim pour leur amitié et leur soutien au cours de ces derniers mois difficiles.

Je remercie tout le personnel du LEMTA et de son antenne en médecine (nouvellement Biopôle) pour leur aide et leur accueil.

Enfin, je remercie profondément les correcteurs de ce mémoire qui ont eu du fil à retordre : mes parents, Geneviève, ainsi que mes directeurs de thèses.

En dernier lieu, je tiens à remercier ma famille, et mes amis pour leur soutien.

Abréviations et notations

Abréviations

ARNm	Acide ribonucléique messager
BSA	Bovin serum albumin
CSMM (ou MSC)	Cellule souche mésenchymateuse médullaire (ou sigle anglo-saxon)
DIDT	Droit-interne et Demi-tendineux
DMSO	Diméthyl sulfoxide
DMF	Diméthylformamide
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
EDTA	Ethylene dinitrilo tetra-acetic acid
ELISA	Enzyme linked immunosorbant assay
EGF	Epidermal growth factor
FGF	Fibroblaste growth factor
GAG	Glycoaminoglycane
HBSS	Hanks' Balanced Salt Solution
IGF	Insulin like growth factor
JX	Jour n°X
LCA	Ligament croisé antérieur
LCD	Light crystal display
LLE	Ligament latéral externe
LLI	Ligament latéral interne
MTT	bromure de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium
PAF	Paraformaldéhyde
PBS	Phosphate Buffered Solution
PCI	Peripheral component interconnected
PCL	Poly(ε-caprolactone)
PET	Polyétylène téréphtalate
PDGF	Facteur de croissance des plaquettes sanguines (sigle anglo-saxon)
PG	Protéoglycane
PGA	Acide polyglycolique
PLCL	Acide poly(lactique-co-caprolactone)

PLGA	Acide lactique-co-glycolique
PLLA	Acide poly(L-lactique)
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
PX	Passage n°X
RER	Réticulum Endoplasmique Rugueux
SVF	Sérum de veau fœtal
TGF-β	Transforming growth factor-β
TR	Tendon Rotulien
TN	Tenascine-C
UV	Ultra violet

Notations

X	Scalaire
$\underline{X}$	Vecteur
$\underline{\underline{X}}$	Tenseur d'ordre 2
X_j	$j^{ème}$ composante de la grandeur X
X^+	Grandeur d'activation
X^r	Grandeur de relaxation
$X^{,0}$	Grandeur à l'état initial
ΔX	Niveau de la grandeur thermodynamique X
$\Delta(\Delta X)$	Variation de la grandeur thermodynamique X
.	Produit contracté une fois
$\dot{X}$	Dérivée totale par rapport au temps
$\frac{\partial}{\partial}$	Dérivée partielle
$\exists!$	Il existe un unique
$\mathbb{R}^*$	Ensemble des réels non nuls
a	Fonction de glissement des processus
A	Affinité

$\underline{\underline{B}}$	Tenseur de Cauchy-Green gauche $\left(\underline{\underline{F}}\underline{\underline{F}}^{T}\right)$
$\underline{\underline{C}}$	Tenseur de Cauchy-Green droit $\left(\underline{\underline{F}}^{T}\underline{\underline{F}}\right)$
D	Etendue du spectre des temps de relaxation
ε	Déformation $\left(\varepsilon = \ln(\lambda)\right)$
E	Module d'élasticité
$\underline{\underline{E}}$	Tenseur des deformations de Green-Lagrange
F	Energie libre
$\underline{\underline{F}}$	Tenseur gradiant de la transformation $\left(F_{ij} = \frac{\partial x_i}{\partial X_j}\right)$
h	Constante de Planck
$J(\underline{X},t)$	Jacobien de la transformation
K	Volume d'activation
k_B	Constante de Boltzmann
λ	Elongation $\left(\lambda = \frac{l}{l_0}\right)$
ν	Fréquence de saut d'énergie
N	Nombre de modes
P	probabilité d'occurrence
$\underline{\underline{P}}$	Tenseur des contraintes de Piola-Lagrange $\left(\underline{\underline{P}} = J(\underline{X},t)\underline{\underline{\sigma}}.\underline{\underline{F}}^{-T}\right)$
ρ	Masse volumique
R	Constante des gaz parfaits
$\underline{\underline{\sigma}}$	Tenseur des contraintes de Cauchy
s	Entropie spécifique
$\underline{\underline{S}}$	Tenseur des contraintes de Piola-Kirchhoff $\left(\underline{\underline{S}} = 2\rho\frac{\partial W}{\partial \underline{\underline{C}}} = J(\underline{X},t)\underline{\underline{F}}^{-1}.\underline{\underline{\sigma}}.\underline{\underline{F}}^{-T}\right)$
τ	Temps de relaxation
t	Temps, instant, durée
T	Température absolue
u	Energie interne spécifique

ξ	Avancement de réaction

Table des matières

AVANT-PROPOS 23

I. ETAT DE L'ART 27

I.1. LES LIGAMENTS ET TENDONS 29

I.1.1. PHYSIOLOGIE DES LIGAMENTS ET TENDONS 29

I.1.1.1. Composition générale 29

I.1.1.2. Les Fibroblastes 30

I.1.1.3. La matrice extracellulaire 32

I.1.1.4. Les fonctions des ligaments et des tendons 34

I.1.2. LES PATHOLOGIES DES LIGAMENTS ET TENDONS 35

I.1.2.1. Les tendinites 35

I.1.2.2. Les entorses 36

I.1.2.3. Le cas particulier du genou 37

I.1.3. STRATEGIES THERAPEUTIQUES ACTUELLES DES LESIONS DES LIGAMENTS ET TENDONS 38

I.1.3.1. Les traitements non-chirurgicaux 39

I.1.3.2. Les traitements chirurgicaux 39

I.2. L'INGENIERIE TISSULAIRE DES LIGAMENTS ET DES TENDONS 41

I.2.1. LES DIFFERENTES VOIES THERAPEUTIQUES EXPLOREES 41

I.2.2. LES SOURCES CELLULAIRES 43

I.2.2.1. Les fibroblastes 44

I.2.2.2. Les cellules souches 44

I.2.2.2.1. LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES 44

I.2.2.2.2. LES CELLULES SOUCHES ADULTES 45

I.2.3. LES MATRICES DE SUPPORT 46

I.2.3.1. Les matériaux naturels 46

I.2.3.2. Les matériaux synthétiques 48

I.2.3.3. Les structures employées 49

I.2.4. LES BIOREACTEURS 51

I.2.4.1. Les bioréacteurs statiques 51

I.2.4.2. Les bioréacteurs à agitation et à perfusion 52

I.2.4.3. Les bioréacteurs à stimulations mécaniques 52

I.2.4.4. Les bioréacteurs pour les ligaments et les tendons 53

I.2.5. LES FACTEURS BIOCHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES 55

I.2.5.1. Le dioxygène 55

I.2.5.2. La vitamine C et ses dérivés 55

I.2.5.3. Les facteurs de croissance 55

I.3. BIOMECANIQUE DES LIGAMENTS ET TENDONS 56

I.3.1. PROPRIETES MECANIQUES DES LIGAMENTS ET DES TENDONS 57

I.3.1.1. Réponse en traction simple 57

I.3.1.2. Réponse lors d'un essai uniaxial de relaxation 58

I.3.1.3. Sollicitations en fluage 59

I.3.1.4. Sollicitations cycliques 60

I.3.2. LES MODELES ACTUELS 61

I.3.2.1. Les modèles de comportement élastique 62

I.3.2.2. Modèles de comportement viscoélastique 63

I.3.2.3. Les modèles de fluage 66

I.3.2.4. Applications à la modélisation des articulations 66

II. CONCEPTION ET REALISATION D'UN BIOREACTEUR DE LIGAMENTS 69

II.1. CAHIER DES CHARGES 71

II.2. SOLUTIONS TECHNIQUES CHOISIES 73

II.2.1. SYSTEME DE STIMULATION MECANIQUE 73

II.2.1.1. Schéma cinématique et plan CAO 74

II.2.1.2. Pupitre de commande 77

II.2.2. SYSTEME DE CULTURE CELLULAIRE 79

II.2.3. CHOIX DES MATERIAUX 81

II.3. VALIDATION 82

II.3.1. MATERIEL ET METHODES 82

II.3.1.1. Evaluation mécanique et thermique 82

II.3.1.1.1. ETALONNAGE DES CAPTEURS 82

II.3.1.1.2. MESURE DES PERFORMANCES DU BIOREACTEUR 84

II.3.1.2. Matrice de support utilisée 84

II.3.1.3. Culture cellulaire 85

II.3.1.4. Prolifération cellulaire 87

II.3.1.5. Viabilité et prolifération des CSMM sur la matrice de support 88

II.3.1.6. Evaluation des chambres de culture et perfusion 90

II.3.1.7. Evaluation du principe de culture sous stimulation cyclique 91

II.3.1.8. Tests statistiques 93

II.3.2. RESULTATS 93

II.3.2.1. Performances mécanique et thermique. 93

II.3.2.2. Viabilité et prolifération des CSMM sur la matrice de support. 94

II.3.2.3. Evaluation des chambres de culture et perfusion. 95

II.3.2.4. Evaluation du principe de culture sous stimulation cyclique. 96

II.4. DISCUSSION 97

II.4.1. ASPECT MECANIQUE 97

II.4.2. ASPECT CULTURE CELLULAIRE 99

II.4.3. CULTURE CELLULAIRE SOUS SOLLICITATION MECANIQUE CYCLIQUE 101

II.5. CONCLUSION 104

III. MODELE THERMODYNAMIQUE DU COMPORTEMENT DES TENDONS D'ACHILLE DE LAPIN 107

III.1. ETUDE EXPERIMENTALE 109

III.1.1. MATERIELS ET METHODES 109

III.1.1.1. Prélèvement des tendons 109

III.1.1.2. Montage du dispositif 109

III.1.1.3. Sollicitations mécaniques imposées 111

III.1.2. RESULTATS EXPERIMENTAUX 112

III.2. FORMALISME THERMODYNAMIQUE 115

III.2.1. INTRODUCTION 115

III.2.2. EQUATIONS DE BASE 115

III.2.3. LOIS D'ETAT 116

III.2.4. RELATIONS CINETIQUES ET SPECTRE DE RELAXATION 117

III.2.4.1. Etat Relaxé 117

III.2.4.2. Loi cinétique d'Onsager 118

III.2.4.3. Modélisation des temps de relaxation 118

III.2.5. FORMALISME THERMODYNAMIQUE DE SOLLICITATIONS UNIAXIALES ISOTHERMES ... 124

III.3. MODELE MECANIQUE 126

III.3.1. REPONSE EN CONTRAINTE 126

III.3.1.1. Module d'élasticité apparent 126
III.3.1.2. Temps de relaxation de référence et fonction de glissement 127
III.3.2. CONTRAINTE RELAXEE 128
III.3.2.1. Module d'élasticité apparent 128
III.3.2.2. Fonction de glissement 129
III.3.3. EXPRESSION DU MODELE MECANIQUE COMPLET 129
III.4. RESULTATS THEORIQUES 130
III.5. ETUDE DE SENSIBILITE 133
III.6. DISCUSSION 139
III.6.1. LES TESTS MECANIQUES 139
III.6.2. LE MODELE 141
III.6.3. AJUSTEMENT DES PARAMETRES DU MODELE 143
III.7. CONCLUSION 144

IV. EVALUATION MECANIQUE DES STRUCTURES DE SUBSTITUTION DES TENDONS 147

IV.1. PROPOSITION DE PROCEDURE D'EVALUATION 149
IV.2. ADAPTATION DU MODELE 150
IV.3. MATERIELS ET METHODES 152
IV.3.1. SOLLICITATIONS IMPOSEES 152
IV.3.2. TENDONS D'ACHILLE 153
IV.3.3. MATRICES DE SUPPORT 154
IV.3.3.1. Matrice en fibres de soie torsadées 154
IV.3.3.2. Matrice tricotée / microfibrillaire 155
IV.4. RESULTATS 155
IV.4.1. RESULTATS EXPERIMENTAUX 155
IV.4.2. AJUSTEMENTS DES PARAMETRES 158
IV.5. CONCLUSION 167

CONCLUSION ET PERSPECTIVES 171

ANNEXES 179

ANNEXE 1 : PROCEDURE DE TRICOTAGE 181
ANNEXE 2 : PRINCIPE DE L'ELECTROSPINNING 183

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES 187

Indexe des illustrations

Indexe des figures

Figure I.1. Coupe histologique longitudinale de ligament et tendon 30
Figure I.2. Fibroblastes ligamentaires vus en microscopie optique et électronique 31
Figure I.3. Synthèse des collagènes par les fibroblastes et organisation supramoléculaire des protéines matricielles dans le compartiment extracellulaire 32
Figure I.4. Agencement tridimensionnel des molécules de tropocollagène [DORY, 2006].... 33
Figure I.5. Ultrastructure des ligaments et tendons..... 34
Figure I.6. Planche anatomique du genou 37
Figure I.7. Cas de rupture du ligament croisé antérieur 38
Figure I.8. Principes de la reconstruction de tissu en ingénierie tissulaire 43
Figure I.9. Plasticité des cellules souches mésenchymateuses médullaires 46
Figure I.10. Formules chimiques de polyesters utilisés en ingénierie tissulaire 48
Figure I.11. Exemple de structures utilisées en ingénierie tissulaire 50
Figure I.12. Exemples de bioréacteurs utilisés en culture cellulaire 52
Figure I.13. Exemples des principaux bioréacteurs à stimulation mécanique pour l'ingénierie tissulaire de ligaments et tendons..... 54
Figure I.14. Comportement caractéristique d'un tendon lors d'une traction uniaxiale..... 58
Figure I.15. Comportement typique des ligaments et tendons en relaxation 59
Figure I.16. Comportement typique de ligaments et tendons en fluage..... 60
Figure I.17. Comportement typique des ligaments et tendons soumis à un test de sollicitation cyclique. 61
Figure I.18. Exemples de modélisation numérique de ligaments..... 67
Figure II.1. Schémas cinématiques envisagés pour la conception du bioréacteur 74
Figure II.2. Schémas cinématiques des bioréacteurs de traction-torsion antérieurs 75
Figure II.3. Dessin d'ensemble et agrandissement de la partie mécanique du bioréacteur..... 76
Figure II.4. Vues du pupitre de commande..... 77
Figure II.5. Mouvements de translation et de rotation imposés en fonction du temps 78
Figure II.6. Ensemble bioréacteur et pupitre de commande..... 78
Figure II.7. Dessin de la chambre de culture..... 80

Figure II.8. Dessin de la nouvelle chambre 80
Figure II.9. Schéma de la perfusion et photographie de l'ensemble de système de culture 81
Figure II.10. Calibration des capteurs de position en translation et en rotation 83
Figure II.11. Matrice de support utilisée pour l'évaluation du bioréacteur 84
Figure II.12. Courbe étalon d'AlamarBlue® à 3% (v/v) 88
Figure II.13. Photographie des puits d'ensemencement des matrices de support 89
Figure II.14. Principe du marquage en immunofluorescence indirect 92
Figure II.15. Comparaison des températures du réservoir et de la pièce 94
Figure II.16. Evolution du métabolisme des cellules sur les matrices de support 95
Figure II.17. Image des noyaux de cellules sur la matrice de support à J70 95
Figure II.18. Tests AlamarBlue® à J0 et J7 97
Figure II.19. Comparaison des intensités de fluorescence des collagènes I et III 97
Figure II.20. Dessin tridimensionnel de l'enceinte ou incubateur chauffant et portatif 100
Figure II.21. Chambre de culture simplifiée en perspective et en coupe 101
Figure II.22. Comparaison des intensités de fluorescences normées des collagènes I et III .. 102
Figure III.1. Tendon d'Achille prélevé sur un lapin 109
Figure III.2. Schéma du dispositif expérimental 110
Figure III.3. Approximation de la section du tendon d'Achille obtenue par IRM 111
Figure III.4. Réponse typique en traction simple à vitesse d'élongation constante 112
Figure III.5. Cycles de charge et de décharge à vitesse d'élongation constante 113
Figure III.6. Séquences d'essais de relaxation successifs 113
Figure III.7. Cycles de fluage dynamique et de fatigue à vitesse d'élongation constante 114
Figure III.8. Représentation schématique de la variation de la barrière d'énergie 120
Figure III.9. Répartition des poids des processus dissipatifs 123
Figure III.10. Représentation schématique des différentes contributions 126
Figure III.11. Résumé de la modélisation des tendons d'Achille en traction uniaxiale 130
Figure III.12. Pré-ajustement des paramètres de la contrainte relaxée 132
Figure III.13. Confrontation du modèle théorique et des résultats expérimentaux 133
Figure III.14. Exemple de représentation graphique des sensibilités 137
Figure III.15. Exemple de vérification de corrélation de paramètres 137
Figure IV.1. Chargement appliqué aux structures étudiées 153
Figure IV.2. Représentation schématique des différents mors utilisés pour l'évaluation 153
Figure IV.3. Matrices de support étudiées 154
Figure IV.4. Réponse des tendons d'Achille de lapin au chargement 156

Figure IV.5. Réponse en temps et en élongation des structures au chargement 158
Figure IV.6. Courbes d'ajustement du modèle simplifié aux réponses des tendons en fonction du temps 161
Figure IV.7. Courbes d'ajustement du modèle simplifié aux réponses des tendons en fonction de la déformation 162
Figure IV.8. Comparaison de la réponse des tendons et du modèle simplifié 163
Figure IV.9. Vérification de la cohérence du modèle simplifié 164
Figure IV.10. Courbes d'ajustement du modèle simplifié aux réponses des structures 166
Figure A.1. Machine à tricoter 181
Figure A.2. Schéma explicatif de la fermeture du haut de la structure tricotée 182
Figure A.3. Principe de l'electrospinning et collecteur rotatif 183

Indexe des tableaux

Tableau I.1. Comparaison des caractéristiques des ligaments et tendons 31
Tableau I.2. Facteurs de croissance utilisés en reconstruction des tendons et ligaments 56
Tableau I.3. Exemple de modèles élastiques 63
Tableau II.1. Résumé du cahier des charges 73
Tableau II.2. Cahier des charges de la partie commande 77
Tableau II.3. Fréquences mesurées en fonction de la consigne : moteur de translation 93
Tableau II.4. Fréquence mesurée en fonction de la consigne : moteur de rotation 94
Tableau II.5. Résultats d'évaluation de prolifération et du pH 96
Tableau III.1. Evolution du temps de relaxation et de la contrainte relaxée 114
Tableau III.2. Valeurs des paramètres imposés et pré-ajustés 131
Tableau III.3. Valeurs des paramètres déterminés en fonction des essais 132
Tableau III.4. Résultats de l'étude de sensibilité selon le test mécanique 136
Tableau III.5. Paramètres sensibles linéairement corrélés 138
Tableau IV.1. Résultats expérimentaux caractéristiques de la relaxation et de la rupture 157
Tableau IV.2. Valeurs des paramètres ajustés aux expériences sur les tendons d'Achille 160
Tableau IV.3. Comparaison des structures de substitution avec les tendons d'Achille 166

AVANT-PROPOS

Au sein du corps humain, les ligaments et les tendons jouent un rôle prépondérant au niveau de la mobilité et de la stabilité des articulations. Le genou en est un exemple caractéristique, sans les différents ligaments le constituant, et en particulier le ligament croisé antérieur (LCA), cette articulation risque de se luxer de façon chronique. Ces trois dernières décennies, l'expansion de la pratique courante du sport et souvent de sports traumatiques pour les articulations a entraîné une nette augmentation du nombre d'interventions chirurgicales.

Bien que la chirurgie moderne permette de réaliser des greffes autologues en utilisant des parties de tendons lors de ligamentoplasties, comme le tiers central du tendon rotulien (TR) pour une reconstruction du LCA, les différences de structure du greffon et du tissu sain nuisent à la qualité mécanique du tissu greffé qui permet de recouvrir au mieux 50% des propriétés mécaniques du tissu natif même après ligamentisation [DJIAN *et al.*, 1999]. De plus, le prélèvement du greffon fragilise le tissu prélevé et induit généralement des douleurs.

Pour pallier ces inconvénients, les chercheurs en ingénierie tissulaire de ligaments et de tendons tentent de reconstruire *in vivo* ou *in vitro* ces tissus à partir de cellules autologues. Le but est de produire un néo-tissu de substitution le plus proche possible du tissu sain permettant ainsi de limiter la souffrance du patient, d'améliorer la cicatrisation et par conséquent de diminuer les coûts des soins chirurgicaux. En effet, une meilleure qualité de greffon diminuera le nombre de ligamentoplasties itératives ainsi que les risques de dégénérescences induites par des faiblesses ligamentaires et tendineuses comme des arthroses.

L'ingénierie tissulaire est une discipline récente, c'est en 1993 [LANGER et VACANTI, 1993] que la discipline est pour la première fois définie. Cette discipline est au carrefour des sciences du vivant, de la biochimie, de la biomécanique… pour la reconstruction ou la régénération de tissus ou d'organes lésés ou détruits.

La recherche et les techniques en ingénierie tissulaire, depuis 1993, ont fortement évolué, nécessitant le développement de nouveaux systèmes expérimentaux spécifiques aux cultures cellulaire et tissulaire. En effet, les cellules ligamentaires et tendineuses, les fibroblastes, nécessitent un support de culture. De plus, de nombreuses études ont montré que la stimulation mécanique spécifique au tissu induisait une réponse transductionnelle permettant la différenciation des cellules dites souches ou le maintien des caractères des

cellules ainsi qu'une stimulation de la sécrétion protéique [VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007].

Ainsi, nous avons entrepris de nous doter d'un bioréacteur permettant la culture *in vitro* de tissus ligamentaires ou tendineux de taille centimétrique pour la production de bio-prothèses pouvant se substituer aux greffons. En parallèle, une étude des propriétés expérimentales et une modélisation théorique de ces tissus ont été réalisées pour approfondir nos connaissances sur les structures prépondérantes de ces tissus ainsi que de pouvoir les comparer aux tissus de substitution biologiques ou synthétiques.

Ce mémoire de thèse s'articule en quatre chapitres :

Le premier chapitre est une présentation globale des connaissances sur la structure des tendons et des ligaments, les risques d'entorses ainsi que les soins actuellement proposés en fonction de leur gravité. Les principes généraux en ingénierie tissulaire sont ensuite présentés ainsi qu'un panel des techniques, *in vitro,* de cultures cellulaires et tissulaires pour les tendons et les ligaments. Ce chapitre se termine sur une présentation des propriétés mécaniques des tendons et ligaments et un ensemble de modèles les plus utilisés pour décrire le comportement de ces tissus.

Le deuxième chapitre traite des travaux réalisés sur le bioréacteur de ligaments. Ces travaux sont présentés en divisant le système en une partie mécanique permettant l'application des mouvements et une partie de culture comprenant l'ensemble des pièces utilisées pour permettre la culture de cellules et de tissus à long terme (de quelques jours à quelques mois). A chaque partie, l'étude est réalisée par étape comprenant une phase de conception et une phase d'évaluation après réalisation.

Le troisième chapitre traite, quant à lui, des propriétés mécaniques des tendons et ligaments à travers une étude expérimentale des comportements mécaniques, sur des tendons d'Achilles de lapin, qui a conduit au développement d'un modèle théorique fondé sur un formalisme thermodynamique des états de relaxation.

Le dernier chapitre propose une méthode d'évaluation mécanique des tissus de substitution des tendons et ligaments qu'ils soient biologiques ou non. Cette méthode consiste en un ensemble de sollicitations mécaniques permettant d'évaluer et de quantifier les paramètres mécaniques caractéristiques des tendons et des ligaments, à l'aide du modèle présenté au chapitre 3.

Chapitre I :
ETAT DE L'ART

I.1. LES LIGAMENTS ET TENDONS

I.1.1. PHYSIOLOGIE DES LIGAMENTS ET TENDONS

I.1.1.1. Composition générale

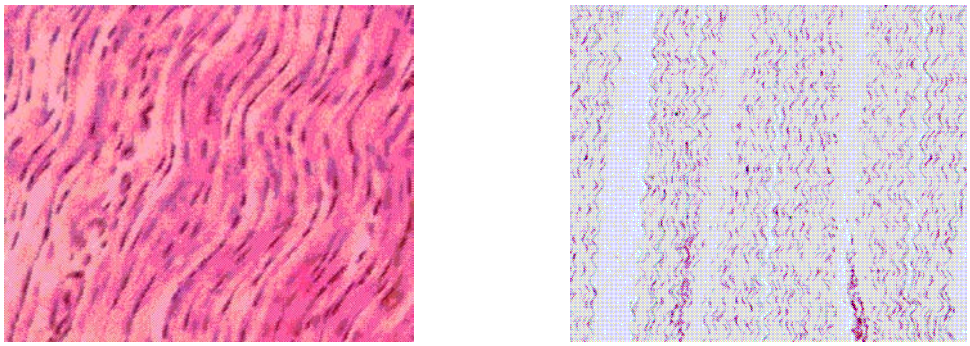
Les ligaments et tendons sont des tissus conjonctifs fibreux denses et généralement peu vascularisés. Ces tissus sont formés d'un réseau tridimensionnel de fibroblastes (environ 20% du volume total) et d'une matrice extracellulaire, les entourant, composée d'eau (environ 60 à 80% du poids net), de collagènes (plus de 70% du poids sec), d'élastine, de glycoaminoglycanes (GAGs) et de protéoglycanes en plus faible quantité [AMIEL *et al.*, 1984; DJIAN *et al.*, 1999; WOO *et al.*, 2006]. L'ensemble cellules et matrices extracellulaires forme une structure tridimensionnelle complexe.

Les collagènes présents dans les ligaments et tendons sont essentiellement organisés sous forme de faisceaux de fibres hétérotypiques de collagènes I (80%), III (jusqu'à 5% pour les tendons et de 9 à 12% pour les ligaments) et de collagène V (2-5%) [BIRK, 2001; DJIAN *et al.*, 1999; WANG, 2006]. D'autres collagènes sont également présents mais en très faible quantité comme les collagènes XI, XII et XIV.

Le diamètre de ces fibres présente une distribution bimodale tant pour les ligaments que pour les tendons, avec des valeurs moyennes de diamètre de fibres différentes pour chaque mode. En effet, les tendons ont des diamètres de fibres plus gros que ceux des ligaments. Ainsi, pour le LCA, 25% de la section est occupée par des fibres de moins de 50nm de diamètre et 66% de la section par des fibres de diamètre variant de 75 à 125nm tandis que pour le tendon rotulien, 85% de sa section est constituée de fibres de plus de 100nm [DJIAN *et al.*, 1999]. Les fibroblastes, plus ou moins nombreux, s'intercalent quant à eux en rangs longitudinaux entre les faisceaux de fibres de collagènes (Tableau I.1).

Bien que la composition collagénique entre les tendons et les ligaments soit relativement similaire, leur structure et la quantité de glycoprotéines leur confèrent des caractéristiques mécaniques différentes en relation étroite avec les sollicitations auxquelles ces tissus sont confrontés (lois générales de l'adaptation tissulaire décrites par Roux en 1905, [DJIAN, 2004]). Contrairement à ce qui est couramment admis, les fibres de collagènes des ligaments et des tendons ne sont pas forcément agencées en rangs parallèles avec une légère ondulation comme dans le cas des ligaments et tendon du genou, Figure I.1. [DIAMANT *et al.*, 1972; NELISSEN et HOGENDOORN, 2001], mais peuvent être obliques comme certains ligaments de la main [BOGUMILL, 2002]) ou même en spirales dans le cas du ligament cochléaire [PROVENZANO et VANDERBY, 2006]).

Toutefois, les ligaments et les tendons du genou, ainsi que le tendon d'Achille, présentent une organisation plutôt en rangs parallèles dans la direction longitudinale du tissu. Dans la suite de ce mémoire, nous traiterons exclusivement de tendons et de ligaments similaires aux tendons d'Achille et aux ligaments du genou.



A **B**

Figure I.1. Coupe histologique longitudinale de ligament et tendon

A : tendon (×300) ; B : ligament (×100) (extrait de http://homepage.mac.com/danielbalas)

I.1.1.2. Les Fibroblastes

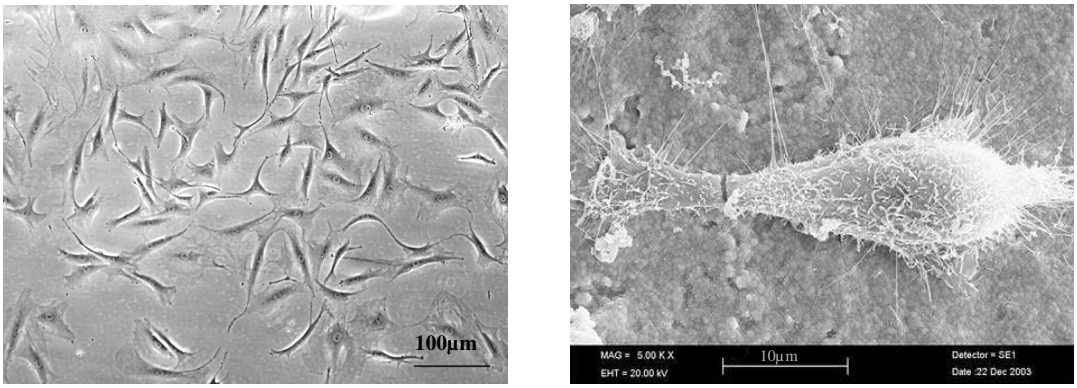
Les fibroblastes sont des cellules fusiformes parfois étoilées possédant des prolongements ramifiés. Leur taille est de 20 à 30µm en longueur et de 5 à 10µm en largeur (Figure I.2.). Ces cellules sont responsables de la synthèse et du renouvellement des collagènes au sein des tissus qu'ils composent et plus largement de la matrice extracellulaire. Elles sécrètent des molécules de collagènes mais aussi des protéoglycanes, comme les GAGs, pour l'entretien et la réparation de la matrice extracellulaire ainsi que des métalloprotéinases, telles les collagénases, afin de dégrader les molécules de collagènes à remplacer. Les fibroblastes sécrètent également des molécules anti-infectieuses et anti-virales -comme les interférons- qui interviennent dans les processus immunitaires [LEMAHIEU et DECOSTER, 2004].

Au sein d'un ligament ou d'un tendon, les fibroblastes s'organisent en réseaux autour des faisceaux de fibres de collagènes dans la direction longitudinale. Ce réseau cellulaire lié aux fibres de collagènes améliore les propriétés mécaniques en supportant une partie de la charge bien que le collagène en supporte la plus grande part. De plus, il a été montré que les sollicitations mécaniques agissent sur les cellules qui augmentent alors la sécrétion de certaines molécules *via* l'activation de gènes spécifiques pouvant eux-mêmes activer d'autres gènes en cascade [ALTMAN *et al.*, 2002a; VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004; WANG, 2006].

Tableau I.1. Comparaison des caractéristiques des ligaments et tendons

	Ligaments	Tendons
Liaison	os-os	os-muscle
Fonction	• Stabilité des articulations • Prévention des mouvements extrêmes	• Transmission des efforts musculaires • Positionnement optimal du ventre musculaire par rapport à l'os
Eau	60 à 80% du poids net	
Collagènes	70 à 80% du poids sec	
Collagène de type I	80%	
Collagène de type III	9 à 12%	≤ 5%
Collagène de type V	2 à 5%	
Fibres	Longitudinales avec ondulation sinusoïdale mais de périodes différentes Distribution bimodale des diamètres des fibres	
	Pour 85% de la section (Ø ≤ 100nm)	45% de la section (Ø > 100nm)
GAG	9,89±0,56mg/g de tissu sec	2,75±0,20mg/g de tissu sec
Autres protéines	élastine <1% fibronectine décorine etc…	2% d'élastine fibronectine décorine etc…
Fibroblastes	Disposition longitudinale en réseau	
	noyaux plus gros que les ténocytes	

[AMIEL *et al.*, 1984; DJIAN *et al.*, 1999; LIN *et al.*, 2004; VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004; WOO *et al.*, 2006]



A **B**

Figure I.2. Fibroblastes ligamentaires vus en microscopie optique et électronique
A : microscope inversé (×100) ; B : MEB (extrait de http://ceraroot.com et accord de M^me^ Zhang Lei)

I.1.1.3. La matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire est divisible en deux parties : la matrice extracellulaire fibreuse et la substance fondamentale. La matrice extracellulaire fibreuse des ligaments et des tendons est principalement constituée de fibres hétérotypiques de collagènes de type I, III et V et dans une moindre part d'élastine et de collagènes de type XI, XII et XIV [AMIEL *et al.*, 1984; DJIAN *et al.*, 1999; WOO *et al.*, 2006]. La composition collagénique des tissus conjonctifs leur confère différentes propriétés mécaniques. En effet, le collagène de type I est plus résistant que celui de type III qui est, par contre, plus élastique et confère aux ligaments et aux tendons plus ou moins d'élasticité en fonction des proportions respectives en collagènes. Quant au collagène de type V, des études sur une maladie génétique, le syndrome d'Ehlers-Danlos, ont montré que ce collagène est en partie responsable de la taille des fibres de collagènes hétérotypiques [FICHARD *et al.*, 2003]. En effet, pour des raisons d'encombrement stérique d'une zone des molécules de collagène V, la croissance latérale des fibres (diamètre) est limitée par la quantité de collagène V [BIRK, 2001; BIRK *et al.*, 1990].

Il existe 28 types de collagènes qui sont numérotés en chiffre romain par ordre chronologique de leur découverte. Certains auteurs les ont classés en 7 catégories selon leurs propriétés structurales [HELLER *et al.*].

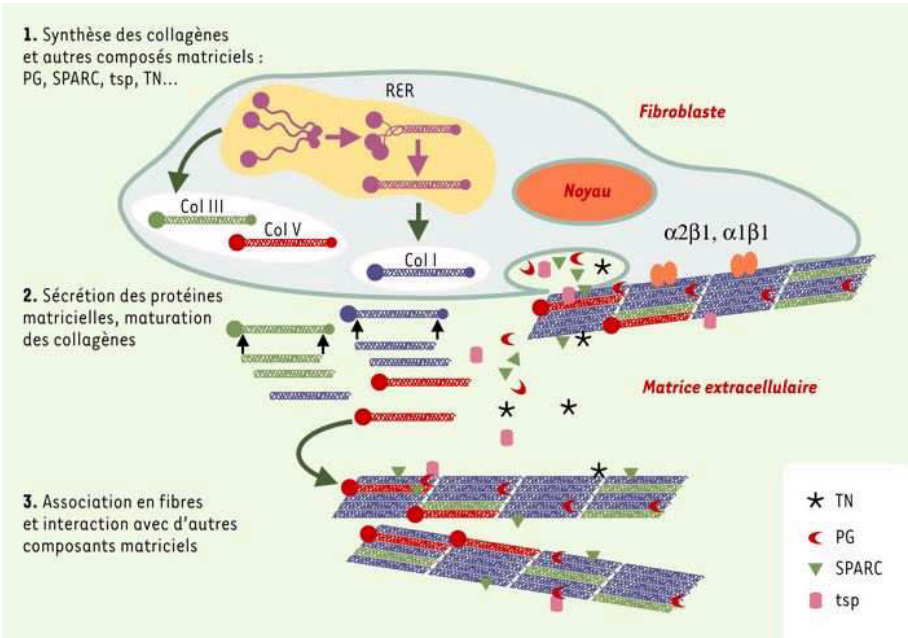


Figure I.3. Synthèse des collagènes par les fibroblastes et organisation supramoléculaire des protéines matricielles dans le compartiment extracellulaire

TN : ténascine ; PG : protéoglycanes ; SPARC : secreted protein acidic and rich in cystein ; tsp : thrombospondine ; RER : réticulum endoplasmique rugueux ; Col : collagène

Extrait de [FICHARD *et al.*, 2003]

Les collagènes fibrillaires à striations périodiques sont les plus abondants au sein des ligaments et des tendons (collagènes I, III et V). Les molécules de collagènes fibrillaires sont formées à partir de molécules de procollagène, elles-mêmes formées de trois chaînes α-polypeptidiques assemblées en triple hélice droite d'environ 280nm de long et 1,5nm de diamètre. Chacune des chaînes polypeptidiques a une structure périodique d'acide aminé Gly-X-Y où Gly est la glycine et X et Y, deux autres acides aminés, le plus fréquemment la proline et l'hydroxyproline. Les extrémités de la triple hélice sont formées de télopeptides et de propeptides non hélicoïdaux qui ne présentent pas de structure périodique, mais qui possèdent soit un groupe carboné soit un groupe amine qui polarise les molécules. Ces molécules sont alors libérées à la surface de la membrane des fibroblastes, par exocytose. Les propeptides vont alors être digérés par les procollagènes C- et N-protéinases pour conduire à la molécule de tropocollagène. Du fait de la « polarité » de leurs extrêmités, ces molécules s'assemblent alors spontanément entre-elles à la surface des fibroblastes, pour conduire à la fibrille Figure I.3. Cet assemblage est stabilisé par l'intervention d'une enzyme, la lysyl oxidase, qui oxyde le carbone en position ε sur la chaîne latérale de chacune des deux lysines et permet ainsi des réticulations spontanées sous forme de doubles liaisons carbone-carbone entre molécules de tropocollagène mais aussi entre les chaînes peptidiques intervenant dans la structure du tropocollagène [KADLER *et al.*, 1996; SILVER *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2005]. Les sites de réticulations font que les molécules de tropocollagène sont décalées d'environ un quart de leur longueur, ce qui leur donne cet aspect de striation périodique de 68nm de période (Figure I.4., [DORY, 2006]).

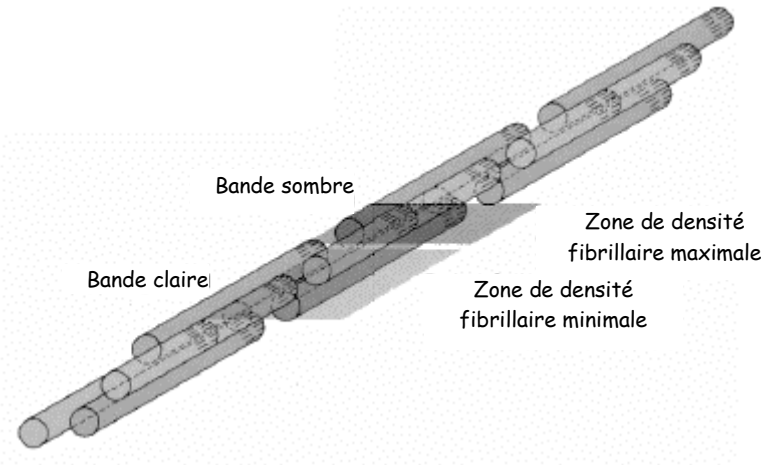


Figure I.4. Agencement tridimensionnel des molécules de tropocollagène [DORY, 2006]

Les fibrilles ont un diamètre d'une centaine de nanomètres et une longueur de 1 à 10µm. Elles vont à leur tour s'assembler pour former des fibres de collagènes de quelques

dizaines de micromètres et de longueur encore indéterminée. Ces fibres de collagènes vont se regrouper en sous-faisceaux dits primaires puis en faisceaux dits secondaires, chacun entouré d'une membrane, l'endoténon. Enfin, les faisceaux sont eux-mêmes entourés d'une membrane, l'épitendon, pour former ainsi le tendon ou le ligament (Figure I.5.).

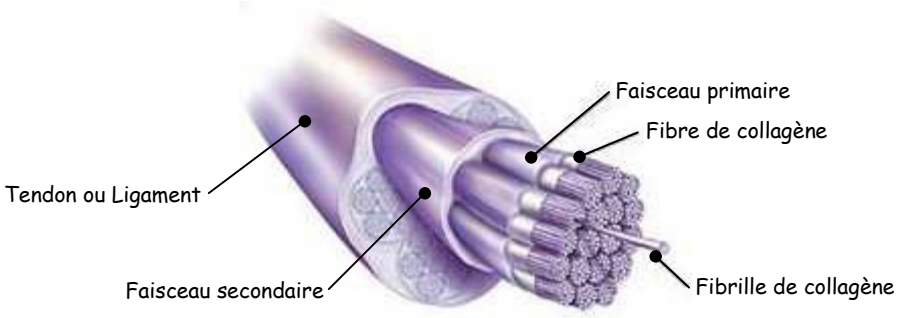


Figure I.5. Ultrastructure des ligaments et tendons

La matrice extracellulaire non-fibreuse encore appelée *substance fondamentale* est constituée essentiellement d'eau et de macromolécules : protéoglycanes (décorine, lumicane, fibromoduline, GAGs), glycoprotéines, protéines d'adhésion (la ténascine-C), etc. Cette substance, qui a la consistance d'un gel remplit l'espace entre les fibres et les cellules, améliore l'adhérence cellulaire et permet de stabiliser le squelette de la structure fibrillaire contribuant ainsi à la résistance mécanique. Des études ont montré le rôle prépondérant que les protéoglycanes ont dans la régulation de la maturation des fibres de collagènes. Par exemple, des souris déficientes en lumicane et fibromoduline souffrent d'hyperlaxités articulaires. Les fibres de leurs tendons présentent une distribution de diamètre de fibres plus petites et leur contour est anormalement irrégulier. Ces différences fibrillaires induisent une diminution des propriétés mécaniques des tendons et des laxités articulaires [AMIEYE *et al.*, 2002; DANIELSON *et al.*, 1997; ZHANG *et al.*, 2005].

Toutefois, la structure moléculaire de la substance fondamentale n'est pas bien comprise et reste encore aujourd'hui un sujet de polémique. Notamment, au cours de ces dernières années, la modélisation du complexe fibrilles de collagènes, décorine et GAGs a été réfutée par plusieurs auteurs [FESSEL *et al.*, 2008; PROVENZANO et VANDERBY, 2006].

I.1.1.4. Les fonctions des ligaments et des tendons

Les ligaments et les tendons, de par leurs positions dans le corps, ont des fonctions plus ou moins différentes. Ces deux tissus conjonctifs sont responsables de la transmission des forces au squelette. Les tendons assurant le plus souvent une liaison muscle-os, ils permettent le transfert de la force musculaire aux os conduisant ainsi le mouvement. Ils sont

également responsables de l'orientation du muscle par rapport aux os. Les ligaments, quant à eux, établissent des liaisons os-os et assurent, outre le transfert d'efforts d'os à os aux niveaux des articulations, la stabilité de l'articulation en limitant certains degrés de liberté. Par exemple, au niveau du genou, les ligaments permettent une importante rotation perpendiculaire au plan de la jambe (≈140°) et de légères rotations permettant des mouvements de pivot dans les deux autres directions : jusqu'à 40° dans la direction axiale et pratiquement nulle dans la direction transverse. Ils assurent aussi la cohésion du genou en limitant fortement la translation axiale du genou (ligaments croisés).

I.1.2. LES PATHOLOGIES DES LIGAMENTS ET TENDONS

Les investigations en traumatologie montrent qu'au cours de la vie et en fonction du sexe, nous sommes plus ou moins susceptibles de subir un traumatisme physique. En effet, une étude [BERNASCONI, 2007] sur un échantillon de 7 300 personnes a permis d'établir que 71% des lésions apparaissent chez les hommes contre 29% chez les femmes et que leur tranche d'âge était plus souvent situées entre 15-24 ans et entre 25-35 ans (chacune représentant 33% des lésions). De plus, parmi l'ensemble des lésions, les tendinites et les entorses sont les plus répandues (≈47%), avec une prépondérance au niveau du genou, de la cheville et de l'épaule. Dans la suite de cette section nous allons traiter des tendinites et des entorses en général en prenant pour exemple plutôt le genou et la cheville qui représentent 71% des lésions des membres inférieurs. Ces chiffres sont à moduler en fonction de l'activité physique, sportive ou professionnelle du sujet. Dans l'ensemble, ces 15 dernières années, les traumatismes ligamentaires et tendineux ont sensiblement augmenté du fait d'une amélioration des équipements (diminution des fractures), d'une plus grande pratique sportive et de l'émergence de nouveaux sports à risque pour les articulations (sports extrêmes). Le coût des tendinites et des entorses pour l'assurance maladie française est évalué respectivement à 541 millions d'euros et 638 millions d'euros par an [BERTUCCELLI et MACCAGNAN, 2005].

I.1.2.1. Les tendinites

Toute pathologie inflammatoire atteignant les tendons est qualifiée de tendinite. Elles résultent de traumatismes allant de sollicitations excessives ou répétées à la rupture de faisceaux de fibres de collagènes en passant par l'infection. Elles sont classées en cinq catégories :

- Les tendinites de traction sont les plus courantes au niveau du genou, elles surviennent soit progressivement lors de mouvements répétitifs de longues durées (surentraînement et maladies professionnelles), lors d'une impulsion ou d'un effort intense.
- Les tendinites de frottement ou de compression résultent d'un frottement qui crée une inflammation au niveau de la gaine synoviale entourant le tendon (exemple : tendon du fascia lata). La pathologie associée est la ténosynovite [PARIER et LUCAS, 2004].
- Les tendinites par choc, plus rares, surviennent lors d'un impact, et se rencontrent plus fréquemment lors de pratiques de sport de contact [PARIER].
- Les tendinites infectieuses proviennent d'infections qui viennent se loger sur les tendons. La provenance la plus courante est une infection bucco-dentaire provoquée par une carie.
- Les tendinites peuvent également avoir une cause alimentaire : une déshydratation, un taux sanguin élevé en acide urique (exemple trop de sucre), certains allergènes comme l'histamine qui est présent dans certains aliments (choux, conserves stérilisées, etc.).

En général, les tendinites sont liées à la rupture totale ou partielle de faisceaux de fibres de collagènes. L'inflammation et l'œdème qui en résultent sont des conséquences du processus cicatriciel. Il est à noter que le niveau relativement important d'innervation des tendons rend les tendinites très douloureuses.

I.1.2.2. Les entorses

Les entorses sont des pathologies touchant les ligaments mais n'entraînant pas de perte permanente de rapports normaux de l'articulation, contrairement à la luxation. Le terme d'entorse est donc, comme celui de tendinite, générique, qui recouvre plusieurs niveaux allant de l'entorse bénigne à l'entorse grave. Les entorses surviennent lors d'un mouvement forcé sur l'articulation, les ligaments empêchant ces amplitudes sont soit intacts, auquel cas il en résulte une fracture, soit endommagés, auquel cas il en résulte une élongation, momentanée ou permanente, voire une rupture partielle ou totale, qualifiées d'entorses bénignes ou graves. Dans le langage courant, les entorses sont aussi qualifiées de foulures pour les mains et les chevilles, toutefois ce terme ne sera pas utilisé présentement car dans quelques cas comme il vient d'être précisé ci-dessus, il peut s'agir d'une fracture (exemple de la cheville).

I.1.2.3. Le cas particulier du genou

Le genou est une articulation complexe qui supporte le poids du corps. Cette articulation est formée de 4 os : le fémur, le tibia, le péroné et la rotule (Figure I.6.). Entre les plateaux tibiaux et les condyles fémoraux recouverts de cartilage, deux ménisques s'interposent. Le genou doit pouvoir être à la fois mobile et stable. La stabilité et la cohésion (contact du fémur et du tibia) de l'articulation sont assurées par ses ligaments et un tendon : deux ligaments croisés antérieur et postérieur formant le pivot central, deux ligaments latéraux interne et externe et un tendon rotulien qui maintient en place la rotule.

Les ligaments permettent de limiter les amplitudes de mouvements importantes et donc les luxations du genou. Le pivot central empêche les luxations antérieure et postérieure de l'articulation mais également une amplitude de torsion axiale excessive du genou. Il est estimé que le ligament croisé antérieur subit une traction de 150N dans la vie quotidienne et de 400 à 750N lors d'une activité sportive avec une force maximale à la rupture de l'ordre de 2200N [NEYRET, 2002; TALEI FRANZESI, 2006]. Quant aux ligaments latéraux, ils empêchent les luxations internes et externes. Les ligaments du pivot central sont donc extrêmement importants pour la stabilité de l'articulation et leur rupture en est préjudiciable.

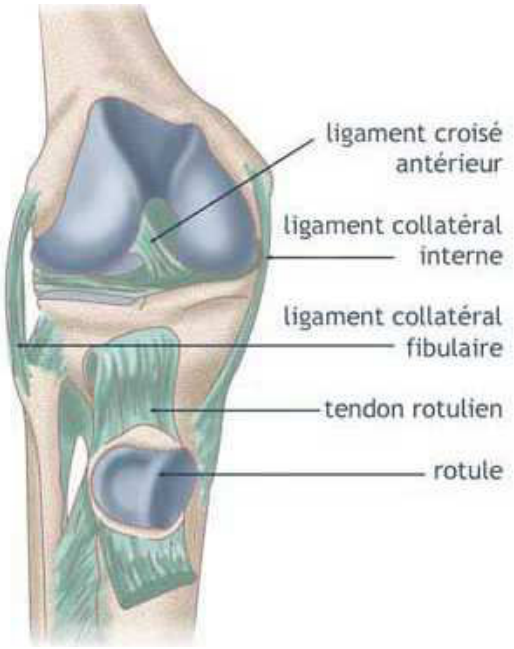


Figure I.6. Planche anatomique du genou
(extrait de http://entrainement-sportif/conseils_anatomie_genou.htm, 2008)

La rupture des ligaments du genou peut provenir de 4 mouvements : une hypertorsion du tibia, une hyperextension des ligaments croisés, un choc latéral ou une hyperflexion du genou. L'hypertorsion du tibia arrive généralement lors d'un changement de direction rapide

avec une légère flexion du genou. Le pied est fixé au sol alors que le poids du corps est dirigé dans une autre direction, il peut en résulter une rupture du LCA. L'hyperextension des ligaments croisés, qui peut conduire à leur rupture, se produit lorsque le tibia est propulsé en avant par rapport au fémur, par exemple lors d'un « shoot » dans le vide (Figure I.7.). Le choc latéral provenant plus souvent de l'extérieur vers l'intérieur du genou peut provoquer la rupture du LCA, du ménisque interne et du LLI, *la triade malheureuse*. Enfin, l'hyperflexion du genou se produit souvent lors d'une retombée sur la jambe en flexion complète, la rupture du LCA peut alors survenir.

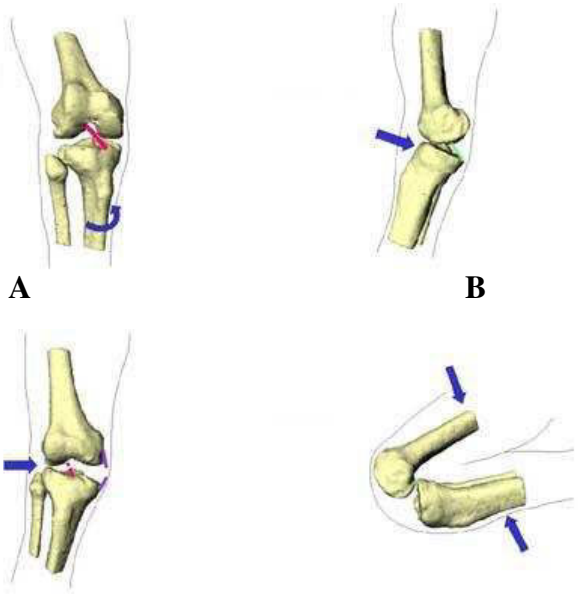


Figure I.7. Cas de rupture du ligament croisé antérieur
Le ligament croisé antérieur peut se rompre dans différents cas de figure :
en torsion axiale (A), en hyperextension (B), en choc latéral (C), en hyperflexion (D)
(extrait de http://cmontmorency.qc.ca/tic/expo/genou.hrml)

I.1.3. STRATEGIES THERAPEUTIQUES ACTUELLES DES LESIONS DES LIGAMENTS ET TENDONS

Lors d'une lésion tendineuse ou ligamentaire, le médecin aura différentes attitudes en fonction de la gravité de la lésion, de l'âge du patient et de l'activité physique et sportive de ce dernier. Dans la majorité des cas, excepté dans certains cas d'urgence, le médecin ne prendra pas de décision « à chaud » et prescrira un arrêt de toute activité sportive. Selon la gravité et la localisation de la lésion, le port d'une orthèse voire une immobilisation complète accompagnée d'anti-inflammatoires afin d'éviter une inflammation excessive peuvent être nécessaires. Après réduction de l'œdème, un diagnostique peut être établi en tenant compte des paramètres précités.

I.1.3.1. Les traitements non-chirurgicaux

Un traitement non-chirurgical est préféré dans la plupart des cas de tendinites et d'entorses dites bénignes c'est-à-dire sans rupture complète.

Dans l'ensemble, les tendinites sont soignées par une période de repos et une décharge relative des efforts sur le tendon par l'utilisation de cannes anglaises (membre inférieur), d'une orthèse ou de strapping. Un traitement par physiothérapie avec l'utilisation d'ultrasons et/ou de courant antalgique peut être utilisé pour limiter la douleur et améliorer la guérison. Un traitement par massage est également préconisé, deux techniques sont utilisées : l'étirement progressif jusqu'au seuil de douleur et le massage transverse profond ainsi que la technique d'onde de choc. Enfin, un retour progressif, et bien dosé à l'activité physique et sportive est généralement préconisé.

Pour une entorse où le ligament reste intact, l'immobilisation complète ne sera pas prescrite mais un traitement fonctionnel consistant, pour le genou, en une musculation afin de stabiliser l'articulation. Dans le cas d'une rupture partielle, l'utilisation de la chirurgie sera discutée en fonction de l'âge et de l'activité physique du patient.

I.1.3.2. Les traitements chirurgicaux

Une intervention chirurgicale est souvent envisagée dans les cas de lésions graves (rupture du ligament ou du tendon) ou lorsque la stabilité de l'articulation, ou encore sa mobilité sont dégradées par une rupture partielle pénalisant le patient.

Dans le cas d'une rupture totale ou partielle de tendon, l'intervention chirurgicale consiste à suturer les faisceaux lésés ou bien à déplacer l'encrage d'un tendon sain pour qu'il supporte les efforts des deux tendons (technique utilisée plutôt pour la main). L'intervention chirurgicale peut également consister en l'élimination de parties fibreuses qui peuvent nuire aux propriétés mécaniques du tendon ainsi qu'à des scarifications du tendon pour améliorer la reconstruction de ce dernier. Ceci est rendu possible par le caractère cicatriciel du tendon, capacité due à la vascularisation de ce type de tissu.

Les ligaments moins vascularisés ont une capacité cicatricielle faible voire inexistante. Dans ce cas, la chirurgie consiste à remplacer ou à renforcer le ligament par une prothèse synthétique pour certains ligaments ou par une greffe autologue ou allologue (la greffe xénologue n'étant pas utilisée pour les ligaments et tendons).

L'utilisation de prothèses synthétiques ligamentaires, souvent en polyéthylène téréphtalate (PET), en polytétrafluoroéthylène (PTFE ou Gore-Tex®) ou en polyester (Dacron®), représente une bonne solution à court terme avec une récupération rapide de la

mobilité [GLOUSMAN *et al.*, 1998]. Malheureusement le taux de réussite est faible à long terme (44% pour le LCA) [PAULOS *et al.*, 1992]. La cause principale de ce taux élevé d'échec à long terme résulte d'une inflammation due à une abrasion de ces prothèses qui ne sont pas prévues pour être dégradées. Par exemple, dans le cas du LCA, il a été prouvé que des particules s'accumulent dans la cavité synoviale sans pouvoir être éliminées conduisant irrémédiablement à une inflammation et à une dégénérescence du cartilage articulaire [OLSON *et al.*, 1988]. En France, depuis 1995, au vu du taux élevé d'échecs des prothèses synthétiques non-résorbables et des conséquences sur les cartilages osseux du genou, conduisant à des ruptures à moyen ou long terme et à des arthroses du genou, le corps médical a recommandé dans le cadre des Références Médicales Opposables de ne plus utiliser de prothèse synthétique en remplacement ou en renfort [MOLÉ *et al.*, 1996]. Toutefois, la recherche, pour améliorer l'adhésion et la pénétration cellulaire de ces prothèses, se poursuit pour améliorer ces prothèses et peut-être un jour les réutiliser. Par contre des prothèses résorbables, ou non, servant de renfort aux ligaments latéraux du genou sont utilisées en chirurgie (exemple : produit résorbable ou non de Cousin Biotech, Wervicq France).

L'alternative à ces prothèses est la « prothèse biologique » c'est-à-dire la greffe qu'elle soit autologue, allologue. Les deux derniers types de greffes sont très peu utilisées : la greffe xénologue pose des problèmes de transfert potentiel de maladie inter-espèces ainsi que des problèmes d'immunocompatibilité inter-espèces c'est pourquoi elle n'est pas du tout pratiquée. La greffe allologue présente également des problèmes de transfert de maladies et d'immunocompatibilité dans une moindre mesure. De plus le faible nombre de donneurs et les techniques de décellularisation et de stérilisation rendent la procédure complexe. Enfin, la greffe autologue est la technique de reconstruction la plus utilisée en ligamentoplastie du LCA en utilisant préférentiellement deux sites tendineux : soit le tendon rotulien soit des tendons de la patte d'oie (tendon des ischio-jambiers). Ces deux techniques sont connues respectivement, sous les noms de techniques de Kenneth-Jones (le premier à avoir utilisé le $\frac{1}{3}$ moyen du tendon rotulien) et Demi-Interne et Demi-Tendineux (DIDT) [DJIAN *et al.*, 1999; FRANCESCHI et POTEL, 2003; NEYRET, 2002]. Ces deux techniques donnent des résultats, relativement comparables et assez satisfaisants, à long terme, pour la reconstruction fonctionnelle du LCA (75 à 85%). Malheureusement, dans certains cas, ces deux techniques sont associées à des nécroses et des douleurs aux sites de prélèvement des greffons [SAVALLI *et al.*, 2004]. Toutefois, le greffon subit une ligamentisation qui suit les lois générales de l'adaptation tissulaire décrite par Roux en 1905 stipulant qu'un tissu adapte sa

structure suite à un changement de sa fonction [DJIAN *et al.*, 1999]. Cette ligamentisation bien que fonctionnelle reste partielle. Le greffon ne devient pas un véritable ligament natif pour deux raisons : la reconstruction nerveuse ne se réalise pas, ainsi le patient ne retrouve pas la proprioception nécessaire, et les propriétés mécaniques de résistance et de rigidité restent faibles par rapport à celles du tissu natif (récupération de 50%) [DJIAN *et al.*, 1999]. En effet, si aux niveaux histologique et biochimique la ligamentisation se réalise, il n'en est pas de même de l'ultrastructure du tissu, le LCA natif a une distribution bimodale de diamètres de fibres, entre 25 et 175nm, alors que les greffons après ligamentisation présentent majoritairement des fibres de diamètres inférieurs à 100nm ce qui pourrait expliquer les différences de résistance mécanique [DJIAN *et al.*, 1999]. Enfin, les progrès consécutifs au développement des méthodes endoscopiques permettent de diminuer la taille de la cicatrice et donnent ainsi un confort esthétique apprécié par le patient.

En conclusion, bien que les thérapies actuelles donnent de bons résultats, elles restent imparfaites, 50% des propriétés mécaniques retrouvées et pas de proprioception. De plus, la nécessité de procéder à des ligamentoplasties itératives dans de nombreux cas, les risques de nécroses et de douleurs au niveau des sites de prélèvement, incitent les scientifiques à améliorer les techniques de greffes mais aussi à chercher de nouvelles thérapies. C'est pourquoi depuis environ 25 à 30 ans [VIOLA *et al.*, 2003], une nouvelle discipline a émergé : l'Ingénierie Tissulaire. En effet, pour pallier les problèmes de prélèvement des greffons et de l'obtention d'allogreffe, les scientifiques cherchent à cultiver ou à régénérer des parties d'organes ou des organes complets, qu'il s'agisse de peau, d'artères, d'os, de foie, de cartilage, de cœurs…, et également de ligaments et de tendons.

I.2. L'INGENIERIE TISSULAIRE DES LIGAMENTS ET DES TENDONS

Dans cette section, nous allons présenter les principes généraux de l'ingénierie tissulaire, en passant en revue les différentes voies thérapeutiques explorées actuellement. Nous nous limiterons ensuite aux techniques utilisées en ingénierie tissulaire des ligaments et des tendons.

I.2.1. LES DIFFERENTES VOIES THERAPEUTIQUES EXPLOREES

Il existe essentiellement deux grandes voies de thérapies explorées à l'heure actuelle : la thérapie cellulaire et la « thérapie transgénique ». La thérapie cellulaire consiste à utiliser des cellules corporelles pour cultiver un nouveau tissu fonctionnel voire identique au tissu

natif que ce soit *in vitro* ou *in vivo.* Par contre, la « thérapie transgénique » est une thérapie cellulaire qui utilise des cellules génétiquement modifiées.

La thérapie cellulaire s'appuie sur l'emploi de cellules mises en culture sous différentes contraintes physico-biochimiques *in vitro* ou *in vivo,* afin de régénérer ou même synthétiser un tissu ou un organe [CANCEDDA *et al.*, 2003; LANGER, 1995; SHIEH et VACANTI, 2005; WANG *et al.,* 2008]. Son principe en est assez simple : un apport de cellules est nécessaire soit par prélèvement sur le patient soit par culture de cellules obtenues par don. Ensuite une phase d'expansion des cellules prélevées est réalisée afin d'obtenir suffisamment de cellules permettant la culture du tissu ou de l'organe. Ces cellules sont alors ensemencées sur une matrice de support biorésorbable qui permettra l'organisation des cellules et la croissance du néo-tissu. En effet, les fibroblastes sont des cellules adhérentes, il est donc nécessaire de leur fournir un substrat sur lequel elles puissent croître et s'organiser. A ce stade, deux possibilités peuvent être envisagées, soit greffer la matrice de support sur le patient (*in vivo*), soit cultiver dans un bioréacteur le néo-tissu (*in vitro*) pour implanter, sur le patient, le greffon ainsi obtenu. Une solution intermédiaire est également envisageable, il s'agit de cultiver *in vitro* le néo-tissu jusqu'à obtenir des propriétés mécaniques et physiologiques fonctionnelles puis de l'implanter sur le patient où le tissu finira de se fonctionnaliser (Figure I.8.). Dans les deux cas, la croissance tissulaire peut être contrôlée par stimulation physico-biochimique *via* l'apport de nutriments et de facteurs dits de croissances mais aussi des stimulations mécaniques qui permettent la différenciation cellulaire et/ou stimulent la sécrétion des protéines constitutives du néo-tissu.

La thérapie utilisant des cellules génétiquement modifiées (cellules transgéniques) est fondée sur le même principe que celui énoncé ci-dessus à la différence prêt que la source cellulaire a été génétiquement modifiée afin d'améliorer les caractéristiques des cellules leur permettant ainsi de sécréter des facteurs de croissance nécessaires à la régénération ou à la croissance du tissu, ou encore afin d'augmenter leur capacité de sécrétion de certaines protéines [KIM *et al.*, 2007; WOO *et al.*, 2006] comme les collagènes pour des tissus ligamentaires ou tendineux, par exemple. A l'heure où l'alimentation génétiquement modifiée est loin d'être acceptée par l'opinion publique, ces techniques posent des problèmes éthiques et pratiques pour un éventuel passage au niveau clinique. L'injection de tels organismes dans un corps humain reste une solution extrême qui peut éventuellement être envisagée pour des maladies incurables mais ne saurait être, à l'heure actuelle, envisageable pour un traitement

tel que la régénération de ligaments et tendons. Nous ne traiterons pas plus en détaille cette piste de recherche dans la suite du mémoire.

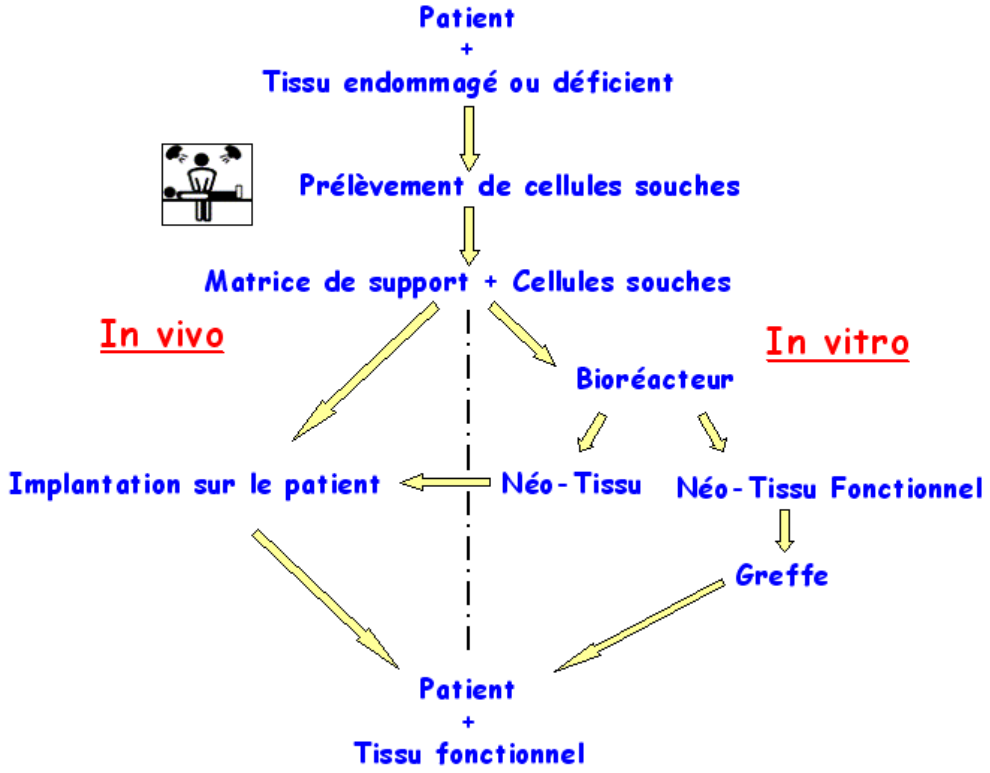


Figure I.8. Principes de la reconstruction de tissu en ingénierie tissulaire
[CANCEDDA *et al.*, 2003; LANGER, 1995; MARTIN *et al.*, 2004; SHIEH et VACANTI, 2005]

En conclusion, la régénération ou la synthèse d'un tissu en ingénierie tissulaire dépend de trois facteurs : **la source cellulaire**, **la matrice de support** et **l'environnement** que la reconstruction ait lieu dans le patient ou en bioréacteur. La suite de cette section traite de ces trois facteurs en séparant toutefois les bioréacteurs des facteurs biochimiques.

I.2.2. LES SOURCES CELLULAIRES

La source idéale de cellules doit permettre de fournir des cellules qui sont déjà différenciées, ou peuvent se différencier, en fibroblastes ligamentaires ou tendineux (pour les ligaments et les tendons). En effet, des cellules qui ont les mêmes caractéristiques que les cellules originelles sont les mieux adaptées pour obtenir une bonne régénération ou la sécrétion d'un tissu donné. Ainsi, ces dernières décennies, la recherche en ingénierie tissulaire s'est tournée vers certaines cellules en fonction de leurs caractéristiques à maturité ou de leur plasticité (pluripotente). Trois grandes familles ont ainsi été sélectionnées pour la recherche en ingénierie tissulaire de ligaments et tendons : les fibroblastes, les cellules souches

embryonnaires et adultes [VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004; WOO *et al.*, 2006; ZHANG, 2008].

I.2.2.1. Les fibroblastes

L'utilisation de fibroblastes comme source cellulaire pour reconstruire un ligament ou un tendon fut la première solution envisagée. Il est à noter que s'il est nécessaire de remplacer un tendon ou un ligament, il est difficilement envisageable de pouvoir prélever les fibroblastes du tendon ou du ligament à remplacer. En effet, outre une souffrance supplémentaire pour le patient, les fibroblastes sont des cellules adultes différenciées qui ont perdu une partie de leur capacité à proliférer. De plus, ces cellules sont peu abondantes au sein de ces tissus [GE *et al.*, 2005; VAN EIJK *et al.*, 2004]. L'utilisation des cellules allologues provenant du même type de tissu est possible mais cette technique présente les mêmes difficultés que pour les greffes, à savoir des risques de rejets immunitaires et de transfert de maladies. Enfin, il est également possible d'utiliser des fibroblastes autologues provenant d'un autre tissu tel que la peau, tissu cultivable *in vitro.* Bien que ces cellules soient très proches, elles n'ont pas les mêmes caractéristiques et ne semblent pas pouvoir changer de phénotype. Les fibroblastes de peau sécrètent moins de collagène III et sont donc moins performantes pour synthétiser un ligament ou un tendon [CHEN *et al.*, 2004; VAN EIJK *et al.*, 2004].

I.2.2.2. Les cellules souches

Dès lors, les chercheurs se sont tournés vers les cellules qui ont une plasticité reconnue c'est-à-dire des cellules pluripotentes : les cellules souches. Deux familles de cellules souches sont aujourd'hui connues : les cellules souches embryonnaires et les cellules souches adultes.

I.2.2.2.1. LES CELLULES SOUCHES EMBRYONNAIRES

Les cellules souches embryonnaires sont des cellules pluripotentes présentes chez l'embryon dès la fécondation et jusqu'à l'apparition de blastocytes. Elles ont un pouvoir de prolifération important et un pouvoir de différenciation [DENKER, 1999; KOH et ATALA, 2004]. Chez l'être humain, ces cellules sont difficiles à obtenir pour des raisons éthiques qui réglementent la recherche sur les embryons. De plus, des études ont établi que ces cellules donnaient un risque élevé d'apparition de tumeurs et, étant allologues, pouvaient induire un rejet immunitaire (plus faible que des cellules adultes) [DRUKKER *et al.*, 2006; FENNO *et*

al., 2008; YAMAMOTO *et al.*, 2006]. En conséquence, ceci limite fortement la recherche en ingénierie tissulaire utilisant cette source cellulaire.

I.2.2.2.2. LES CELLULES SOUCHES ADULTES

Les cellules souches adultes sont comme les cellules embryonnaires des cellules dotées d'une plasticité, elles sont dites multipotentes (Figure I.9.). Ces dernières décennies, ces cellules ont été détectées dans la moelle osseuse (cellules souches mésenchymateuses médullaires, CSMM) mais également dans différents tissus comme la graisse et dernièrement dans les tendons, ces cellules sont alors également qualifiées de cellules progénitrices [BI *et al.*, 2007; JOAHNSSON *et al.*, 1999; TOBITA *et al.*, 2008; VALLÉE *et al.*, 2008]. Ces cellules permettent le renouvellement cellulaire au niveau des tissus qu'elles composent puisqu'elles peuvent soit proliférer, soit se différencier en des cellules spécifiques au tissu afin de remplacer les cellules mortes ou d'augmenter la densité cellulaire en cas d'inflammation.

Les CSMM sont assez faciles à obtenir par ponction de la crête iliaque au niveau du bassin. Ceci permet d'obtenir des cellules autologues qui éviteront les risques de rejet immunitaire [CAPLAN et BRUDER, 2001]. De plus, les caractères des CSMM sont très proches de ceux des fibroblastes. Actuellement, aucune protéine permettant de différencier les CSMM des fibroblastes n'a été identifiée. Bien que ces cellules synthétisent les mêmes protéines que les fibroblastes, leurs proportions respectives en collagènes et ténascine-C, par exemple sont différentes. Il est donc nécessaire de trouver la ou les stimulations qui permettront d'induire un changement de phénotype permettant une synthèse des protéines nécessaires dans des proportions analogues à celles des fibroblastes ligamentaires et tendineux. Nous parlerons alors d'orientation des caractères cellulaires vers un phénotype fibroblastique et non de différenciation stricte.

L'inconvénient majeur de cette technique réside dans le nombre de cellules que l'on peut prélever. En effet, la moelle osseuse contient moins de 0,01% de cellules souches mésenchymateuses [PITTENGER *et al.*, 1999]. Il est donc nécessaire de les cultiver afin d'obtenir suffisamment de cellules. Malgré cet inconvénient, les CSMM restent, à l'heure actuelle, la meilleure source cellulaire envisagée en ingénierie tissulaire pour une application clinique.

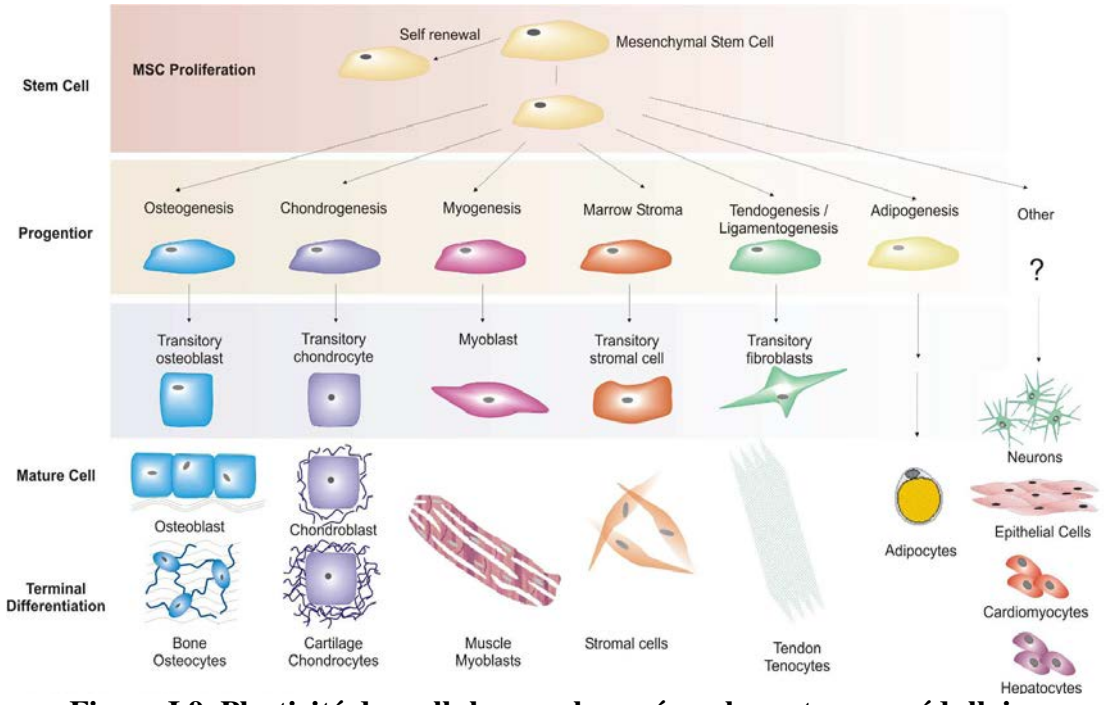


Figure I.9. Plasticité des cellules souches mésenchymateuses médullaires
Extrait de [CAPLAN et BRUDER, 2001]

I.2.3. LES MATRICES DE SUPPORT

Après la source cellulaire, le deuxième critère de réussite réside dans le choix d'une matrice de support adéquate pour le tissu à développer. La solution idéale serait une matrice naturelle ou synthétique biocompatible et biorésorbable présentant les mêmes propriétés mécaniques que le tissu en culture ainsi qu'une structure comparable (biomimétisme). De plus la matrice de support doit se dégrader à la même vitesse que le néo-tissu se forme afin de laisser petit à petit place au néo-tissu [HUTMACHER, 2000; MA, 2008]. Ceci reste théorique car la maîtrise de la dégradation selon ce principe reste extrêmement délicate. De plus, la confection d'une matrice de support présentant les mêmes propriétés mécaniques et une structure comparable au tissu ciblé reste une question ouverte qui, à notre connaissance, n'a toujours pas de solution en ingénierie tissulaire de ligaments et tendons.

De ce fait, de nombreux laboratoires étudient différents matériaux et différentes structures dans le but de confectionner une matrice de support optimale.

I.2.3.1. Les matériaux naturels

Les matériaux naturels sont très utilisés en ingénierie tissulaire, ils comprennent essentiellement des matériaux biologiques en xénogreffe ou allogreffe afin d'obtenir des matrices de support comprenant une structure collagénique déjà élaborée. D'autres matériaux

sont également utilisés : les collagènes sous formes de gels ou de fibres, les polysaccharides et la soie.

Les matrices biologiques en xénogreffes et allogreffes sont le plus souvent des matrices à base de sous muqueuse intestinale (Small Intestin Submucosa, SIS) [LIANG *et al.*, 2006; WOO *et al.*, 2006; ZANTOP *et al.*, 2006]. Ces matrices de support ont un avantage indéniable : elles possèdent une structure collagénique de fibres de collagènes déjà matures. Par contre, elles présentent les mêmes inconvénients qu'une greffe de tendon ou de ligament, à savoir un risque de rejet immunitaire et de transfert de maladie. Les études faites sur les LLI de brebis semblent encourageantes dans le sens où une réelle amélioration est observée comparativement au tendon lésé non-traité, pourtant leurs modules tangents respectifs restent faibles (387±99MPa et 291±123MPa) vis-à-vis des caractéristiques du ligament contra-latéral de référence (1142±412MPa, [LIANG *et al.*, 2006]).

Afin d'obtenir une structure de fibres de collagène mature proche de l'ultrastructure d'un tissu tendineux ou ligamentaire sain, des gels et fibres de collagène purifié de type I sont employés pour fabriquer des matrices de support. Si, au début des recherches, ces matrices avaient une très faible résistance mécanique du fait de l'orientation aléatoire des fibres les composant, il a été montré, depuis, que l'application d'un champ électrique permettait d'orienter les fibres de collagènes du gel dans une direction privilègiée [CHEN *et al.*, 2008]. Cette technique améliore grandement les propriétés de la matrice de support permettant de passer d'un module d'élasticité tangent de 15±10MPa pour les fibres aléatoirement orientées à 400±110MPa pour les fibres alignées. Toutefois, ce matériau reste faible, comparé à un tendon sain : 740±165MPa pour l'étude qui utilisait le tendon du biceps du chien comme comparaison [CHEN *et al.*, 2008]. Les collagènes composant en grande partie les tendons et ligaments confèrent une bonne biocompatibilité aux matrices de support qui en sont composées. L'inconvénient majeur vient du fait que les gels de collagènes se contractent lorsqu'ils sont ensemencés de cellules. Ceci rend difficile la reproductibilité des résultats surtout pour les essais mécaniques.

Les polysaccharides sont très utilisés en ingénierie du cartilage et de l'os. Ces dernières années, ils font l'objet d'un regain d'intérêt en ingénierie des ligaments et tendons [LIU *et al.*, 2008b]. Ce sont, par exemple, la chitine, le chitosan, l'alginate et l'agarose [MJAHED *et al.,* 2008]. L'avantage de ces matériaux est leur caractère hydrophile. Ce dernier leur confère une bonne biocompatibilité en adhésion et en prolifération. Par contre, les risques

de contamination bactériologique de produits extraits de végétaux ne sont pas à exclure [VAQUETTE, 2008].

Enfin, n'oublions pas la soie qui est un produit naturel obtenu à partir du coccon de la chenille du Bombyx qui est très répandu et très étudié ces dernières années en ingénierie tissulaire car peu coûteux et facile à remodeler [VEPARI et KAPLAN, 2007]. Ce matériau est utilisé en médecine comme fil de suture non résorbable, il est donc très bien accepté par l'organisme. La résistance de la soie rend très attractif ce matériau bien que la dégradation d'une matrice de support prenne de l'ordre de 2 ans *in vivo* [VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004]. Signalons que la soie peut également être solubilisée et permet ainsi une vaste utilisation dans de multiples procédés de mise en forme [FAN *et al.*, 2008; HAGENMÜLLER *et al.*, 2008; VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004]. De plus, la fibrine dont la soie est formée est très facilement « hybridable » avec d'autres matériaux ou protéines permettant d'augmenter l'adhésion cellulaire et/ou de greffer des facteurs de croissance.

I.2.3.2. Les matériaux synthétiques

Les matériaux synthétiques sont également très courants en ingénierie tissulaire. Ce sont essentiellement des polymères tels que les polyesters aliphatiques mais d'autres polymères sont également utilisés comme le poly(uréthane urée) ou le polyuréthane (PU) [GISSELFÄLT *et al.*, 2002; LEE *et al.*, 2005]. Ces matériaux synthétiques, qu'ils soient résorbables ou non, possèdent l'avantage de limiter les risques de contamination contrairement aux produits extraits du vivant présentés ci-dessus (cf. §I.2.3.1.).

En ingénierie tissulaire de ligaments et de tendons, les polyesters aliphatiques les plus utilisés sont : les acides polyglycoliques (PGA), les acides polylactiques (PLA), les polycaprolactones (PCL) ainsi que leurs copolymères les acides poly(lactique-co-glycolique) (PLGA) et les acides poly(lactique-co-caprolactone) (PLCL) (Figure I.10.).

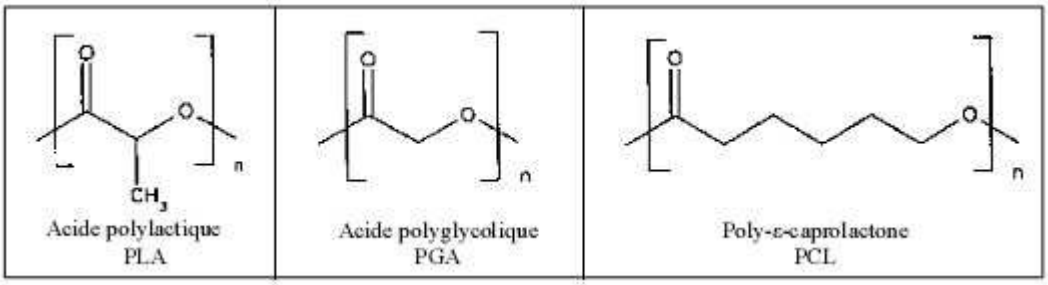


Figure I.10. Formules chimiques de polyesters utilisés en ingénierie tissulaire

Ces polymères ont l'avantage d'être résorbables en milieu aqueux, conduisant à des produits de réaction qui sont naturellement présents dans les organismes vivants : l'acide glycolique et l'acide lactique. Cette caractéristique leur confère une bonne biocompatibilité et n'engendre pas les désagréments des polymères non-résorbables des prothèses comme le Dacron® ou le Gore-Tex®. De plus, leur solubilité leur permet une large utilisation dans différents procédés de mise en forme. Par ailleurs, la possibilité de créer des copolymères permet de faire varier la vitesse de dégradation du matériau fabriqué, de quelques semaines pour le PGA à quelques années pour le PCL [VAQUETTE, 2008]. Par contre, ces polymères présentent une importante hydrophobie ce qui limite sensiblement leur capacité d'adhésion cellulaire. Il est alors nécessaire de traiter ces polymères par « coating » ou en greffant des groupements chimiques améliorant l'adhésion cellulaire. Enfin, leur dégradation, bien qu'assimilable par les organismes, engendre une baisse locale et sensible du pH. En effet, une expérience menée au sein de notre groupe a montré que les matrices de support en Vicryl® (PLGA) peuvent créer une chute importante de pH : au bout de 42 jours de culture le pH du milieu de culture était de 5 bien qu'il soit renouvelé tous les 3 jours [VAQUETTE, 2008]. Un tel pH est trop acide pour effectuer une culture cellulaire dans de bonnes conditions.

I.2.3.3. Les structures employées

Les structures employées en ingénierie tissulaire de ligaments et de tendons sont diverses et évoluent assez régulièrement. Nous ne prétendons pas faire une présentation exhaustive de toutes les structures employées, mais souhaitons simplement évoquer les plus utilisées.

Pour les ligaments et les tendons, les matrices de support sont majoritairement constituées de fibres. Ces fibres peuvent être tissées, tressées, torsadées ou déposées selon la technique employée [FREEMAN *et al.*, 2007; GE *et al.*, 2006; GENTLEMAN *et al.*, 2006; HORAN *et al.*, 2006; LAURENCIN et FREEMAN, 2005; SAHOO *et al.*, 2006; VAQUETTE, 2008]. Le but final étant d'obtenir une matrice biomimétique tant sur le plan structural qu'au niveau des propriétés mécaniques. Les matrices en fibres tissées présentent une grande porosité mais souffrent souvent de l'inconvénient d'avoir des tailles de maille de l'ordre du millimètre, ce qui est beaucoup trop grand pour une cellule dont la longueur ne fait qu'environ 50µm de long. Les matrices de support tressées ont un assez bon mimétisme des propriétés mécaniques en traction simple longitudinale. Par contre, elles présentent deux inconvénients majeurs : le resserrement de la matrice et le glissement interfibre lors de la mise sous traction qui peuvent générer une morbidité des cellules. Les matrices torsadées

permettent elles aussi un bon mimétisme des propriétés mécaniques en traction longitudinale mais sont très denses ce qui limite la colonisation des cellules au cœur de la matrice.

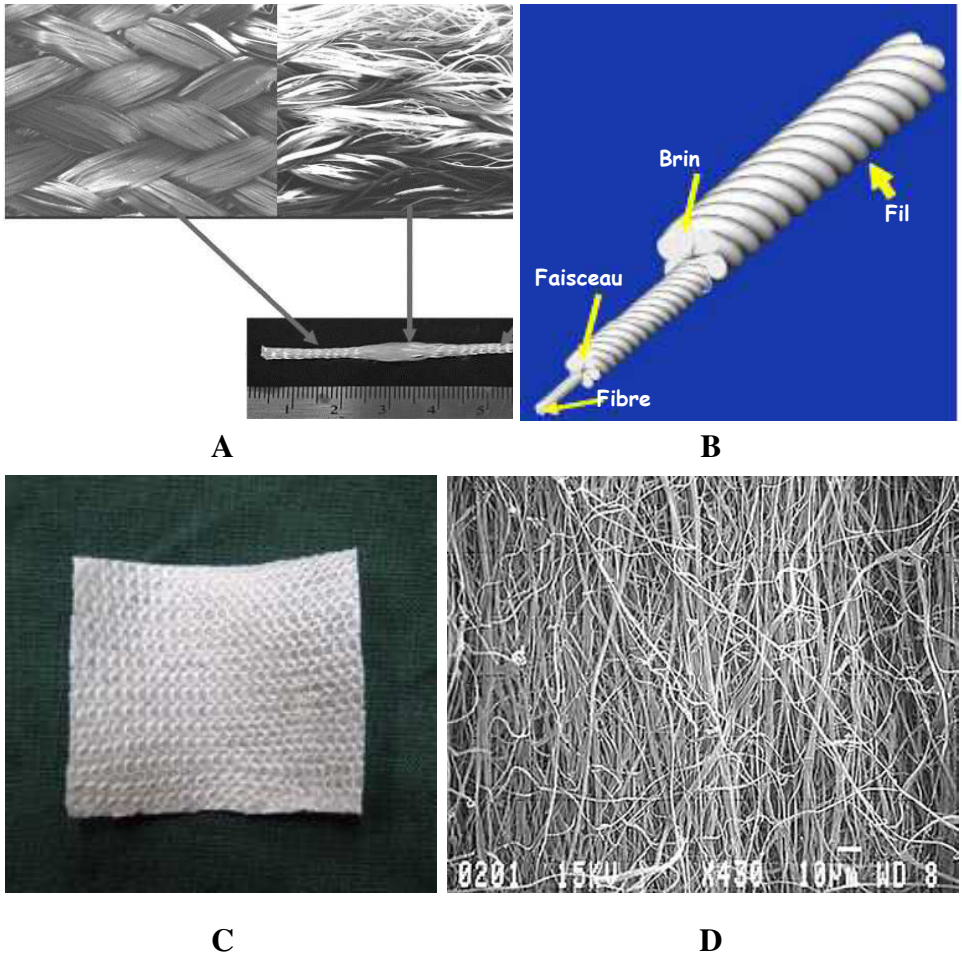


Figure I.11. Exemple de structures utilisées en ingénierie tissulaire

A : matrice de support en fibres de PLLA tressées ; B : matrice de support en soie torsadée ; C : matrice de support composite en soie tissée et microfibrillaire ; D : fibres de collagène de type I alignées par électrofilage extrait de [BOLAND *et al.*, 2004; FAN *et al.*, 2008; HORAN *et al.*, 2006; LAURENCIN et FREEMAN, 2005]

La tendance actuelle est de rechercher des structures à porosité importante (>80%) permettant de maintenir un bon apport nutritif aux cellules même au cœur de la matrice [PÖRTNER *et al.*, 2005], mais avec des micropores interconnectés sous formes de fibres de quelques centaines de nanomètres à quelques micromètres de diamètre, correspondant à la taille des fibres de collagènes des tendons et ligaments. Ainsi, plusieurs équipes dans le monde, dont la nôtre, développent actuellement des matrices de supports composites en deux parties : une armature composée de fils de sutures d'environ 200µm de diamètre et une structure micro-fibrillaire se superposant à la première structure (Figure I.11.). La structure « méso-fibrillaire » confère les propriétés mécaniques nécessaires à la structure tandis que la structure micro-fibrillaire sur laquelle la majorité des cellules sont cultivées permet un

mimétisme structural au niveau de la cellule [GE *et al.*, 2006; SAHOO *et al.*, 2006; VAQUETTE, 2008]. Il existe pour ce faire différentes techniques dont nous ne discuterons pas dans ce mémoire, nous invitons le lecteur intéressé à consulter les références pour de plus amples précisions sur les méthodes de fabrication, comme « l'electrospining » (électrofilage) ou l'auto-organisation. Ces structures ont l'avantage d'être tridimensionnelles et sont de plus en plus comparables aux structures ligamentaires et tendineuses réelles. La microstructure permet d'augmenter considérablement la surface de la matrice de support et par conséquent d'augmenter ainsi la capacité d'adhésion cellulaire pour un matériau donné. En revanche, la complexité des structures rend de plus en plus difficile la maîtrise de l'effet de la stimulation mécanique macroscopique, qui se traduit pour l'essentiel par une traction longitudinale cyclique, pour les tendons et les ligaments, sur la structure microscopique au niveau de la cellule.

I.2.4. LES BIOREACTEURS

La définition du mot bioréacteur varie selon les auteurs. Pour certains auteurs, ce terme recouvre l'ensemble des moyens de culture d'organismes bactériens ou cellulaires qu'ils soient *in vitro* ou *in vivo* tandis que pour d'autres, ce terme ne concerne que les systèmes permettant la culture *in vitro* sous conditions environnementales contrôlées. Nous accepterons la dernière définition pour les moyens artificiels et nous ferons ainsi un bref tour des différents moyens de cultiver les cellules adhérentes et les tissus en ingénierie tissulaire tout en mettant l'accent sur les bioréacteurs utilisés en ingénierie tissulaire des ligaments et des tendons.

Les bioréacteurs peuvent être regroupés en trois grandes familles : les bioréacteurs statiques, ceux à perfusions et ceux à stimulations mécaniques.

I.2.4.1. Les bioréacteurs statiques

Les bioréacteurs statiques sont les systèmes de culture les plus simples. Ils ont souvent la forme de boîtes ou de puits. Ces bioréacteurs permettent l'adhésion cellulaire sans contrainte mécanique et nécessitent un apport de milieu de culture sans mouvement lequel est à renouveler régulièrement (généralement tous les 3 jours). La température de l'environnement et les pressions partielles de gaz nécessaires à la culture (O_2 et CO_2) sont régulées par un incubateur dans lequel ces systèmes sont mis en culture. Ces bioréacteurs sont utilisés en ingénierie tissulaire pour la prolifération cellulaire et pour tester des facteurs biochimiques.



Figure I.12. Exemples de bioréacteurs utilisés en culture cellulaire
A droite des boîtes de culture en couche cellulaire et à gauche un spinner

I.2.4.2. Les bioréacteurs à agitation et à perfusion

Les bioréacteurs statiques posent des problèmes en ingénierie tissulaire de ligaments car ils ne permettent que de réaliser des cultures de cellules en couches minces et non sur des supports tridimensionnels structurés. En effet, dès qu'il existe une structure tridimensionnelle de quelques millimètres d'épaisseur, ces systèmes ne sont plus performants en termes d'apport nutritif. Le milieu de culture est formé en grande partie d'eau, ce qui permet à la plupart des nutriments d'être transportés par le milieu de culture comme le glucose, les acides aminés, etc. En particulier, le dioxygène s'y dissout très mal, et sans écoulement du milieu de culture, l'apport en dioxygène par diffusion n'est pas suffisant [MARTIN et VERMETTE, 2005]. Pour y remédier, il est donc nécessaire de créer un mouvement du milieu de culture en l'agitant comme dans le cas des spinners, ou des bioréacteurs rotatifs ou en ajoutant une perfusion qui permet un écoulement remplaçant le principe d'apport de dioxygène par le sang comme pour les lits fluidisés [MARTIN *et al.*, 2004; MINUTH *et al.*, 1998; PÖRTNER *et al.*, 2005; QUESNEY *et al.,* 2003]. Il est à noter que pour des mouvements rapides du milieu de culture, une sollicitation mécanique par cisaillement apparaît (exemple des chambres de flux). D'autre part, ces systèmes permettent de ne renouveler qu'une partie du milieu de culture à chaque fois et donc d'avoir une culture plus régulière. Le milieu de culture contient des déchets à éliminer, la dégradation de la matrice de support mais également des facteurs de croissance potentiellement sécrétés par les cellules. Renouveler tout le milieu de culture d'un seul coup, permet d'éliminer la plupart des déchets mais aussi des protéines sécrétées par les cellules et ainsi ralentit potentiellement la construction *in vitro*. Enfin, ces systèmes peuvent également servir à la co-culture de cellules sans contact [LICHTENBERG *et al.*, 2005].

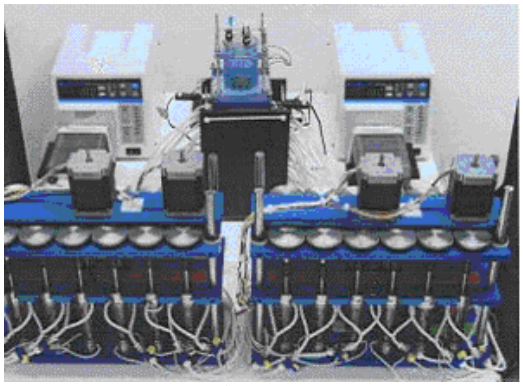
I.2.4.3. Les bioréacteurs à stimulations mécaniques

Ces dernières décennies, il a été démontré que les stimulations mécaniques pouvaient orienter les cellules et/ou induire une différenciation cellulaire et stimuler la sécrétion de

protéines [VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004]. Les effets dépendent de la nature de la sollicitation (cisaillement, traction cyclique, traction-torsion, etc.), de son amplitude et de sa durée. Il est donc nécessaire de concevoir des bioréacteurs spécifiques conformes aux différentes stimulations mécaniques souhaitées. Ces trentes dernières années, de multiples systèmes ont été développés tels que les chambres de flux (cisaillement), des chambres de flux doubles avec traction cyclique, des machines de stretching (traction cyclique), etc. [BILODEAU, 2004; LANGELIER *et al.*, 1999; LICHTENBERG *et al.*, 2005]. Ces bioréacteurs doivent tenir compte non seulement de la stimulation mécanique souhaitée, mais également de la forme du tissu final [BILODEAU, 2004]. Les premiers bioréacteurs de ce type étaient relativement petits et continuaient à être placés dans des incubateurs [GARVIN *et al.*, 2003; LANGELIER *et al.*, 1999]. Avec l'avancée des recherches, la taille des matrices de support s'est rapprochée de la taille du tissu à cultiver. Aujourd'hui, certains bioréacteurs intègrent des perfusions avec des dispositifs de régulation de la température, du pH, du dioxygène, des efforts appliqués, etc. [ALTMAN *et al.*, 2002b; BILODEAU, 2004; KAHN *et al.*, 2008; THE *et al.*, 2006].

I.2.4.4. Les bioréacteurs pour les ligaments et les tendons

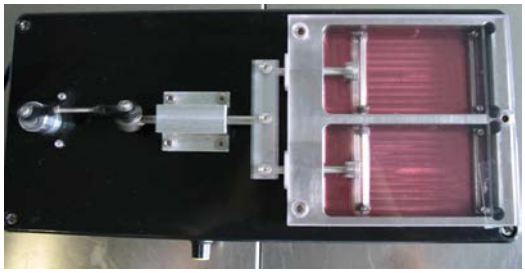
Parmi les bioréacteurs présentés dans les précédents paragraphes, trois types de bioréacteurs sont utilisés actuellement en ingénierie tissulaire des ligaments et tendons : les bioréacteurs statiques, les chambres de flux et les bioréacteurs à stimulation cyclique en traction, parfois en traction-torsion avec ou sans perfusion. Comme nous l'avons précisé précédemment (cf. §I.2.4.1) les boîtes et les puits servent essentiellement à la prolifération cellulaire et à la détermination des concentrations optimales de facteurs biochimiques. Quant aux chambres de flux, elles servent à l'étude à long terme des facteurs biochimiques, comme le TGF-β ou le FGF, sans stimulation mécanique [BRUNE *et al.*, 2007]. Enfin, les bioréacteurs à stimulations mécaniques, avec ou sans perfusion, permettent, outre la stimulation mécanique, de stimuler les cellules en culture par des facteurs biochimiques dans le milieu ou sur la matrice de support (Figure I.13.). Parmi, les stimulations mécaniques possibles, deux sont les plus utilisées : la traction cyclique et la traction-torsion cyclique [ALTMAN *et al.*, 2002b; LANGELIER *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2004; ZHANG *et al.*, 2008a].



A



B



C



D

Figure I.13. Exemples des principaux bioréacteurs à stimulation mécanique pour l'ingénierie tissulaire de ligaments et tendons

A : Bioréacteur de ligament du M.I.T. (3D) ; B : Bioréacteur multifonctionnel Bose© (3D) ; C : Bioréacteur de stretching (LEMTA, M. Marchal, 1D) ; D : Bioréacteur de traction Flexcell International© (2D).

Malgré l'essor de la discipline, peu d'entreprises proposent des bioréacteurs de ce type. Bose© propose un système à une chambre sous traction simple (ElectroForce® BioDynamic Test Instruments, Bose©, MN, USA) comme Flexcell International© pour des plaques 6 puits (Flexcell® Tension Plus™ System, Flexcell International©, NC, USA). Le système Flexcell n'a pas de perfusion et permet des études sur des membranes, la traction est obtenue par un système de vide alternatif qui étire la membrane de façon cyclique [GARVIN *et al.*, 2003].

En général, les équipes de recherches développent elles-mêmes leurs bioréacteurs [LANGELIER *et al.*, 1999; WANG *et al.*, 2004; ZHANG, 2008]. Ainsi, deux équipes dans le monde ont développé leur bioréacteur de traction-torsion cyclique [ALTMAN *et al.*, 2002b; THE *et al.*, 2006]. Ces deux bioréacteurs, bien que de forme différente, sont conçus sur le même principe, la traction-torsion cyclique est obtenue à l'aide de deux moteurs l'un pour la traction et l'autre pour la torsion, qui agit soit *via* un jeu d'engrenages [ALTMAN *et al.*, 2002b], soit en prise directe sur chaque chambre [THE *et al.*, 2006]. Une perfusion permet la circulation du milieu de culture entre des réservoirs dans lesquels le milieu est chauffé et dont le pH et la pression partielle de dioxygène sont régulés, et les chambres de culture dans

lesquelles les cellules sont cultivées sur des matrices de support tridimensionnelles [THE *et al.*, 2006; VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004].

I.2.5. LES FACTEURS BIOCHIMIQUES ET PHYSICO-CHIMIQUES

Les facteurs biochimiques et physico-chimiques sont essentiels à la croissance cellulaire et à la stimulation de gènes spécifiques qui conduisent à la régulation de la synthèse d'une ou de plusieurs protéines. L'étude de la réponse des cellules à l'action d'un facteur est extrêmement délicate. En effet, les cellules étant complexes, l'observation de leur réponse à une molécule ou à l'interaction de plusieurs molécules à des concentrations différentes rend difficile l'observation. Sans prétendre à l'exhaustivité, nous ne présenterons ici que les facteurs les plus utilisés.

I.2.5.1. Le dioxygène

Le dioxygène est un facteur physico-chimique indispensable à la vie cellulaire mais est également un régulateur cellulaire. Des études ont montré que selon le taux de dioxygène, les cellules peuvent plutôt proliférer (entre 10 et 21% de dioxygène) ou sécréter des protéines (inférieur à 10% de dioxygène) [FERMOR *et al.*, 1998]

I.2.5.2. La vitamine C et ses dérivés

La vitamine C est un cofacteur enzymatique qui intervient dans de multiples réactions physiologiques dont la synthèse des collagènes. Des études utilisant un dérivé de la vitamine C, le L-ascorbate-2-phosphate, sur des fibroblastes de ligament, et de l'ascorbate de sodium sur des fibroblastes de peau ont été réalisées. Il en a été conclu que ces dérivés de la vitamine C sont des stimulants de la synthèse de collagènes mais également de la prolifération cellulaire. Ces molécules peuvent aussi interagir avec des facteurs de croissance tels que l'*insuline growth factor* (IGF) [MOREAU *et al.*, 2005; SWITZER et SUMMER, 2008].

I.2.5.3. Les facteurs de croissance

Il existe une multitude de familles de facteurs de croissance. Ce sont des polypeptides de faible poids moléculaire (inférieur à 30kDa) qui agissent sur des récepteurs cellulaires spécifiques de grande affinité. A la différence des hormones, ces molécules ne sont pas sécrétées à longue distance (sécrétion endocrine) mais sont libérées par des cellules avoisinantes (sécrétion paracrine) ou par la cellule elle-même (sécrétion autocrine). Nous pouvons toutefois retenir 5 facteurs de croissance : le PDGF, l'EGF, le FGF, le TGF-β et

l'IGF (Tableau I.2.). Aucune de ces molécules n'est un facteur de croissance spécifique aux fibroblastes mais différentes études ont montré des effets sur la prolifération cellulaire, la synthèse de collagène ou de matrice extracellulaire.

Tableau I.2. Facteurs de croissance utilisés en reconstruction des tendons et ligaments

	Effets rapportés
PDGF	↑ Les propriétés structurales de la matrice ↑ La prolifération cellulaire ↑ La synthèse d'autres facteurs de croissance
EGF	↑ La prolifération cellulaire Ou aucun effet
FGF	↑ La prolifération cellulaire • Régule la migration cellulaire • Stimule l'angiogénèse (vascularisation)
TGF-β	↑ La synthèse de collagènes ↑ La prolifération cellulaire
IGF	↑ La synthèse de la MEC ↑ La prolifération et la migration cellulaire

Adapté de [PETRIGLIANO *et al.*, 2006; WANG, 2006; WOO *et al.*, 2006]

I.3. BIOMECANIQUE DES LIGAMENTS ET TENDONS

L'avancée de l'ingénierie tissulaire dans certains domaines, dont la reconstruction des ligaments et des tendons, est telle que cette discipline nécessite une très bonne maîtrise du comportement mécanique de ces tissus. Les raisons en sont multiples : d'une part, la nécessité d'évaluer quantitativement la régénération des tissus et ainsi de pouvoir comparer le néo-tissu au tissu originel, d'autre part la compréhension de la structure du tissu et de ces composants les plus fonctionnels dans le but d'en améliorer la régénération. Ainsi, de nombreuses études expérimentales et théoriques ont été et sont encore réalisées pour améliorer nos connaissances sur ces matériaux et exiger un certain niveau de qualité fonctionnelle de ces tissus dans la perspective de les greffer avec le moins de risque possible de dégénérescence d'autres matériaux avoisinants comme le cartilage au niveau du genou. Les propriétés mécaniques des tendons et des ligaments rapportées dans la littérature sont présentées dans cette partie, suivies d'un panel des principaux modèles mécaniques développés pour ces tissus. Toutefois, étant

donné le nombre important de modèles développés ces dernières années, leur présentation ne saurait être exhaustive.

I.3.1. PROPRIETES MECANIQUES DES LIGAMENTS ET DES TENDONS

Les propriétés mécaniques des ligaments et des tendons sont étudiées et modélisées, depuis de longues années, généralement en traction uniaxiale simple dans la direction longitudinale ou dans la direction transverse du tissu. Malgré de nombreuses investigations [ABRAMOWITCH et WOO, 2004; FUNG, 1993; LAKES et VANDERBY, 1999; PIOLETTI et RAKOTOMANANA, 2000; PROVENZANO *et al.*, 2001], ces tissus restent relativement méconnus du fait des difficultés expérimentales rencontrées. En effet, nous avons à faire à des tissus mous, de formes irrégulières présentant des directions d'ancrage spécifiques et variables au cours du mouvement qui leur confèrent une fonction optimale. Le taux d'hydratation, la salinité et la température de leur environnement influent grandement sur leurs propriétés mécaniques. Enfin, la préhension de la partie musculaire des tendons constitue toujours un problème non résolu. Les difficultés liées aux tests mécaniques seront traitées dans la suite du mémoire (cf.§III.1.1 et §III.6.1.).

Notons d'ores et déjà que les propriétés mécaniques qualitatives sont fournies dans la littérature en fonction du type d'essai : traction simple, de relaxation, de fluage et de cycle. Les résultats quantitatifs sont très variables d'un tissu à un autre et d'un individu à un autre, ce qui rend difficile les comparaisons entre auteurs, pour un même type de matériau.

I.3.1.1. Réponse en traction simple

Les tendons et les ligaments sont des tissus conjonctifs sollicités, *in vivo*, principalement dans la direction longitudinale bien que certains ligaments subissent également de la torsion (LCA) ou de la flexion. Les premières caractérisations ont été obtenues par le biais d'essais de traction simple dans la direction longitudinale. Les réponses à une sollicitation en élongation à vitesse constante (Figure I.14.) sont traditionnellement divisées en 4 parties : un premier régime à faible contrainte souvent nommée « toe-region », un second de montée en contrainte progressive nommée « heel-region », un troisième de type linéaire et enfin un dernière stade d'endommagement conduisant à la rupture totale du tissu [FRATZL *et al.*, 1997; FUNG, 1993; WANG, 2006].

Ce comportement caractéristique des tendons et des ligaments est interprété en termes de recrutement progressif des fibres de collagènes, c'est-à-dire que les deux premières phases

résultent de la transformation de faisceaux de fibres ondulées en faisceaux de fibres tendues [DE VITA et SLAUGHTER, 2006; DECRAEMER *et al.*, 1980; FRATZL *et al.*, 1997].

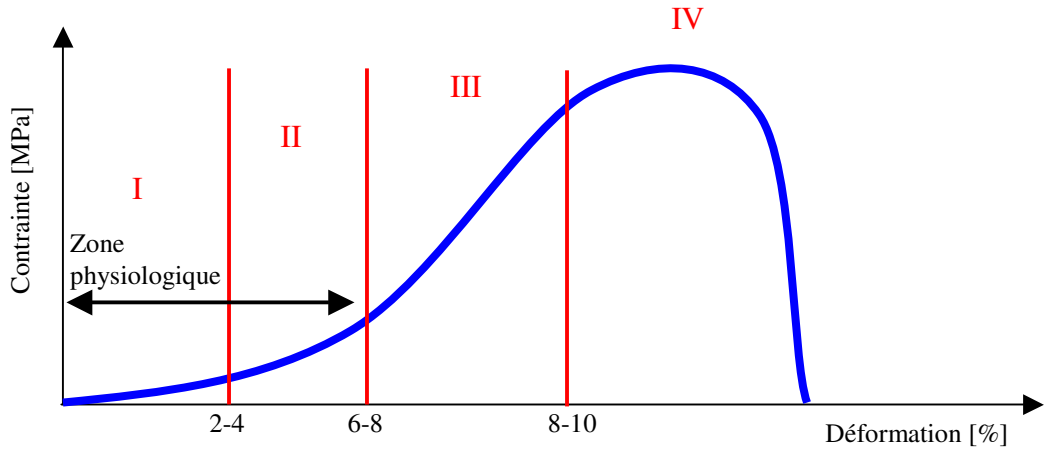


Figure I.14. Comportement caractéristique d'un tendon lors d'une traction uniaxiale
I : « Toe-region » étirement avec une faible réponse en contrainte, II : « Heel region » augmentation rapide de la contrainte de forme polynomiale ou exponentielle, III : zone linéaire souvent utilisée pour mesurer le module d'élasticité tangent, IV : endommagement et ruptures parfois multiples avant la rupture complète.
Inspiré de [FRATZL *et al.*, 1997; FUNG, 1993; WANG, 2006]

Une des caractéristiques essentielles qui a été étudiée est le comportement viscoélastique, en considérant tout d'abord des tests de traction simple à vitesse croissante. Cela se traduit par une augmentation de la contrainte en fonction de la vitesse d'élongation [DANTO et WOO, 1993; PIOLETTI, 1997]. Cette propriété est à la base des études de rupture brutale des tendons et des ligaments survenant généralement pour des vitesses importantes d'étirement. Des estimations concernant les tendons d'Achille ont montré que les vitesses réelles de déformation pouvaient atteindre 400%s^{-1}.

Bien que cet essai mécanique rende compte du phénomène de viscoélasticité, il ne permet, que difficilement, de caractériser la partie visqueuse qui est plus aisément quantifiable en relaxation ou en fluage.

I.3.1.2. Réponse lors d'un essai uniaxial de relaxation

L'essai de relaxation est un test qui permet de mettre facilement en évidence la viscosité et plus largement la partie dissipative au sein d'un solide en bloquant l'élongation après avoir réalisé un chargement en contrôlant l'élongation et en observant la variation de contrainte au cours du temps.

De nombreuses études rapportent des tests de relaxation avec une seule ou une série de relaxations sur un même tissu à des niveaux d'élongation croissants. Souvent les tests de relaxation sont réalisés pendant un temps fixe quelle que soit l'élongation. Ce temps varie de 100 à 3600s [ABRAMOWITCH et WOO, 2004; FUNG, 1993; JOHNSON *et al.*, 1996;

PIOLETTI et RAKOTOMANANA, 2000; PROVENZANO *et al.*, 2001; YIN et ELIOTT, 2004]. Les tests de relaxation courts (100s) sont justifiés par Provenzano *et al.* [PROVENZANO *et al.*, 2001] par une volonté de ne pas laisser les tendons trop longtemps dans le milieu salin et ainsi limiter les risques de modification de leur structure au cours de l'essai (4 essais réalisés). Les spectres des temps de relaxation rapportés vont de quelques secondes à environ 2000s [ABRAMOWITCH et WOO, 2004; PIOLETTI et RAKOTOMANANA, 2000]. Provenzano *et al.* ont démontré qu'un spectre de temps de relaxation constant ne permettrait pas de décrire une série de relaxations à des niveaux d'élongation différents du fait de la non-linéarité des mécanismes mis en œuvre pendant un test de relaxation au sein de ces tissus conjonctifs. Par contre, Pioletti *et al.* [PIOLETTI, 1997] ont réalisé des tests de relaxation sur des ligaments humains du genou et ont observé que le « taux d'avancement » d'une relaxation est identique quel que soit le niveau d'élongation en fixant l'observation de la relaxation à 1800s.

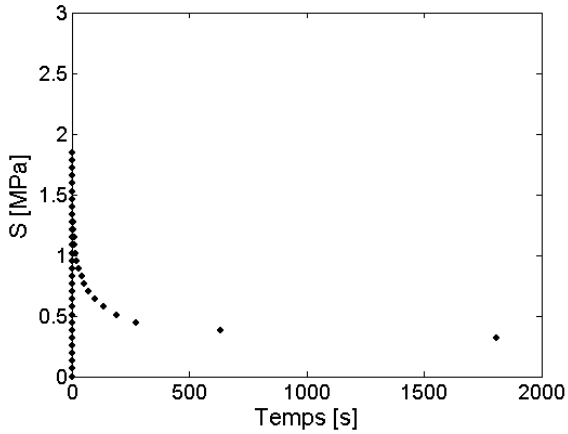


Figure I.15. Comportement typique des ligaments et tendons en relaxation

I.3.1.3. Sollicitations en fluage

L'essai de fluage constitue également un test mettant en évidence les mécanismes dissipatifs lors du contrôle de la force appliquée au matériau et en enregistrant le déplacement au cours du temps (Figure I.16.). Ce test est moins communément utilisé car plus difficile à mettre en œuvre, bien que pour les tendons ce test soit plus proche de la réalité physiologique. En effet, le muscle en se contractant génère une force à ces extrémités auxquelles un tendon est relié. Le tendon subit donc une force qui lui est imposée pendant la contraction musculaire ce qui se traduit par une sollicitation de fluage et non une relaxation. Pourtant assez peu d'expériences de fluage ont été réalisées sur les ligaments et les tendons pour les raisons

décrites précédemment [FUNG, 1993; LAKES et VANDERBY, 1999; WREN *et al.*, 2003]. Notons toutefois que Provenzano *et al.* [PROVENZANO *et al.*, 2001] en ont réalisées sur des MCL de rat Sprague-Dawley et ont mis en évidence la non-linéarité des processus mis en jeu en examinant la vitesse de fluage en fonction de la contrainte appliquée.

Il existe un autre test appelé « fluage dynamique » ou test cyclique, nous retiendrons dans la suite du mémoire, l'expression de fluage dynamique. Ce test consiste en des cycles de charge et de décharge à force appliquée contrôlée et variant entre deux valeurs extrêmes. L'élongation est enregistrée au cours du temps, et peut évoluer jusqu'à la rupture. En observant la contrainte cyclique en fonction de l'élongation, Wren *et al.* [WREN *et al.*, 2003] ont observé une « fermeture » des cycles (« éducation » du matériau) avec un glissement vers des élongations plus importantes (élongation anélastique), puis une « réouverture » de ces cycles due à l'endommagement, jusqu'à la rupture.

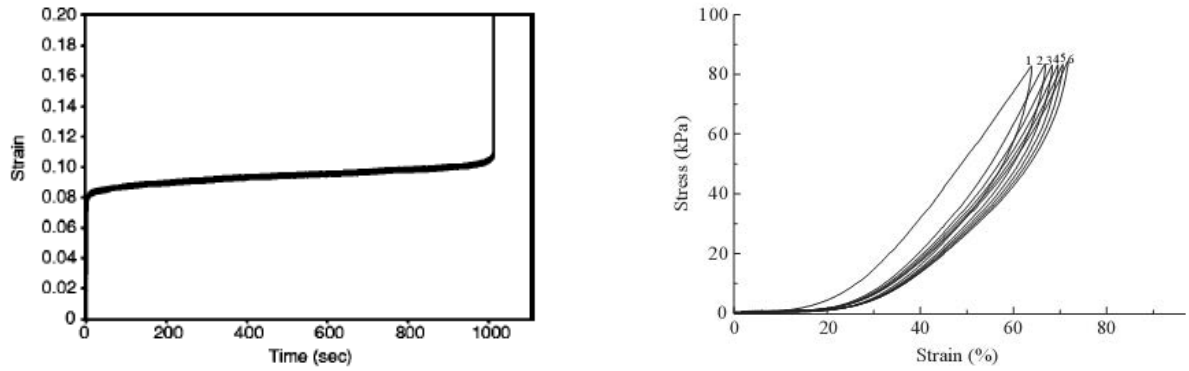


Figure I.16. Comportement typique de ligaments et tendons en fluage
A gauche un exemple de fluage statique au cours du temps (contrainte comprise entre 35 et 75MPa) et à droite un exemple de fluage dynamique.
Extrait de [WREN *et al.*, 2003; WRIGHT *et al.*, 1999]

I.3.1.4. Sollicitations cycliques

Enfin, les sollicitatons cycliques permettent de mettre en évidence la dissipation par le biais de la forme des cycles de réponse, et également l'effet de « l'éducation » d'un matériau soumis à ce test. Il est également possible de mettre en évidence le spectre des temps caractéristiques en faisant varier la fréquence des cycles. Ce test est conduit en imposant, au cours du temps, des amplitudes de déformations allant d'un minimum à un maximum fixe. L'observation peut concerner la contrainte au cours du temps pour une fréquence fixe ou la contrainte à « l'équilibre » pour une plage de fréquences. Des essais expérimentaux [ABRAMOWITCH et WOO, 2004; WOO *et al.*, 1981; WREN *et al.*, 2003] ont montré qu'en imposant des cycles d'amplitudes fixes à une fréquence constante, la contrainte maximale des

cycles diminue au cours du temps jusqu'à se stabiliser. Ce phénomène est caractéristique d'un adoucissement du matériau. De plus si l'on observe ces cycles en fonction de l'élongation, on peut observer une « fermeture » des cycles, témoignant d'une diminution de l'énergie interne dissipée au cours de l'essai. Enfin, Ciarletta *et al.* [CIARLETTA *et al.*, 2008] ont observé de faibles boucles d'hystérésis en décharge sur des tendons fléchisseurs de porcs. Par ailleurs, il est à noter que le conditionnement des tendons et des ligaments constitue un point crucial agissant sur les résultats expérimentaux [ODDOU et PIERRE, 2005; WOO *et al.*, 2006]. En effet, ces matériaux présentent une dépendance très importante vis-à-vis de l'histoire du chargement, le préconditionnement, qui consiste généralement en des cycles de charge et décharge allant de 5 à 10 cycles, ou, comme pour Ciarletta *et al.*, des cycles jusqu'à ce que la variation de la contrainte maximale des cycles soit inférieure à 0,1N. Il est donc impératif de faire attention au conditionnement choisi par les expérimentateurs avant de confronter des résultats obtenus.

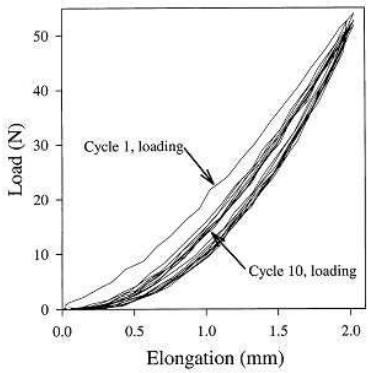


Figure I.17. Comportement typique des ligaments et tendons soumis à un test de sollicitation cyclique.
Extrait de [WEISS et GARDINER, 2001]

I.3.2. LES MODELES ACTUELS

A partir des observations faites sur les différents comportements des ligaments et des tendons, de nombreux modèles ont été proposés et visent différents buts. Le premier étant de pouvoir évaluer mécaniquement les tendons et les ligaments et de pouvoir facilement les comparer afin de trouver un « bon » candidat de greffon dans le cadre du remplacement de ligaments ou de tendons en médecine. Dans un second temps, l'importance de bien comprendre les comportements mécaniques de ces tissus conjonctifs afin de mieux identifier les mécanismes d'endommagement de ces tissus ou de régénération. Et enfin, avec l'amélioration des techniques d'observation microscopique, ces modèles mécaniques ont été

utilisés pour vérifier certains concepts touchant à la structure fonctionnelle de ces tissus. Ces différentes motivations ont conduit les biomécaniciens à développer des modèles allant du modèle élastique isotrope le plus simple à des modèles hyper ou pseudo-hyper viscoélastiques anisotropes pour les plus complexes [FUNG, 1993; PEÑA *et al.*, 2007].

I.3.2.1. Les modèles de comportement élastique

Comme précisé ci-dessus, les ligaments et les tendons sont généralement « préconditionnés » par des cycles de charge et décharge, ce qui modifie les résultats des tests mécaniques. Si le préconditionnement est tel qu'il constitue une « éducation » du matériau, celui-ci devient insensible ou peu sensible à certains paramètres de sollicitation. Ainsi la viscosité et la dissipation ont longtemps été négligées par de nombreux mécaniciens [WEISS et GARDINER, 2001]. Dans un premier temps, les mécaniciens ont cherché à décrire le comportement des tendons et des ligaments de façon purement élastique en choisissant des modèles isotropes, isotropes transverses voire anisotropes (Tableau I.3.). Souvent ces tissus ont été caractérisés par des modèles polynomiaux ou exponentiels [FUNG, 1993; VERONDA et WESTMANN, 1970] ou même uniquement par leur module d'élasticité tangent dans la zone linéaire. Cette dernière caractérisation est encore largement employée par de nombreuses équipes d'ingénierie tissulaire, malgré son imprécision [GENTLEMAN *et al.*, 2006]. Par ailleurs, des modèles structuraux ont été développés pour expliquer la zone d'augmentation progressive du module d'élasticité tangent sur la base du recrutement progressif de fibres de collagènes supposées de comportement hookéen. Ces modèles prennent parfois en compte la forme ondulée des faisceaux de fibres [FRISEN *et al.*, 1968; HURSCLER *et al.*, 1997; VIIDIK, 1968]. Enfin, des modèles isotropes transverses et composites utilisant des potentiels thermodynamiques d'élasticité pour la partie fibreuse et pour la substance fondamentale ont également été développés [WEISS et GARDINER, 2001].

Malheureusement, ces modèles ne tiennent pas compte de la dissipation d'énergie liée à la viscosité (processus d'hystérésis visible sur la réponse mécanique) et ne sont, par conséquent, dédiés qu'à des essais de traction simple à vitesse d'élongation constante.

Tableau I.3. Exemple de modèles élastiques

	Modèle
Loi empirique	$\sigma = k\varepsilon^{d}$
	$\sigma = B\left[e^{m\varepsilon} - 1\right]$
Potentiel thermodynamique (élasticité)	$\rho W = \frac{C}{2}\exp\left(a_1 E_{\theta\theta}^2 + a_2 E_{zz}^2 + 2a_4 E_{\theta\theta} E_{zz}\right)$
	$W_e = \alpha\exp\left[\beta\left(I_1 - 3\right)\right] + c_1\left(I_2 - 3\right)$

Extrait de [FUNG *et al.*, 1979; KENNEDY *et al.*, 1964; VERONDA et WESTMANN, 1970]
E_{zz} et $E_{\theta\theta}$ sont les modules d'élasticité dans la direction longitudinale et transverse. I_1 et I_2 sont le premier et le deuxième invariant du tenseur des déformations

I.3.2.2. Modèles de comportement viscoélastique

A la fin du XX^{ème} siècle, quelques expérimentateurs ont testé, sur un même tendon ou ligament, l'effet de la variation de différentes vitesses d'élongation allant de lent (0,6%s^{-1}, [PIOLETTI, 1997]) à très rapide (381%s^{-1}, [DANTO et WOO, 1993; DE VITA et SLAUGHTER, 2006]). L'analyse de ces expériences ainsi que celle des tests de relaxation à différents niveaux d'élongation ont conduit à prendre en compte le comportement visqueux [DE VITA et SLAUGHTER, 2006; LIMBERT et MIDDLETON, 2004; PIOLETTI, 1997] puis à modéliser le phénomène de mémoire évanescente utilisant le théorie de Coleman et Noll [COLEMAN et NOLL, 1961] fondée sur le principe de superposition de Boltzmann.

Parmi les différents modèles existants, nous pouvons citer celui de De Vita *et al.* [DE VITA et SLAUGHTER, 2006] qui prend en compte la distribution statistique (Weibull) du recrutement de fibres, par le biais de la probabilité de tension de fibres dans la direction de sollicitation, chaque fibre étant assimilée à un modèle rhéologique de Kelvin-Voigt (idée précédemment proposée par Hurschler *et al.* [HURSCHLER *et al.*, 1997]). Ce qui donne pour une traction simple dans la direction longitudinale des fibres :

$$\begin{cases} P_{zZ} = -\dfrac{p}{\lambda} + \displaystyle\int_1^{\lambda} g\left(\lambda_s\right)\left[K\ln\left(\dfrac{\lambda}{\lambda_s}\right) + \eta\dfrac{D}{Dt}\left[\ln\left(\dfrac{\lambda}{\lambda_s}\right)\right]\right]d\lambda_s \\ g\left(\lambda\right) = \alpha\beta^{-\alpha}\lambda^{-1}\left[\ln\left(\lambda\right)\right]^{\alpha-1}\exp\left[-\left[\dfrac{\ln\left(\lambda\right)}{\beta}\right]^{\alpha}\right] \\ P_{rR} = P_{\theta\Theta} = -p\sqrt{\lambda} \end{cases} \quad \textbf{(I.1.)}$$

où P est le tenseur de contrainte de Piola-Kirschoff, p la pression, K et η sont respectivement le module d'élasticité et la viscosité des fibres de collagènes, α et β des paramètres adimensionnés. Ce modèle permet de suivre des chargements de traction en charge à différentes vitesses, et rend compte de l'effet visqueux lié à la variation de vitesse et au recrutement de fibres. En revanche, cette formulation qui est exprimée explicitement en fonction de l'élongation, ne permet pas de modéliser des tests de relaxation.

Ces trois dernières décennies, les modèles ont incorporé des effets mémoire afin de suivre un ou plusieurs chargements avec des tests de relaxation. Dès 1972, Fung a proposé un modèle, la *Quasi-Linear Viscoelastic Theory* (QLV) [FUNG, 1993], qui reste encore aujourd'hui une référence en biomécanique du fait de ses possibilités descriptives et du faible nombre de paramètres impliqués (5) [ABRAMOWITCH et WOO, 2004]. En effet, il permet de suivre complètement un chargement de traction uniaxiale, en petit déplacement, suivi d'un test de relaxation. Ce modèle rend compte également de la variation, au cours du temps, des contraintes maximales lors d'une sollicitation cyclique. La QLV se présente sous la forme d'une convolution entre une loi de comportement élastique et d'une fonction évanescente :

$$\underline{\underline{S}}(t) = \underline{\underline{G}}(t) * \underline{\underline{S_e}}\left(\underline{\underline{E}}\right) \qquad \textbf{(I.2.)}$$

$$\underline{\underline{S}}(t) = \int_{-\infty}^{t} \underline{\underline{G}}(t-\tau).\frac{\partial \underline{\underline{S_e}}}{\partial \underline{\underline{E}}}.\frac{\partial \underline{\underline{E}}}{\partial \tau}d\tau \qquad \textbf{(I.3.)}$$

où $\underline{\underline{S_e}}$ est le tenseur des contraintes élastiques et G est la fonction évanescente qui décrit un spectre continu de temps de relaxation sous la forme suivante :

$$G(t) = \frac{1 + \int_0^{\infty} S(\tau)\exp\left(-\frac{t}{\tau}\right)d\tau}{1 + \int_0^{\infty} S(\tau)d\tau} \quad \text{avec} \quad S(\tau) = \begin{cases} \frac{C}{\tau} & \tau_1 \le \tau \le \tau_2 \\ 0 & \tau < \tau_1,\ \tau > \tau_2 \end{cases} \qquad \textbf{(I.4.)}$$

Enfin, la loi de comportement élastique est choisie de forme exponentielle :

$$\sigma^e(\varepsilon) = A\left[\exp(B\ \varepsilon) - 1\right] \qquad \textbf{(I.5.)}$$

L'avantage de ce modèle est son petit nombre de paramètres permettant de décrire les tests de relaxation. Par contre, il a été récemment démontré que ce modèle ne permet pas de rendre compte d'une série de relaxations à des élongations différentes [PROVENZANO *et al.*, 2001] bien qu'en 2003 une étude ait pu proposer des ajustements sur une série de relaxations pour des déformations allant de 0,5% à 2% [SARVER *et al.*, 2003]. De plus, le choix d'une forme exponentielle permet de suivre des chargements en petites déformations mais surestime

la contrainte aux déformations plus importantes restant dans une zone physiologique [DEFRATE et LI, 2007]. Malgré ces inconvénients, ce modèle reste performant pour une évaluation en traction-relaxation.

En 2000, Pioletti *et al.* [PIOLETTI et RAKOTOMANANA, 2000] ont présenté un modèle également fondé sur la mémoire évanescente en décomposant en deux la partie des phénomènes de dissipation : une composante instantanée dérivant d'un potentiel lié à la viscosité et un effet mémoire à long terme dont les équations sont données ci-dessous.

$$\underline{\underline{S}} = \underline{\underline{S_e}} + \underline{\underline{S_v}} + \Im_{s=\delta}^{\infty}\left\{\underline{\underline{G(t-s)}};\underline{\underline{C(t)}}\right\} \tag{I.6.}$$

$$\begin{cases} \underline{\underline{S_e}} = 2\rho\dfrac{\partial W_e}{\partial \underline{\underline{C}}} \\ \underline{\underline{S_v}} = 2\rho\dfrac{\partial W_v}{\partial \underline{\underline{C}}} \\ \Im_{s=\delta}^{\infty}\left\{\underline{\underline{G(t-s)}};\underline{\underline{C(t)}}\right\} = \int_{\delta}^{t}\kappa\left[\underline{\underline{G}}(t-s);\underline{\underline{C}}(t)\right]\dot{M}(s)\,ds \end{cases} \tag{I.7.}$$

$$\begin{cases} W_e = \alpha\exp\left[\beta(I_1-3)\right] - \dfrac{\alpha\beta}{2}(I_2-3) \\ W_v = \dfrac{\eta}{4}tr\left(\dot{\underline{\underline{C}}}^{2}\right)(I_1-3) \\ \kappa\left[\underline{\underline{G}}(t-s);\underline{\underline{C}}(t)\right] = \underline{\underline{S_e}}\left[\underline{\underline{C}}(t-s)\right] \\ M(s) = \sum_{k=1}^{3}\dfrac{a_k}{\sum_{j=1}^{3}a_j}\exp\left(-\dfrac{s}{\tau_k}\right) \end{cases} \tag{I.8.}$$

où $\underline{\underline{S_e}}$ et $\underline{\underline{S_v}}$ sont respectivement la contrainte élastique et la contrainte visqueuse dérivant chacune d'un potentiel et $\Im$ une fonctionnelle traduisant l'effet mémoire à long terme qui prend la forme d'un produit de convolution entre une fonction évanescente κ et la dérivée d'une série de Prony à trois paramètres (où s est le temps d'intégration).

Ce modèle, quant à lui, permet de suivre des chargements en traction uniaxiale pour différentes vitesses de chargement à l'aide du même jeu de paramètres ou des relaxations normées à l'aide de 9 paramètres. Le choix du potentiel visqueux donne une contrainte visqueuse, $\underline{\underline{S_v}}$, proportionnelle à la vitesse d'élongation, par conséquent un changeant de la vitesse d'élongation au cours de l'essai induit une discontinuité de la réponse en contrainte.

Enfin, plus récemment Peña *et al.* [PEÑA *et al.*, 2007] ont présenté un modèle tridimensionnel structural cherchant à unifier différents tests mécaniques comme la charge, la relaxation et des sollicitations cycliques. Après l'avoir implanté dans un code de calcul, cette équipe a réalisé différents tests sur une forme réelle de ligament croisé. Ils ont pu rendre compte des expériences de Pioletti *et al.* [PIOLETTI *et al.*, 1998] en charge, et ont prédit des tests de relaxation et des tests cycliques qualitativement similaires aux résultats expérimentaux disponibles dans la littérature. Ce modèle est très prometteur et nécessiterait d'être confronté à plus de résultats expérimentaux.

Des modèles mécaniques utilisant des paramètres de porosité ont également été proposés [YIN et ELIOTT, 2004]. Mais, il est très difficile de mesurer les caractéristiques de la porosité des tendons et des ligaments : les molécules d'eau contenues dans ces tissus sont liées aux protéoglycanes. Enfin, il existe des modèles d'endommagement et de rupture [LIAO et BELKOFF, 1999; RODRIGUEZ *et al.*, 2006] que nous n'avons pas traités, notre étude se limitant à des conditions physiologiques « normales ».

I.3.2.3. Les modèles de fluage

Les modèles de fluage, bien que décrivant des sollicitations plus physiologiques au niveau des tendons, sont moins nombreux. Différentes équipes ont proposé des modèles de fluage utilisant des modèles empiriques (e.g. $\varepsilon = a\sigma^n$, [MORGAN, 1960]), ou de mémoire évanescente comme Lakes *et al.* [LAKES et VANDERBY, 1999; OZA *et al.*, 2004] :

$$\varepsilon(t) = \int_0^t J(t-\tau,\ \sigma)\frac{d\sigma(\tau)}{d\tau}d\tau \qquad \textbf{(I.9.)}$$

$$J(t,\ \sigma) = g_1 t^n + g_2 \sigma t^m \qquad \textbf{(I.10.)}$$

ou encore par réarrangement interne, Ciarletta *et al.* [CIARLETTA *et al.*, 2005] qui ont adapté un modèle de réarrangement de liaisons intermoléculaires au cours de l'histoire proposé par Drozdov pour des polymères [DROZDOV, 1997].

I.3.2.4. Applications à la modélisation des articulations

Depuis, le développement de l'informatique et « l'explosion » des vitesses de calcul, les biomécaniciens ont développé des programmes afin de tester les modèles mécaniques sur des géométries réelles obtenues à partir de clichés IRM, de scanner et de tomographie. Ces outils permettent de visualiser des cinématiques d'articulation complètes et d'évaluer les champs de contraintes ou des déformations dans des systèmes complexes comme le genou,

l'épaule, la zone pelvienne, etc. Les applications sont diverses et vont de l'aide à la chirurgie en évaluant différentes positions de greffe, à la conception de prothèse en passant par l'accidentologie ou la simulation d'effet de lésion de tissus sur une articulation complète [BEHR *et al.*, 2006; JONES *et al.*, 2008; PEÑA *et al.*, 2008; SONG *et al.*, 2004; SUBIT, 2004; WEISS et GARDINER, 2001].

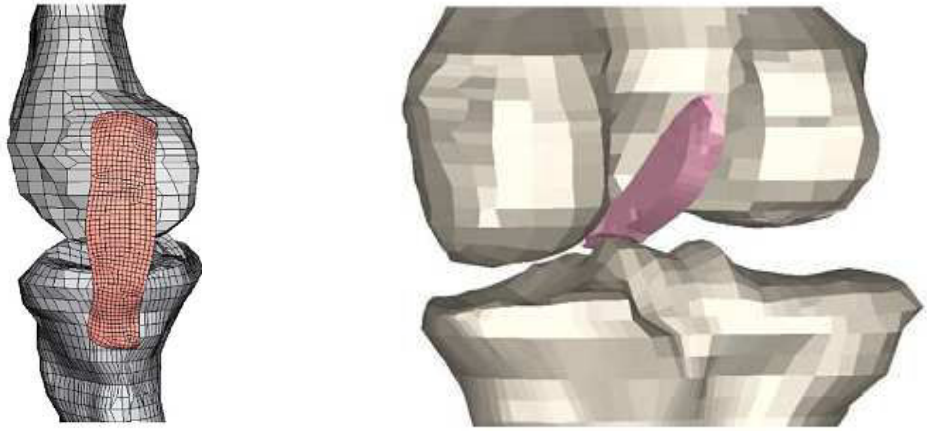


Figure I.18. Exemples de modélisation numérique de ligaments.
Extrait de [PEÑA *et al.*, 2007; PEÑA *et al.*, 2008]

En conclusion, la modélisation du comportement des ligaments et des tendons existe maintenant depuis plus d'un siècle. Au cours de ces deux dernières décennies, elle s'est extrêmement complexifiée. Aujourd'hui les nouveaux modèles visent à unifier les comportements de ces tissus afin de mieux comprendre leurs structures fonctionnelles. En parallèle, des études de simulations numériques sont mises en place en incorporant ces modèles dans des structures partielles ou complètes. Les résultats expérimentaux restent à prendre avec précaution, en particulier au niveau du choix de la préhension du tissu et du préconditionnement. De plus, le comportement du tissu dans les directions transverses est encore assez mal connu, essentiellement pour des raisons de préhension et de risque d'endommagement lorsque le tissu est découpé dans cette direction.

Chapitre II :
CONCEPTION ET REALISATION D'UN BIOREACTEUR DE LIGAMENTS

Depuis plusieurs décennies, de nombreuses études ont montré que les stimulations mécaniques cycliques influent sur la prolifération et la différenciation des cellules par des processus complexes de mécanotransduction [VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004; WANG *et al.*, 2007]. Ainsi, l'ingénierie tissulaire nécessite des machines (bioréacteurs) permettant d'appliquer les stimulations mécaniques spécifiques à chaque tissu. Dernièrement, Vunjak-Novakovic *et al.* ont montré que les stimulations cycliques de traction-torsion simultanées qui simulent une flexion du genou, induisent une synthèse, chez les CSMM, de protéines proche de celles des ligaments croisés.

Actuellement seules deux équipes [ALTMAN *et al.*, 2002b; THE *et al.*, 2006; VUNJAK-NOVAKOVIC *et al.*, 2004] dans le monde ont développé de tels bioréacteurs pour l'ingénierie tissulaire de ligaments et de tendons. Ces bioréacteurs n'étant pas commercialisés, notre équipe a décidé de développer son propre appareil dédié à ces tissus.

Dans ce chapitre, nous présenterons donc les démarches entreprises dans la conception, la réalisation et la validation du bioréacteur développé au sein de notre équipe.

II.1. CAHIER DES CHARGES

Le cahier des charges de ce bioréacteur (Tableau II.1.), doit en premier lieu tenir compte des conditions nécessaires et indispensables à la culture cellulaire. Les conditions de culture *in vitro* nous contraignent à concevoir des chambres de culture stérilisables et étanches (aux liquides et aux gaz), et à sélectionner pour leur construction des matériaux non cytotoxiques et qui le resteront en vieillissant. De plus, la culture cellulaire se faisant en milieu aqueux à un pH compris entre 7 et 7,4 et une température de 37°C, les matériaux oxydables sont à exclure du contact des cellules ou du milieu de culture. La stérilité de l'intérieur des chambres de culture, mais aussi celle de tout système en contact direct ou indirect avec le milieu de culture doit être préservée pendant tout le temps que dure l'expérience. Il est donc nécessaire de prévoir une procédure de montage et de démontage du système de culture en environnement stérile. Enfin, les cultures cellulaires en bioréacteurs devant durer plusieurs semaines, voire plusieurs mois, il est nécessaire de prévoir un système de renouvellement du milieu de culture, des nutriments, des gaz, des facteurs de croissance, si nécessaire, et également de pouvoir éliminer les déchets excrétés par les cellules. Les gaz à dissoudre dans le milieu de culture sont le dioxygène (O_2) pour la viabilité des cellules et le contrôle de la culture cellulaire (cf. §I.2.5.1.) et le dioxyde de carbone (CO_2) pour stabiliser le pH du milieu en utilisant le couple acido-basique CO_2 / HCO_3^-.

$$CO_2 + 2H_2O \rightleftharpoons HCO_3^- + H_3O^+ \quad \textbf{(II.1.)}$$

A ces conditions générales de culture, il est indispensable d'ajouter les conditions spécifiques de culture des fibroblastes, qui sont des cellules adhérentes. Il est donc nécessaire de prévoir un support, sur lequel ces cellules seront ensemencées, et qui permettra de stimuler mécaniquement les cellules en se déformant en mode de traction-torsion cyclique. Les chambres de culture devront donc être dotées d'un système de préhension adapté à la matrice de support développée pour les ligaments et les tendons [VAQUETTE, 2008].

Sur le plan mécanique, les stimulations désirées sont des cycles triangulaires de traction-torsion (LCA), ou de traction simple (tendons), dont les amplitudes et les fréquences doivent être modulables entre 0 et 25% de déformation en traction, entre 0 et 90° en torsion, et à des fréquences allant de 0 à 1Hz. Le bioréacteur étant prévu à terme pour cultiver des greffons, la taille des matrices de support doit être de l'ordre de grandeur des tissus humains réels. Un ligament croisé ayant une longueur de l'ordre de 40mm de long [DUTHON *et al.*, 2006] la traction correspondra alors à un déplacement de 0 à 10mm. Pour permettre une souplesse d'utilisation, les deux mouvements devront être indépendants afin de pouvoir explorer l'effet de chaque mouvement ainsi que le synchronisme, ou le déphasage, des sollicitations. Au cours de l'étude, la matrice de support devra se dégrader progressivement pour permettre au tissu collagénique de le remplacer. Cette dégradation et les sollicitations cycliques peuvent entraîner une baisse des propriétés mécaniques et de la plasticité de la matrice de support. Une diminution des sollicitations mécaniques transmises en découlera, il est donc à prévoir une compensation de cette plasticité afin d'assurer que la matrice de support demeure tendue.

Au niveau des régulations, il est nécessaire de pouvoir maintenir la température et le pH, dans le but d'assurer la constance de ces deux paramètres, un contrôle régulier de ces valeurs sera donc envisagé.

Enfin, pour permettre de faire des études statistiques et au vu des temps de culture au sein du bioréacteur, il sera à terme nécessaire de prévoir un nombre suffisant de chambres de culture. Pour simplifier le système, et abaisser le prix de revient de l'usinage lors de la réalisation du bioréacteur, il a été convenu de faire l'étude sur un système à deux chambres de culture, et de concevoir au final un bioréacteur ayant suffisamment de chambres pour explorer l'aspect statistique des résultats en une seule expérience (entre 6 et 12 chambres).

Tableau II.1. Résumé du cahier des charges

	Système de culture	Système mécanique
Matériaux	• Non oxydables • Non cytotoxiques • Stérilisables • Etanches	• Non oxydables • Lavables
Stimulations mécaniques		• Traction - cycle triangulaire, déformation de 0 à 25% • Torsion - cycle triangulaire, torsion de 0 à 90° • Fréquences de 0 à 1Hz
Milieu de culture	• Température 37°C • $7 \leq pH \leq 7,4$ • Evacuation des déchets • Apports nutritifs • Apports en O_2 et en CO_2	
Matrice de support	• Taille - ≈ 40mm de long • Structure imitant celle des ligaments et tendons	• Préhension de la matrice de support • Rattrapage des déformations plastiques
Durée	• De quelques jours à quelques mois	• En continu ou pour une durée déterminée par jour

II.2. SOLUTIONS TECHNIQUES CHOISIES

Du fait d'une importante différence d'exigences entre la zone de culture cellulaire et la zone de transmission des mouvements, nous avons décidé de décomposer et de présenter le travail de conception selon ces deux axes.

II.2.1. SYSTEME DE STIMULATION MECANIQUE

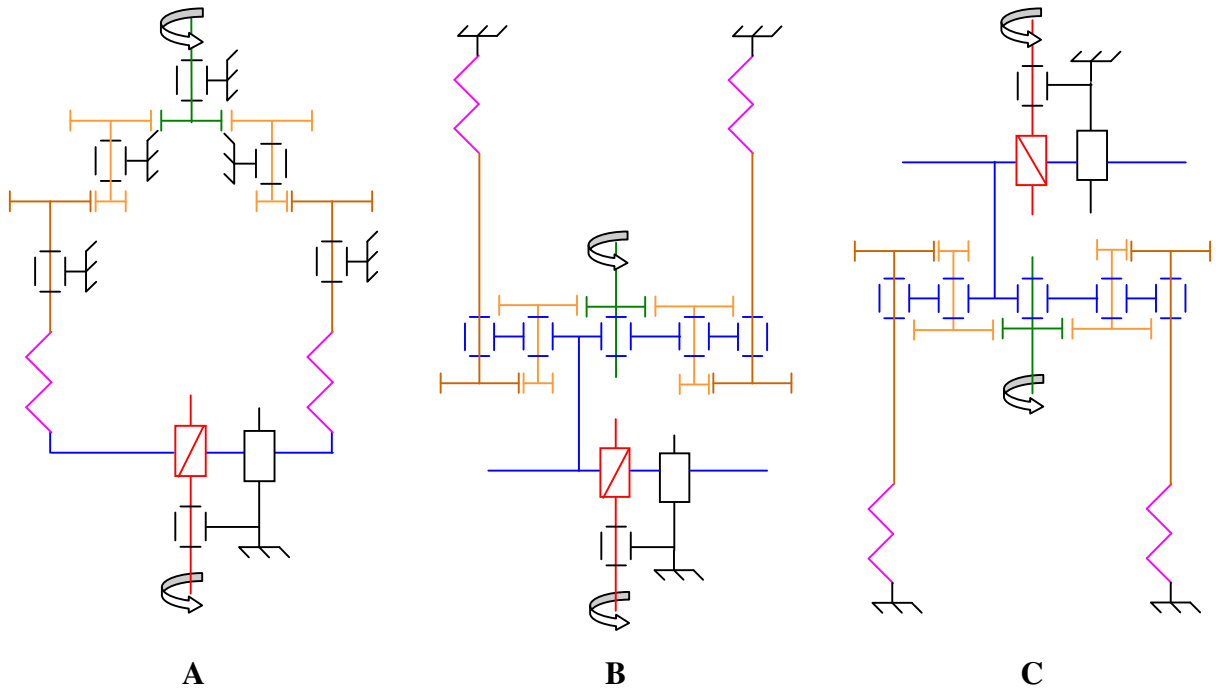
Pour la partie concernant le mouvement imposé à la matrice de support, le cahier des charges indique que ces mouvements doivent pouvoir être à la fois synchrones ou asynchrones et leur amplitude et fréquence doivent être réglables de façon indépendante. Il est donc nécessaire de prévoir des mouvements indépendants avec une commande qui les pilotera selon les choix de l'opérateur, afin de mettre sur pied un système qui soit évolutif.

Dans un premier temps, nous avons cherché à établir un schéma cinématique permettant de produire les mouvements souhaités. Il a servi par la suite de « squelette » pour concevoir les pièces du bioréacteur. En effet, le schéma cinématique met en évidence les groupes cinématiquement équivalents ainsi que les mouvements relatifs.

II.2.1.1. Schéma cinématique et plan CAO

Au niveau des chambres de culture, le mouvement souhaité est une combinaison indépendante des mouvements de rotation et de translation. Ces deux mouvements peuvent l'un comme l'autre être réalisés par des moteurs électriques ou des vérins hydrauliques. Les efforts étant faibles, les problèmes de maintenance et de propreté liés au système hydraulique, nous ont convaincus d'écarter ce choix technologique pour lui préférer un système électrique plus compact et plus simple à mettre en œuvre dans un laboratoire de biologie. D'autre part, du fait de la nécessité de pouvoir contrôler les mouvements en position et en vitesse, nous avons préféré utiliser la même technologie pour les deux mouvements afin de faciliter la conception de la commande numérique. Nous avons donc choisi des moteurs rotatifs pas à pas pour la rotation et pour la translation.

Concernant la rotation, à la suite du moteur, nous avons utilisé un système d'engrenages permettant de distribuer le mouvement simultanément aux deux chambres afin de diminuer le coût de réalisation. Nous en avons profité pour introduire un réducteur 1:4, ce qui a pour but d'améliorer la fluidité du mouvement à faible vitesse (1cycle/min.). Quant à la translation, partant d'un mouvement de rotation et devant aboutir à une translation nous avons dû ajouter une liaison hélicoïdale qui permet des mouvements de rotation et de translation couplés. Cette liaison hélicoïdale a été réalisée à l'aide d'un système vis-écrou.



A **B** **C**

Figure II.1. Schémas cinématiques envisagés pour la conception du bioréacteur

A partir de ces choix, nous avons élaboré trois schémas cinématiques différents (Figure II.1.) dont nous avons discuté les avantages et inconvénients afin de choisir la solution la plus simple. La Figure II.1.A représente une solution dans laquelle les deux mouvements sont complètement découplés puisqu'à l'une des extrémités de la matrice de support, modélisée par un ressort, nous appliquons la translation et à l'autre extrémité la rotation. Cette solution, qui présente l'avantage d'être très simple à réaliser du point de vue mécanique, complexifie la structure des chambres de culture. En effet, le fait d'appliquer les mouvements aux deux extrémités de la matrice impose des systèmes d'étanchéité plus nombreux au niveau des pièces en mouvement. Nous nous sommes donc tournés vers des solutions dans lesquelles le mouvement de vrille est appliqué à une seule des extrémités de la matrice (Figure II.1.B et C), l'autre restant fixe par rapport au bâti (en noir).

Parmi ces solutions techniques, nous avons préféré disposer le moteur de rotation et le réducteur sur le groupe en translation afin d'avoir une grande liberté sur la distance de translation. En effet, si nous avions fait le choix, comme l'équipe américaine [ALTMAN *et al.*, 2002b], de mettre le moteur de rotation sur le bâti avec le moteur de translation et le système de transmission de mouvement par engrenage sur la partie en translation, nous aurions été limités par l'épaisseur de pignon du moteur qui ne peut être que de 1 à 2cm maximum (Figure II.2.). Les solutions B et C quant à elles permettent une translation importante sans perte de transmission de la rotation.

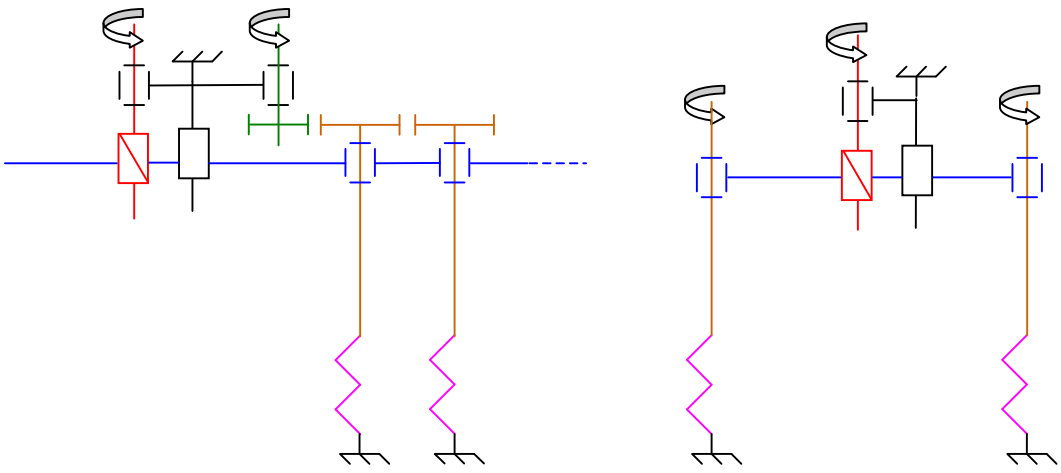
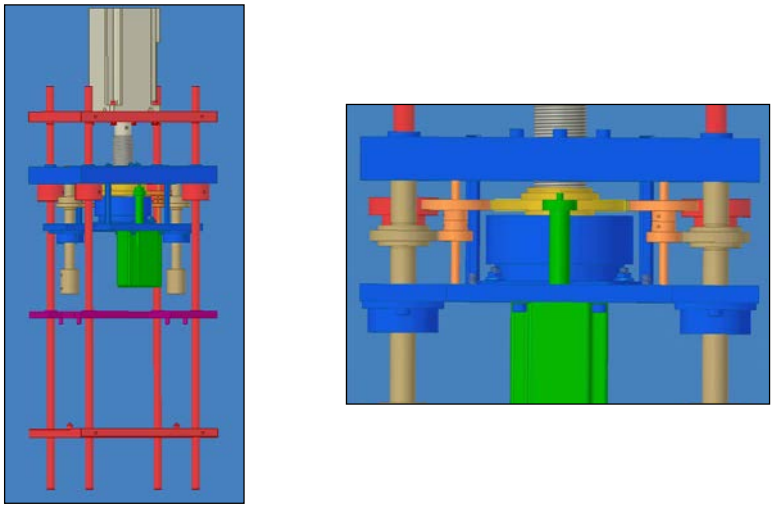


Figure II.2. Schémas cinématiques des bioréacteurs de traction-torsion antérieurs
A : équipe américaine [ALTMAN et al., 2002b], comptant 12 chambres ;
B : équipe singapourienne [THE et al., 2006]

Nous avons finalement retenu la solution C pour des raisons pratiques. Si la solution B présente l'avantage d'avoir les moteurs, surtout le moteur de translation, dans la partie basse du bioréacteur ce qui permet de stabiliser la machine, elle est plus contraignante pour l'étanchéité du fait que les mouvements sont imposés à l'extrémité basse de la chambre de culture. De ce fait, cette solution impose à l'étanchéité dynamique de supporter le poids du milieu de culture dans la chambre ainsi que la pression du système de renouvellement de milieu. Par contre, pour la solution C, le système d'étanchéité des pièces en mouvement ne supporte que la pression du système de renouvellement. Enfin, nous n'avons pas envisagé de mettre le système horizontal pour des questions d'influence possible de la gravité sur le tissu en culture et des problèmes d'encombrement du système complet.

A partir de ce schéma cinématique, les plans du bioréacteur ont été réalisés à l'aide du logiciel de CAO Autodesk Inventor® Professional 8 (Autodesk Inc., CA, USA). Ceci a permis de dimensionner les pièces, de faire l'inventaire du matériel à acquérir, tant en matériaux qu'en pièces manufacturées, et de garantir l'ajustement des pièces avant usinage.

La Figure II.3. présente une vue d'ensemble de la réalisation mécanique ainsi qu'un agrandissement au niveau du système d'engrenages. Un perçage du plateau de translation a été prévu afin de permettre le passage au travers de la vis du moteur de translation et ainsi avoir un déplacement suffisant pour ajuster le bioréacteur à la taille de la matrice, l'étirer et faire un éventuel « rattrapage » de déformation plastique afin que la matrice reste toujours tendue. A titre indicatif, et pour que le lecteur puisse avoir une idée de la taille de ce bioréacteur, ses dimensions sont 650mm de haut, 230mm de large et 160mm de profondeur.



A **B**

Figure II.3. Dessin d'ensemble et agrandissement de la partie mécanique du bioréacteur

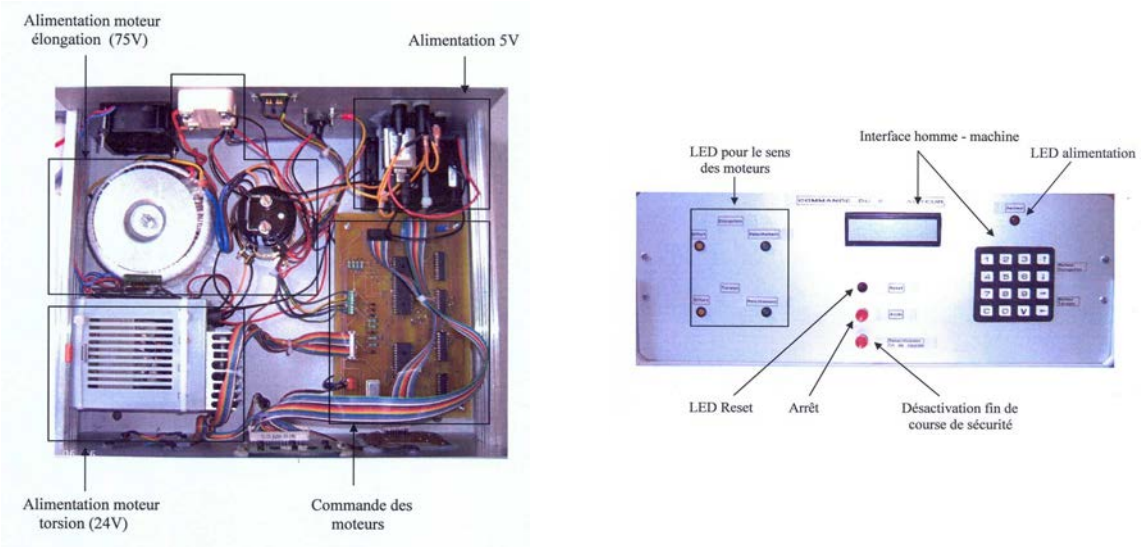
A : Vue d'ensemble ; B : agrandissement du réducteur.

II.2.1.2. Pupitre de commande

Les parties commande et puissance ont été réalisées lors d'un stage de technicien supérieur d'application électronique (AFPA) par Vincent Thibault-Belet sous la direction de Michel Marchand (Ingénieur CNRS LEMTA). Un cahier des charges Tableau II.2. a été élaboré en début de stage et un suivi régulier a été réalisé afin d'affiner le projet.

Tableau II.2. Cahier des charges de la partie commande

	Commande
Interface opérateur-bioréacteur	• Pilotage des moteurs pour l'installation des chambres de culture • Entrer et afficher les amplitudes choisies • Entrer et afficher les fréquences choisies
Déplacements des moteurs	• Alimentation des moteurs • Générations des signaux pour faire tourner les moteurs selon les paramètres insérés par l'opérateur • Déplacements cycliques de forme triangulaire • Synchronisation des cycles
Sécurité	• Arrêt des mouvements si amplitudes trop importantes



A **B**

Figure II.4. Vues du pupitre de commande

A : Intérieur du pupitre de commande ; B : Façade du pupitre de commande et interface avec l'opérateur

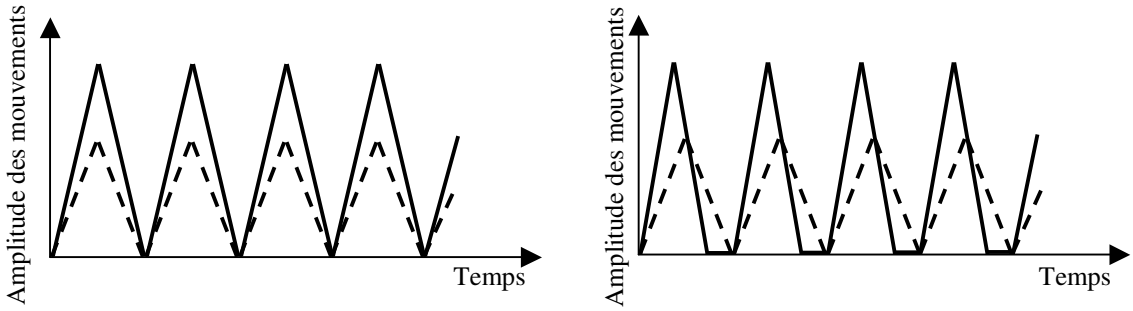


Figure II.5. Mouvements de translation et de rotation imposés en fonction du temps
A : Mouvements en phase, B : Mouvements re-synchronisés au début de chaque cycle

Un pupitre de commande a donc été réalisé. Il comporte une partie puissance permettant l'alimentation des deux moteurs, et une partie commande comprenant un microcontrôleur programmé en langage C (PIC 16F877, Microchip Tchnology Inc., AZ, USA), un clavier numérique et un afficheur LCD (Figure II.4.).

Les amplitudes des cycles étant variables, seuls les débuts de cycles ont été détectés par l'intermédiaire des capteurs de positions de type interrupteur. Ceci permet éventuellement de re-synchroniser les mouvements. En effet, il faut attendre que les deux capteurs soient enclenchés pour passer au cycle suivant (Figure II.5.). Un capteur de position fin de course « haut » a également été placé au niveau du bâti (plateau du moteur de translation) afin d'éviter que le plateau de translation n'arrive en butée contre le bâti ce qui risquerait d'endommager le moteur de translation.



Figure II.6. Ensemble bioréacteur et pupitre de commande

II.2.2. SYSTEME DE CULTURE CELLULAIRE

Les chambres de culture et le système de renouvellement du milieu de culture doivent permettre de relier la matrice de support au système de stimulation mécanique tout en satisfaisant les contraintes de culture cellulaire déjà énumérées dans le cahier des charges (cf. §II.1.).

Pour les chambres de culture, il faut permettre le passage, au travers de la partie supérieure de chaque chambre, d'un axe permettant la transmission du mouvement cyclique de vrille. Malgré le passage de cet axe et de ses mouvements, la stérilité du système doit être conservée. Pour cela, il faut prévoir un système fermant la chambre et englobant la partie de l'axe qui sortira de la chambre pendant la translation. Une entrée et une sortie de fluide doivent être prévues avec un système d'étanchéité adéquate, pour remplir les chambres de culture et pour renouveler le milieu de culture au cours de l'expérience. Des systèmes d'amarrage doivent être conçus pour appliquer les déformations à la matrice de support. Enfin, la mise en place de la matrice de support dans les chambres de culture doit être aisée tout en préservant la stérilité du système.

Pour le système de renouvellement de fluide, le contrôle et la régulation du pH, de la pression partielle de dioxygène et de la température devront être possibles en gardant toujours le système stérile.

A partir de ces contraintes, nous avons proposé une forme simple de chambre de culture Figure II.7. Cette chambre de culture était composée de 4 pièces : un tube dont les extrémités étaient fermées par deux bouchons, celui du bas comprenant une ouverture pour la circulation du fluide et un mors plat pour tenir la matrice de support, celui du haut comprenant deux ouvertures pour la circulation du fluide et un trou permettant le passage de l'axe muni d'un mors plat devant transmettre les mouvements imposés.

Bien que cette forme de chambre de culture remplisse les contraintes du cahier des charges au niveau de la culture cellulaire et de la stimulation mécanique, elle s'avère peu pratique à assembler. En effet, elle nécessite de démonter complètement la chambre pour poser la matrice de support dans les mors. De ce fait, un opérateur unique ne suffit pas pour tenir la matrice de support, les pièces de la chambre, et les outils nécessaires à la fixation. De plus, la manipulation des pièces en contact direct avec la matrice de support augmente les risques de contamination. Cette solution a donc été abandonnée.

La partie centrale a été re-conçue afin de permettre un assemblage partiel de la chambre de culture avant la pose de la matrice de support. De plus, il était nécessaire que l'opérateur n'ait pas à tenir les pièces de la chambre afin d'avoir les mains libres pour

positionner la matrice de support à l'aide de pinces et de clefs stériles. Nous avons donc opté pour une forme parallélépipédique et non cylindrique dans laquelle nous avons usiné l'intérieur de la chambre Figure II.8. Une trappe a été aménagée afin d'atteindre la zone de la matrice de support sans démonter la chambre. Bien que l'usinage en soit plus compliqué, le principe de montage des chambres en est simplifié. De plus, la manipulation des pièces en contact avec le milieu de culture est limitée ce qui diminue les risques de contamination par rapport au système précédent.

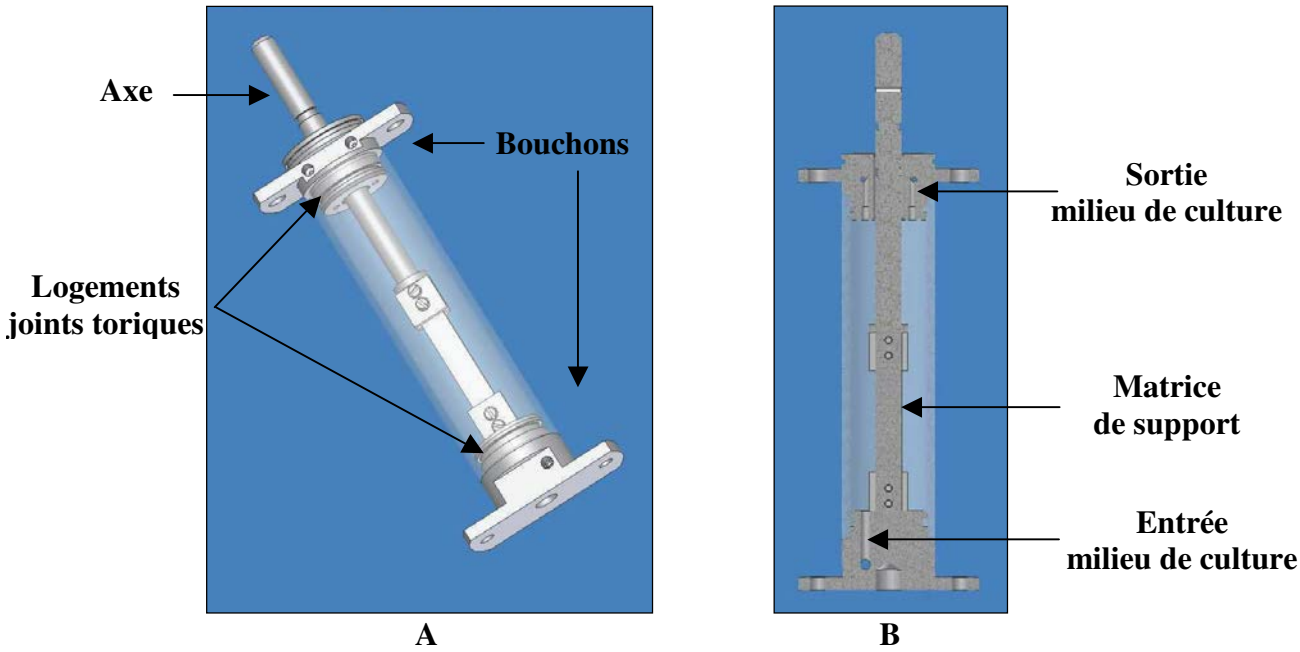


Figure II.7. Dessin de la chambre de culture
A : Vue d'ensemble avec matrice de support ; B : Vue en coupe

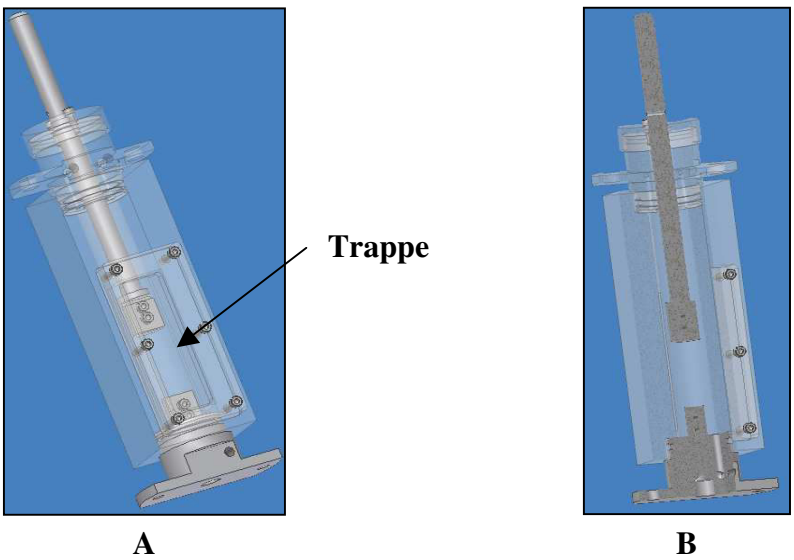


Figure II.8. Dessin de la nouvelle chambre
A : Vue d'ensemble ; B : Vue en coupe partielle

Le système de renouvellement de fluide a été conçu sous la forme d'une perfusion en utilisant une pompe péristaltique pour faire circuler le milieu entre le réservoir et les chambres de culture cellulaire. Pour des raisons d'encombrement, les contrôles du pH, de la température et de l'apport en O_2 sont effectués dans le réservoir. Afin de limiter les gradients de température entre les chambres de culture et le réservoir, l'ensemble du système est placé dans une enceinte chauffante régulée en température. Enfin, les gaz en contact avec le milieu de culture (même à travers un filtre) doivent être hydratés (plus de 60% d'humidité) pour permettre une culture cellulaire convenable.

La Figure II.9. présente un schéma de l'enceinte chauffante et de la perfusion.

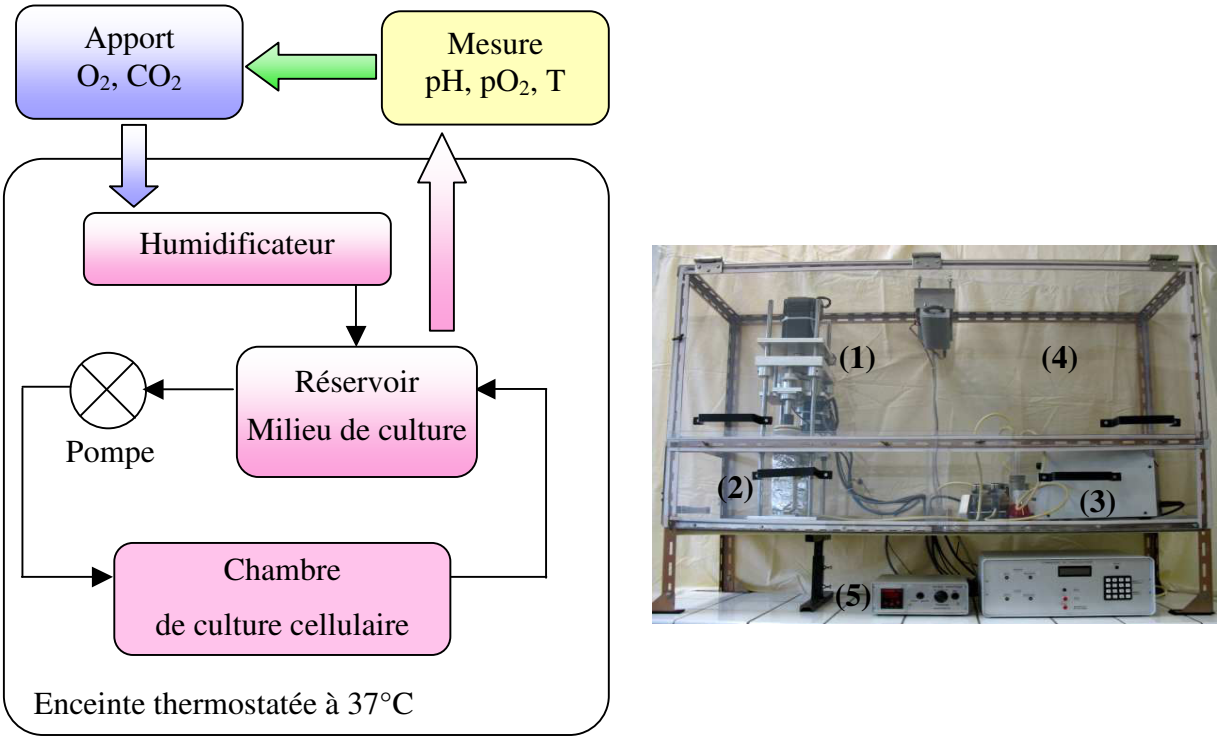


Figure II.9. Schéma de la perfusion et photographie de l'ensemble de système de culture
(1) partie mécanique ; (2) chambres de culture ; (3) pompe péristaltique ;
(4) enceinte chauffante ; (5) pupitre de commande et PID

II.2.3. CHOIX DES MATERIAUX

Le choix des matériaux a été guidé par les contraintes de stérilisation et d'observation. La stérilisation des pièces, directement ou indirectement en contact avec le milieu de culture, étant réalisée par autoclavage, des matériaux supportant une température de 121°C en milieu hydraté pendant une durée supérieure à 30min. sont nécessaires. Ainsi les pièces supportant des efforts et devant être autoclavées, comme le bouchon inférieur des chambres et l'axe de transmission des mouvements dans les chambres de culture, ont été fabriquées en acier

inoxydable 316L. Les autres pièces des chambres de culture ont été réalisées en polycarbonate.

Les pièces qui ne sont pas en contact avec le milieu de culture ont été réalisées en Duralumin® 2017A, afin de limiter les coûts de réalisation, à l'exception du système vis-écrou. La vis a été usinée en acier inoxydable et l'écrou en bronze pour diminuer les frottements et limiter l'utilisation de graisse.

Enfin, la perfusion a été réalisée à l'aide de vaisselle standard en verre et de tuyau Masterflex® (Cole-Palmer, IL, USA) pour les pompes péristaltiques.

II.3. VALIDATION

Le bioréacteur a été validé en plusieurs étapes. Nous avons d'abord réglé et vérifié la commande des moteurs, puis nous avons testé les chambres de culture et la perfusion de façon indépendante.

II.3.1. MATERIEL ET METHODES

II.3.1.1. Evaluation mécanique et thermique

Au niveau mécanique, nous avons vérifié, après réglage, que la commande est bien respectée, c'est-à-dire que le mouvement obtenu est bien celui demandé par l'opérateur tant en amplitude qu'en fréquence. Pour ce faire nous avons utilisé un capteur de position laser (LB-301, Keyence, Japon) pour la translation et nous avons conçu un capteur de rotation. Le capteur de rotation a été réalisé à l'aide d'un gradateur rotatif (max. 5,8kΩ), d'une batterie de 5V et d'une partie adaptable sur le bioréacteur (axe). La tension aux bornes de la sortie du gradateur et celle délivrée par le capteur de position laser ont été enregistrées sur une table traçante. L'amplitude et la fréquence de chaque mouvement ont alors été mesurées en fonction des différentes combinaisons possibles que l'opérateur peut imposer à chaque moteur. En effet, les deux moteurs sont indépendants en amplitude de mouvement. Les moteurs ont donc été testés indépendamment l'un de l'autre. Un étalonnage des capteurs a été réalisé avant les mesures sur le bioréacteur.

II.3.1.1.1. ETALONNAGE DES CAPTEURS

Le capteur de position laser a été étalonné en déplaçant manuellement le plateau translateur du bioréacteur, 10 positions ont été réalisées sur une plage de 10mm. Une distance de 10mm étant suffisante pour mesurer la translation maximale pouvant être réalisée par le bioréacteur. Cette série de mesures a été répétée deux fois (n=3). Une régression linéaire a

ensuite été effectuée pour obtenir la relation donnant la variation de tension (en V) en fonction du déplacement (en mm) (Figure II.10.). La pente calculée est de 0,0499Vmm^{-1} avec un coefficient de corrélation au carré de 0,999.

Quant au capteur de rotation, il a été étalonné à l'aide d'un pointeur laser, fixé sur le capteur rotatif, à une distance de 2m d'un mur sur lequel, nous avons mesuré la translation du pointeur pour remonter à l'estimation de l'angle. Ces mesures ont été réalisées pour des variations de 20° avec comme angles de référence : 0, 90, 180°. Des régressions linéaires ont permis d'exprimer la variation angulaire en fonction de la variation de la résistance du gradateur (Figure II.10.). Enfin, une moyenne des pentes a été effectuée. La pente moyenne calculée ainsi est de : 15,6±0,59Ω$^{\circ -1}$ (moyenne ± écart type) correspondant également à la régression linéaire des trois séries avec un coefficient de corrélation au carré supérieur à 0,99.

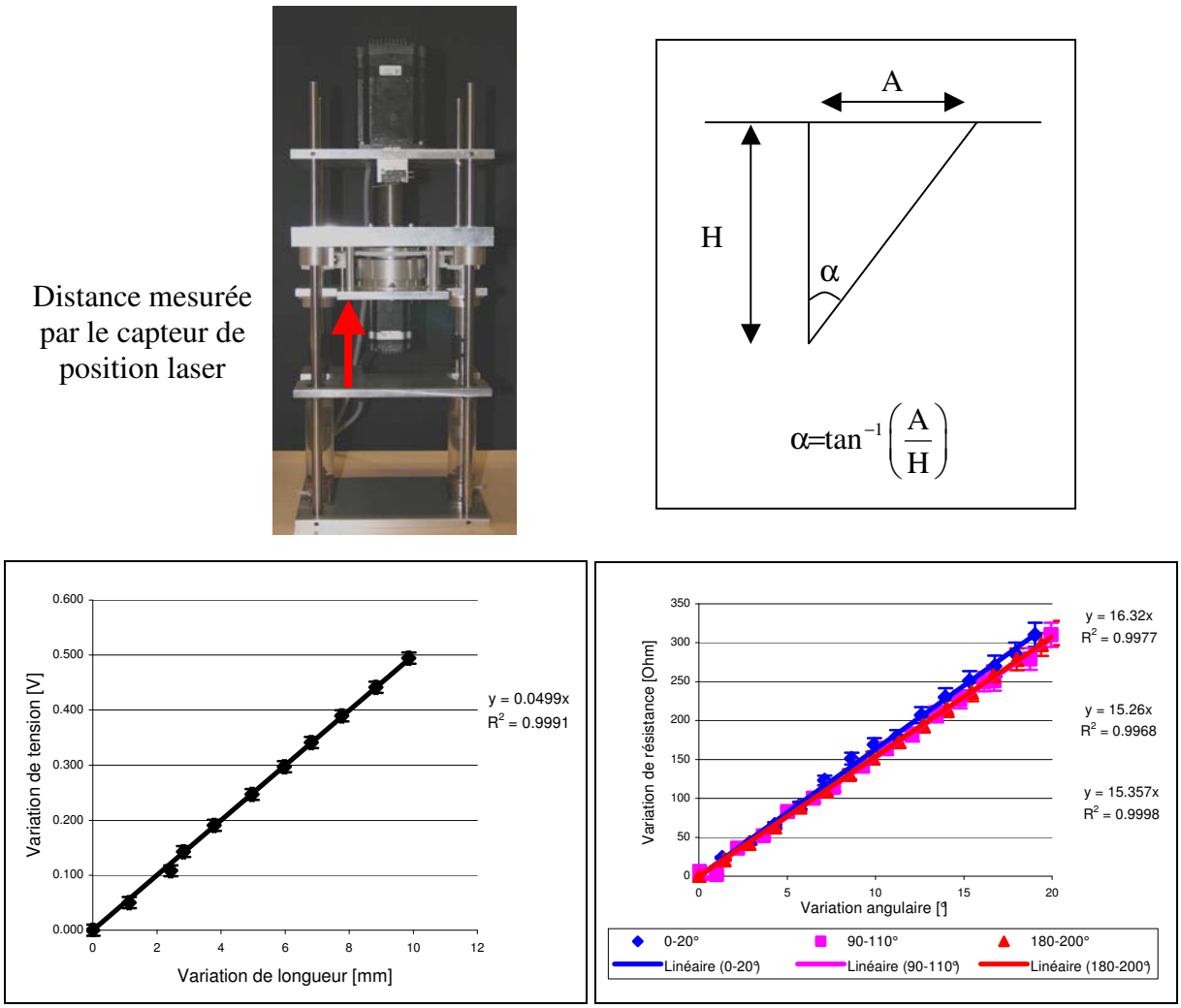


Figure II.10. Calibration des capteurs de position en translation et en rotation

II.3.1.1.2. MESURE DES PERFORMANCES DU BIOREACTEUR

Pour la translation, des amplitudes de 0 à 10mm, par pas de 1mm, ont été testées pour les fréquences de cycles de 1, 20, 40 et 60 cycles/min., l'amplitude de la rotation restant à 0°. De même, la rotation a été testée pour les amplitudes de 10, 20, 40, 60 et 90° aux mêmes fréquences que pour la translation, soit 1, 20, 40 et 60 cycles/min. avec une amplitude de translation maintenue à 0mm.

Par ailleurs, le contrôle de la stabilité de la régulation en température a été effectué sur une durée de 4 jours. Les températures du réservoir et de la pièce ont été mesurées en continu à l'aide de thermocouples reliés à un enregistreur.

II.3.1.2. Matrice de support utilisée

Afin de tester les chambres de culture et la perfusion, nous avons employé une matrice de support développée par notre équipe [VAQUETTE, 2008]. Cette matrice (Figure II.11.) se constitue d'une armature tricotée (Silver-reed ZK 270, Suzhou, Chine, Annexe 1) en fils de suture en soie noire 4-0 (Ethicon, NJ, USA) et d'une structure microfibrillaire de fibres alignées en PLCL à 15% (w/v de chloroforme/DMF 90 :10) déposées sur l'armature par electrospinning (à 1500tr/min. et 9 à 10kV, cf. Annexe 2). Les fils de suture ont un diamètre moyen de 200µm, et les fibres de PLCL un diamètre moyen de l'ordre de 1µm. L'ensemble de la structure faisant $40\times14\times0{,}6mm^3$ (L×l×h).

Les tests de biocompatibilité de cette matrice ont été réalisés par C. Vaquette lors d'une précédente étude [VAQUETTE, 2008]. Toutefois, pour notre étude, nous avons vérifié que les cellules vivaient et proliféraient sur cette matrice de support (cf. §II.3.1.5.).

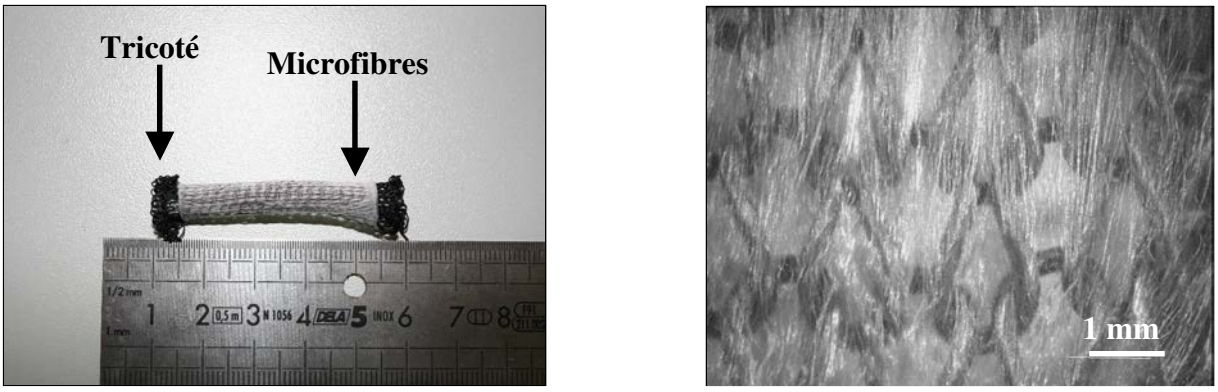


Figure II.11. Matrice de support utilisée pour l'évaluation du bioréacteur
Reproduite avec l'autorisation de C. Vaquette.

II.3.1.3. Culture cellulaire

Milieu de culture

- Dulbecco's modified Eagle's medium Nut Mix F12 (DMEM-F12), Gibco, France
- Sérum de veau 10% (v/v) décomplémenté à 56°C durant 30min., Gibco, France
- Pénicilline (50U.mL^{-1}) Gibco, France
- Streptomycine (50µg.mL^{-1}), Gibco, France
- Fungizone (2,5µg.mL^{-1} d'Amphotéricine B), Gibco, France
- L-glutamine (2mM), Gibco, France

L'ajout de sérum de veau fœtal (SVF) décomplémenté, de glutamine, d'antibiotiques et de fongicide au DMEM-F12 constitue ce qu'il est convenu d'appeler *le milieu de culture complet*.

Subculture cellulaire

La solution de trypsine à 0,025% (v/v de HBSS) et d'EDTA à 1% (Sigma-Aldrich, MO, USA) est utilisée pour détacher les cellules des supports de culture. Lorsque les cellules arrivent à confluence, le tapis cellulaire est rincé avec 5mL de tampon HBSS. Les cellules sont ensuite décollées par ajout de 1mL de trypsine-EDTA, pour 25cm^2 de surface cellulaire, durant 5min. à 37°C, et 5% de CO_2. L'action de la trypsine est inactivée par addition de 4mL de milieu complet. Une numération cellulaire est effectuée à l'aide d'une cellule de Thoma et de bleu de Trypan permettant de détecter les cellules mortes. Enfin, la suspension cellulaire est alors centrifugée à 300g pendant 5min. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans le milieu de culture afin d'obtenir une concentration de 10^5cellules/mL. La suspension cellulaire est fractionnée dans des flacons de culture de 25cm^2 (5mL/flacon).

Congélation

Les cellules décollées sont rincées, centrifugées 5min. à 300g et comptées à l'aide d'une cellule de Thoma et de bleu de Trypan. Le culot est repris dans le milieu de culture complet afin d'obtenir une concentration de 2.10^6cellules/mL. Une solution cryoconservatrice composée de 20% (v/v de DMEM/SVF 1:1) de diméthyl sulfoxyde (DMSO, Laboratoires Braun, France) est alors ajoutée goutte à goutte à la suspension cellulaire jusqu'à doubler son volume initial. Le mélange est alors fractionné dans des cryotubes à une densité cellulaire de 10^6cellules/cryotube. Enfin, les cryotubes sont congelés progressivement en les plaçant successivement 30min. à 4°C, puis 2h à -20°C, 12h à -80°C, et finalement transférés dans de l'azote liquide à -196°C.

Décongélation

Les cellules cryoconservées, à -196°C, sont décongelées dans un bain-marie à 37 °C, puis diluées immédiatement dans du milieu de culture complet. Elles sont ensuite rincées 2 fois avec ce même milieu, et centrifugées à 300g pendant 5min. après chaque rinçage, pour éliminer le DMSO qui est cytotoxique à 37°C.

Prélèvement et mise en culture des CSMM de rat

La culture des cellules souches mésenchymateuses médullaires et le prélèvement de la moelle ont été réalisés d'après la méthode décrite par Zhang et Pittenger *et al.*[PITTENGER *et al.*, 1999; ZHANG, 2008]. Le prélèvement cellulaire a été réalisé à partir de moelle osseuse provenant de rats Wistar, mâles, âgés de 6 semaines. Les rats ont été anesthésiés à l'aide de pentobarbital sodique (60mg/mL), par voie péritonéale, à une posologie de 0,1mL/100g de poids de l'animal. Les rats ont ensuite été sacrifiés par injection létale d'une solution de KCl à 10% (w/v), au niveau du cœur. Les pattes postérieures ont été stérilisées à l'éthanol à 75°. Le fémur, le tibia et le genou ont été isolés à l'aide de pinces et de ciseaux stériles. Les surfaces du fémur et du tibia ont été grattées à l'aide d'un scalpel et rincées 2 fois dans une solution de PBS. La tête de fémur et l'extrémité inférieure du tibia ont été sectionnées, puis leurs cavités médullaires ont été rincées, à l'aide d'une seringue, avec 5mL de milieu de culture DMEM-F12. Toutes les étapes de prélèvement ont été réalisées en environnement stérile.

Le mélange de moelle osseuse et du milieu de culture DMEM-F12 complet a été ensuite centrifugé à 600g pendant 10min. Après centrifugation, le surnageant et les matières solides flottantes (graisse) ont été prélevés. Les cellules ont été resuspendues dans 5mL de DMEM-F12 complet. Après un moment d'attente afin que les particules lourdes en suspension retombent, les cellules ont été ensemencées dans des flacons de cultures cellulaires de 25 cm^2 puis cultivées dans un incubateur à 37°C, et 5% de CO_2. Le milieu de culture a été changé au bout de 5 jours puis tous les 3 jours. Lorsque le tapis cellulaire atteignait la confluence, les cellules étaient subcultivées, ce qui représente un *passage*, noté *passage 1* (P1).

Des travaux antérieurs, de notre laboratoire [ZHANG, 2008], ont montré, chez le rat et l'humain, que de P3 à P6, les cellules cultivées sont bien des CSMM. Les cellules souches cultivées à P2 ont été congelées afin de les conserver pour être décongelées au fur et à mesure des besoins de nos expériences de façon à les utiliser au stade P4.

II.3.1.4. Prolifération cellulaire

Le test AlamarBlue® (AbD Serotec, CA, USA) a été choisi comme test de viabilité et de prolifération cellulaire. L'AlamarBlue® est un produit oxydo-réducteur dont l'état oxydé est bleu alors que l'état réduit est rouge. La présence d'organismes vivants réduit plus ou moins le produit, en fonction de la respiration, ce qui permet de suivre l'évolution du métabolisme de ces organismes en faisant des tests à intervalles réguliers. La proportion de molécules réduites est obtenue en mesurant l'absorbance à deux longueurs d'onde différentes, l'une à 570nm (molécules oxydées) et l'autre à 600 ou 630nm (molécules réduites). Afin d'éviter les risques de superposition des bandes des spectres d'absorbance, nous avons choisi de mesurer la réduction aux longueurs d'ondes les plus distantes (570nm et 630nm). La fraction de molécules réduites est obtenue à l'aide de la relation (II.2) donnée par le fournisseur.

$$\%_{red} = \frac{(\varepsilon_{ox}\lambda_{630} \times A_{570}) - (\varepsilon_{ox}\lambda_{570} \times A_{630})}{(\varepsilon_{red}\lambda_{570} \times A'_{630}) - (\varepsilon_{red}\lambda_{630} \times A'_{570})} \times 100 \qquad \textbf{(II.2.)}$$

avec,

$\varepsilon_{ox}\lambda_{570} = 80{,}586 \text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, coefficient d'extinction molaire de la molécule oxydée à 570 nm

$\varepsilon_{ox}\lambda_{630} = 34{,}798 \text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, coefficient d'extinction molaire de la molécule oxydée à 630 nm

$\varepsilon_{red}\lambda_{570} = 155{,}677 \text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, coefficient d'extinction molaire de la molécule réduite à 570 nm

$\varepsilon_{red}\lambda_{630} = 5{,}494 \text{Lmol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, coefficient d'extinction molaire 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 570nm et 630nm.

Contrairement au test MTT qui utilise le sel de tétrazolium, ce test est non destructif. Il permet de suivre les mêmes cellules durant toutes les étapes de l'expérience. Il est à noter que le test utilise le cycle de Krebs (respiration mitochondriale) pour évaluer la présence d'organisme. La prolifération cellulaire peut donc être évaluée à condition que les cellules ne changent pas de métabolisme au cours de l'expérience.

L'AlamarBlue® a été dilué dans du DMEM exempt de rouge de phénol à une concentration de 3% (v/v) selon la densité de cellules ensemencées. Pour s'assurer que les matrices de support ont bien été immergées dans le produit, 5mL de mélange, ont été utilisés pour chaque matrice de support. Elles ont ensuite été incubées à 37°C sous 5% de CO_2 durant 2h. Le milieu était prélevé et l'absorbance était mesurée à 570nm et 630nm à l'aide d'un spectro-photomètre (DU 640, Beckman Coulter Inc., CA, USA).

Des courbes-étalons ont été réalisées afin de corréler le pourcentage de réduction à la quantité de cellules (Figure II.12.). Pour ce faire, des CSMM de rat au stade P4 ont été ensemencées sur des plaques 6 puits aux densités cellulaires suivantes : 10 000, 50 000, 100 000, 300 000, 500 000, 750 000 et 1 000 000 cellules par puits (n = 3).

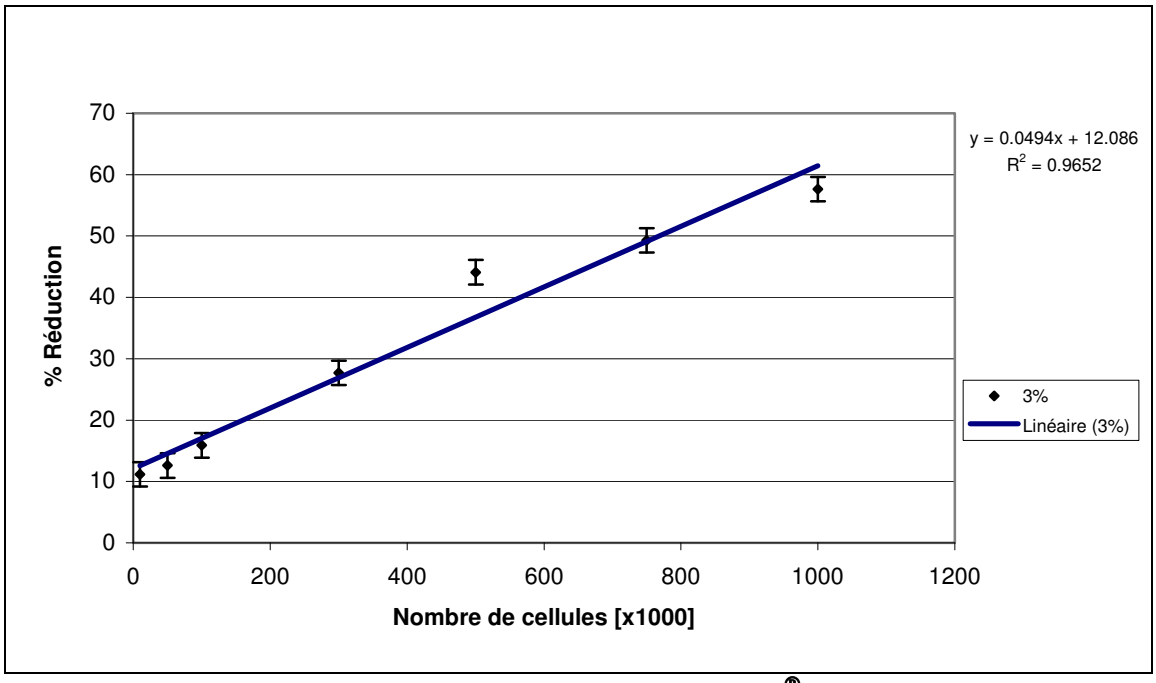


Figure II.12. Courbe étalon d'AlamarBlue® à 3% (v/v)
Valable pour des tests d'AlamarBlue® à 3% (v/v) avec 5mL de réactif incubés pendant 2h à 37°C et 5% CO2

II.3.1.5. Viabilité et prolifération des CSMM sur la matrice de support

En étude préliminaire, nous avons élaboré une procédure d'ensemencement puis nous avons vérifié la viabilité et la prolifération des CSMM sur la matrice de support (travail déjà commencé par C. Vaquette).

Stérilisation et ensemencement des matrices de support

Les matrices de support sont stérilisées par immersion complète dans de l'alcool à 75° pendant 30min. puis rincées à l'eau distillée stérile. Les matrices de support ont ensuite été séchées et exposées au rayonnement UV d'une lampe germicide à 254nm pendant 30min.

Après stérilisation, les matrices de support ont été placées, à l'aide d'une pince stérile, dans des puits, également stériles, spécialement conçus pour l'ensemencement par sédimentation de ces matrices de support (Figure II.13.), afin d'assurer que les cellules soient bien ensemencées sur les matrices et non sur le fond du puits. Les cellules ont été resuspendues dans du milieu de culture complet afin d'obtenir la densité cellulaire souhaitée.

200µL de cette suspension ont ensuite été répandus sur chaque matrice de support quelle que soit la quantité de cellules ensemencées. Puis les matrices de support ont été placées dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO_2, durant 2h. Au bout des 2h, du milieu de culture complet a été ajouté goutte à goutte dans chaque puits afin de ne pas « décrocher » les cellules. Les puits ont ensuite été replacés dans l'incubateur pendant 12h. Les matrices de support étaient finalement transférées dans des flacons de 25cm^2 avec 10mL de milieu de culture complet pour être cultivées dans l'incubateur à 37°C sous 5% de CO_2, ou bien montées dans les chambres de culture.

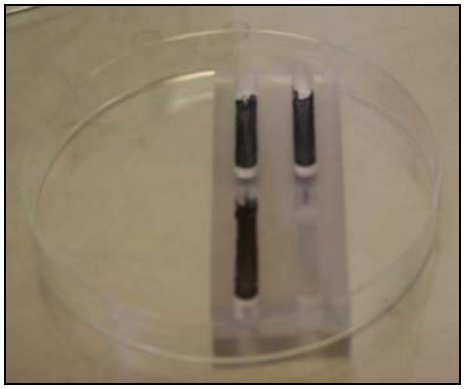


Figure II.13. Photographie des puits d'ensemencement des matrices de support

Pour évaluer les chambres de culture et la perfusion, nous avons procédé par étape. Nous avons tout d'abord vérifié que la procédure de montage des chambres ne conduisait pas à une contamination, puis, nous avons testé la culture avec la perfusion sans sollicitation mécanique.

Pour toutes les expériences, nous avons ensemencé des CSMM de rat à passage 4 sur les matrices de support stérilisées à une densité de 150 000 cellules par matrice, selon la procédure d'ensemencement décrite ci-dessus.

Viabilité et prolifération des CSMM sur la matrice de support

La vérification de la viabilité et la prolifération cellulaire sur les matrices de support ont été réalisées sur deux échantillons ensemencés de 150 000 cellules suivis pendant 10 semaines. Le suivi consistait en un test d'AlamarBlue® à J0, J2, J7 puis tous les 7 jours jusqu'à J70. Au bout de 10 semaines, les noyaux des cellules sur les matrices de support ont été marqués à l'acridine orange, après avoir fixé les cellules, puis visualisés par microscopie confocale à balayage laser afin de visualiser le « tapis » cellulaire.

Fixation des cellules et marquage des noyaux

Les cellules sur les matrices de support à J7 ont été fixées par une solution à 4% (w/v de PBS) de paraformaldéhyde (PAF, Sigma-Aldrich, MO, USA). Le PAF se dissout en milieu basique (vers pH 10) en ajoutant quelques gouttes de soude sous agitation jusqu'à l'obtention d'une solution limpide. La solution est ensuite neutralisée (pH 7-7,2) par une solution d'acide chlorhydrique. Pour fixer les cellules, les matrices de support ont été rincées 3 fois au PBS à température ambiante durant 5min. pour chaque rinçage. Les matrices de support ont ensuite été immergées dans une solution de PAF à 4% (w/v) pendant 15min.

Les noyaux des cellules ont ensuite été marqués à l'aide d'acridine orange dilué à 1:3 (v/v) dans la solution de PAF pendant 15min. Les matrices de support ont ensuite été visualisées au microscope confocal à balayage laser.

II.3.1.6. Evaluation des chambres de culture et perfusion

Evaluation des chambres de culture

L'évaluation des chambres de culture a été réalisée en comparant la culture de matrices ensemencées de CSMM dans l'incubateur avec la culture de celles dans les chambres de culture sans stimulation mécanique pendant 7 jours (n = 3), les matrices de support restant dans l'incubateur servant de contrôle positif. Le milieu de culture était changé tous les 3 jours et le pH était mesuré à chaque étape.

Un test AlamarBlue® a été réalisé à J0 et J7 avec une concentration de 3% (v/v).

Evaluation de l'ensemble chambres de culture-perfusion

De même, pour évaluer l'ensemble chambres de culture-perfusion, nous avons comparé les matrices de support cultivées dans l'incubateur et celles cultivées dans le bioréacteur sans stimulation mécanique. La pompe péristaltique de la perfusion a été réglée à un débit de 1.5mL/min. L'apport en gaz a été réalisé à l'aide d'une bouteille de gaz prémélangés à 5% de CO_2 et 95% d'air. Ce mélange gazeux a été filtré à 22µm, puis humidifié dans un humidificateur contenant de l'eau distillée stérile, avant d'arriver dans le réservoir du milieu de culture.

Le milieu de culture des matrices de support cultivées dans l'incubateur a été renouvelé tous les 3 jours. Le milieu de culture contenu dans le réservoir des chambres de culture a été renouvelé tous les 3 jours représentant le tiers du milieu de culture total (50mL). Lors du changement de milieu, le pH a été mesuré.

Viabilité et prolifération cellulaire

Un test AlamarBlue® a été réalisé à J0 et J70 selon le protocole décrit précédemment (cf. §II.3.1.5.).

Le test d'AlamarBlue®, à J7, a été complété par une observation au microscope confocal à balayage laser (Leica SP2-MP2, Leica, Allemagne) des noyaux cellulaires, par un marquage à l'acridine orange, après avoir fixé les cellules sur les matrices de support (cf. §II.3.1.5.). Les cellules sur chaque matrice ont été observées aux niveaux des fils de soie et de la membrane de fibres en PLCL à 15%. Une estimation de la densité cellulaire a été obtenue, pour les fils de soie et la membrane en PLCL, en mesurant le volume total de noyau pour chaque partie à l'aide de Matlab 7.0 et des options de la *Toolbox Image Processing* (MathWorks Inc., USA). Ce volume a ensuite été rapporté à un volume moyen du noyau estimé pour les CSMM à une sphère de 5µm de diamètre. Une estimation de la densité cellulaire en a été déduite et comparée à celle obtenue par le test AlamarBlue®.

II.3.1.7. Evaluation du principe de culture sous stimulation cyclique

L'évaluation de la culture sous stimulation mécanique cyclique a été réalisée en comparant des matrices de support ensemencées, cultivées de façon statique dans l'incubateur à des matrices de support ensemencées, puis cultivées dans le bioréacteur sous stimulation cyclique de traction torsion avec un allongement de 10% en translation, une torsion de 90° en rotation, à une fréquence de 1Hz pendant 4h par jour durant 7 jours (n = 3).

Un test AlamarBlue® a été réalisé à J0 et J7 en ajoutant 5mL d'une solution d'AlamarBlue® à 3% (v/v) pendant 2h dans un incubateur à 37°C sous 5% de CO_2. La procédure restant la même que précédemment (cf. §II.3.1.4.).

Les protéines de collagènes I et III ont été observées au microscope confocal à balayage laser à J7 après marquage par immunofluorescence. Pour cela, les cellules sur les matrices de support ont été fixées et perméabilisées à J7. Les matrices de support ont ensuite été coupées en deux et les collagènes I et III ont été marqués. Les intensités moyennes de fluorescence ont été mesurées.

Fixation et perméabilisation des cellules

La fixation des cellules sur les matrices de support a été réalisée comme précédemment en rinçant les matrices de support 3 fois au PBS à température ambiante puis en les immergeant pendant 15min. dans du PAF à 4% (w/v).

Les matrices de support ont ensuite été rincées 3 fois au PBS pendant 5min. à chaque rinçage. Puis elles ont été immergées dans une solution de Triton X100 (Sigma-Aldrich, MO, USA) dilué à 0,2% (v/v) dans du PBS pendant 15min. et rincées à nouveau 3 fois avec du PBS et conservées dans du PBS à 4°C quelques jours jusqu'au marquage par immunofluorescence indirecte.

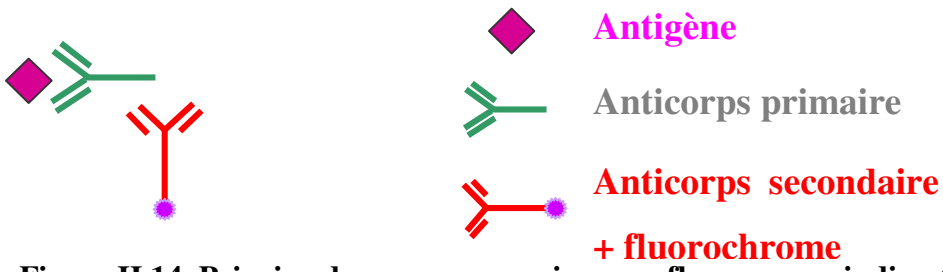


Figure II.14. Principe du marquage en immunofluorescence indirect

Marquage immunofluorescent indirect des collagènes I et III

Les anticorps utilisés, pour marquer les collagènes I et III de rat, provenant tous les deux de souris, nous avons dû couper chaque matrice en deux afin de marquer une seule protéine sur chaque morceau.

Avant de marquer les protéines, il est nécessaire de bloquer les sites non spécifiques pour que les anticorps ne marquent pas ses sites en plus des protéines désirées. Pour cela, chaque morceau de matrice de support a été immergé, pendant 15min, dans une solution d'albumine de sérum de bovin (BSA, Sigma-Aldrich, MO, USA) à 5% (w/v de PBS) puis rincé 3 fois avec du PBS.

Les anticorps anti-collagènes I ou III, dits primaires, (souris monoclonaux anti-collagènes I et III de rat, Abcam, UK) ont été ajoutés à une concentration de 1:200 dans une solution de BSA à 5% (w/v de PBS) et placés à 4°C pendant 12h.

Le lendemain, les matrices de support ont été rincées 3 fois au PBS. L'anticorps secondaire, Alexa Fluor® 633 (anticorps mouton anti-souris IgG, Invitrogen, CA, USA), a été ajouté, à l'abri de la lumière, à une concentration de 1:200 dans une solution de BSA à 5% (w/v de PBS) pendant 1h à température ambiante.

Finalement, les matrices de support ont été observées au microscope confocal à balayage laser.

II.3.1.8. Tests statistiques

Un test de Student-Fisher a été réalisé pour déterminer les différences significatives entre les moyennes des mesures ($p<0,05$).

II.3.2. RESULTATS

II.3.2.1. Performances mécanique et thermique.

La translation et la rotation ont été testées aux fréquences de 1, 20, 40 et 60 cycles/min. pour les consignes suivantes :

- Déplacement de 0 à 10mm, par pas de 1mm, pour la translation
- Déplacement angulaire de 10, 20, 40, 60 et 90° pour la rotation.

Les fréquences mesurées en fonction de la consigne, pour les moteurs de translation et de rotation, sont respectivement présentées dans les tableaux Tableau II.3 et Tableau II.4. Si la consigne en fréquence est suivie par le moteur de rotation en acceptant une erreur de 1%, elle ne l'est pas, pour toutes les amplitudes, par le moteur de translation au-delà de 20cycles/min, mais l'erreur reste inférieure à 5%. D'autre part, des vibrations et des grincements sont générés, dus aux accélérations imposées.

Tableau II.3. Fréquences mesurées en fonction de la consigne : moteur de translation

		Fréquence de consigne [cycles/min]			
		1	**20**	**40**	**60**
Amplitude de consigne [mm]	**1**	1,0	20,0	39,7	59,6
	2	1,0	19,9	39,9	59,5
	3	1,0	19,9	40,0	59,7
	4	1,0	19,9	39,9	59,8
	5	1,0	19,9	39,6	58,8
	6	1,0	19,8	39,7	58,0
	7	1,0	19,8	39,5	58,6
	8	1,0	19,9	39,6	58,6
	9	1,0	19,9	38,7	58,0
	10	1,0	19,9	38,6	58,4

L'amplitude mesurée en translation suit la consigne avec une précision constante de 0,15mm, et celle de la rotation est respectée avec un écart à la consigne inférieur à la précision du capteur soit moins de 6°. Si l'amplitude est assez bien respectée, l'origine des cycles varie au cours du temps de 0,1mm en translation et est estimé à moins de 1° en rotation. Cette variation est due à la détection des débuts de cycles. En effet, des interrupteurs servent de capteur de position, or la position, où le contact est enclenché, n'est pas constante.

Tableau II.4. Fréquence mesurée en fonction de la consigne : moteur de rotation

		Fréquence de consigne [cycles/min]			
		1	**20**	**40**	**60**
Amplitude de consigne [°]	**10**	1,0	20,0	39,5	59,4
	20	1,0	19,6	38,8	59,8
	40	1,0	19,5	39,7	59,6
	60	1,0	19,8	39,7	59,6
	90	1,0	19,7	39,5	59,3

La régulation en température a été validée en vérifiant sur 4 jours la stabilité de la température du milieu dans le réservoir ainsi que celle de la pièce contenant l'enceinte chauffante. La Figure II.15. présente les températures, en fonction du temps, pour le réservoir placé dans l'enceinte chauffante et celle de la pièce dans laquelle se trouvait l'enceinte chauffante. Sur cette période, la température moyenne dans le réservoir était de 36,9±0,3°C et celle de la pièce de 17,5±1,3°C (moyenne±écart type).

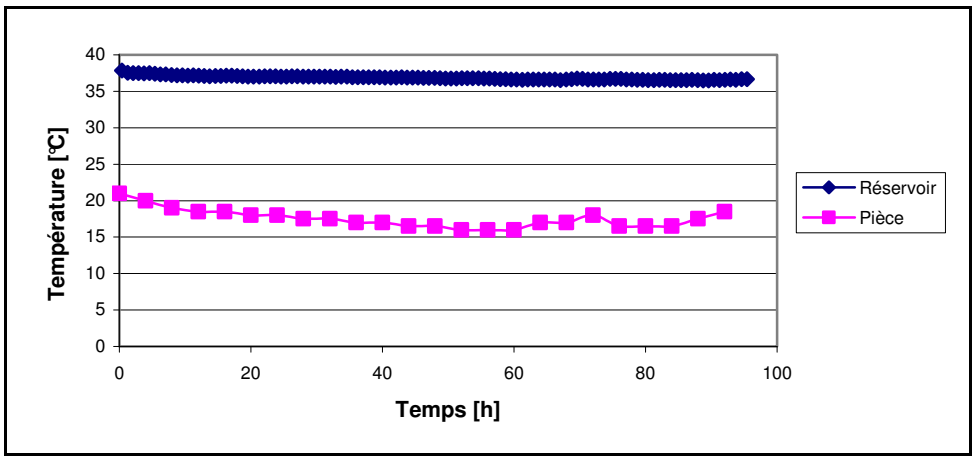


Figure II.15. Comparaison des températures du réservoir et de la pièce

II.3.2.2. Viabilité et prolifération des CSMM sur la matrice de support.

La vérification de la viabilité et de la prolifération des CSMM sur la matrice de support a été réalisée par un ensemencement de 150 000 CSMM sur deux matrices de support avec un suivi par tests d'AlamarBlue® à intervalles réguliers sur 10 semaines et une visualisation des noyaux des cellules sur les matrices de support en fin d'expérience.

Nous avons observé une augmentation régulière, plus ou moins prononcée au cours de l'expérience, du métabolisme cellulaire (Figure II.16.) allant de 20% à J0 à 68% à J70. Il a été évalué à l'aide de la courbe étalon d'AlamarBlue® qu'il y avait environ $1{,}1\times10^{6}$ cellules sur les matrices de support à J70. L'observation des noyaux des cellules se trouvant sur les

matrices de support en fin d'expérience a montré une densité cellulaire importante sous forme de « tapis » cellulaire régulier sur une épaisseur d'environ 33µm (Figure II.17.). Les noyaux oblongs présentent une direction privilégiée longitudinale (verticale sur la photographie) parallèles à la direction privilégiée des microfibres de la membrane da la matrice de support.

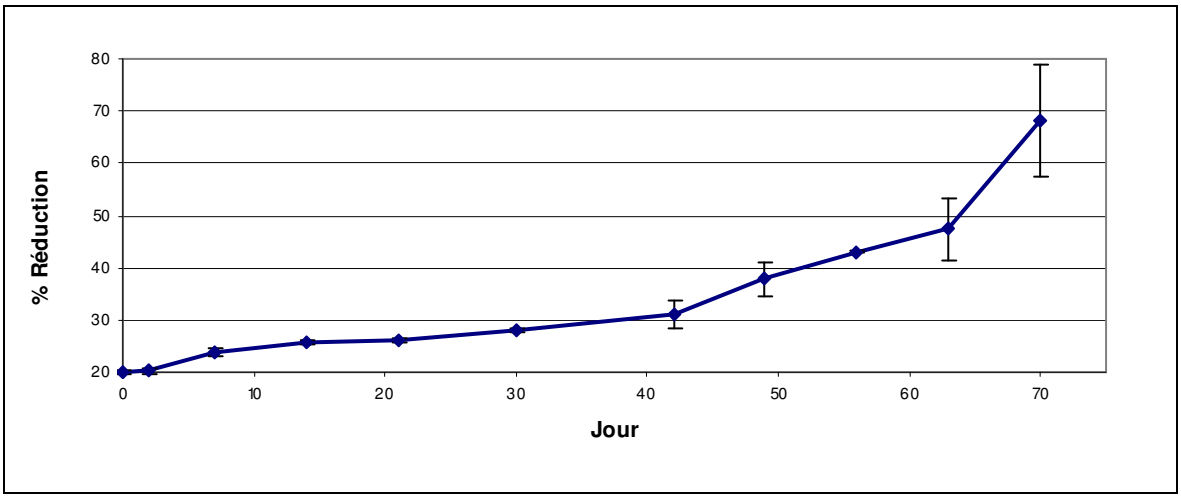


Figure II.16. Evolution du métabolisme des cellules sur les matrices de support

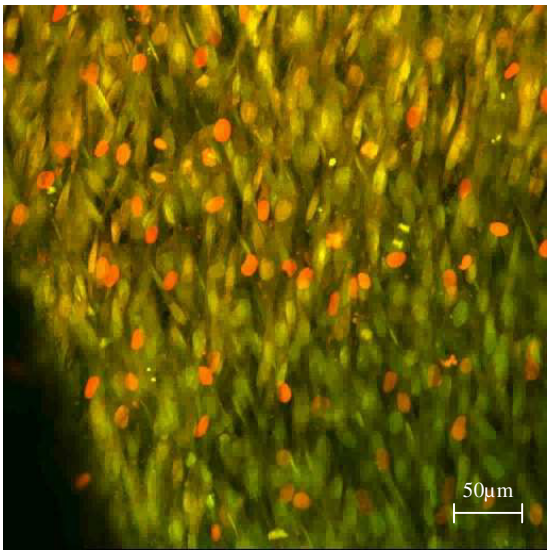


Figure II.17. Image des noyaux de cellules sur la matrice de support à J70
Image de microscopie confocale (×40).
Vert : marquage de l'ADN nucléaire, Rouge : marquage de l'ARN nucléaire

II.3.2.3. Evaluation des chambres de culture et perfusion.

L'évaluation des chambres de culture et de la perfusion a été réalisée par des tests d'AlamarBlue® à J0 et J7 (n = 3). Les résultats de ces tests ont été comparés (Figure II.18.) à ceux obtenus pour un groupe de matrices ensemencées de façon similaire et cultivées en

incubateur à 37°C sous 5% de CO_2 (n = 9). De plus, pour le groupe de culture avec perfusion, le test d'AlamarBlue® a été complété par une évaluation de la densité cellulaire par analyse d'images de microscope confocal après marquage des noyaux cellulaires (Tableau II.5. et Figure II.18.). Par ailleurs, le pH du milieu de culture a été mesuré à chaque changement, partiel ou complet, du milieu de culture (Tableau II.5.). Lors de ces expériences, aucune contamination n'a été détectée.

Tableau II.5. Résultats d'évaluation de prolifération et du pH

		Contrôle (n = 9)	Bioréacteur statique sans perfusion (n = 3)	Bioréacteur statique avec perfusion (n = 3)
pH		7,3±0,1	8,5±0,3	7,5±0,1
% Réduction AlamarBlue®	**J0**	18,1±2,1	18,1±0,6	19,3±2,3
	J7	20,9±2,5	16,8±1,2	20,3±2,7
Densité cellulaire à J7 [cell./mm²]	**AlamarBlue®**	353,8	–	338,5
	Microscope confocal	329,3	–	275,6

II.3.2.4. Evaluation du principe de culture sous stimulation cyclique.

L'effet de la stimulation mécanique a été testé en appliquant une translation cyclique de 3mm et une rotation simultanée de 90° à une fréquence de 1Hz pendant 4h par jour durant une semaine, et comparé à des matrices de support cultivées en incubateur à 37°C sous 5% de CO_2. Comme précédemment, le milieu de culture dans le réservoir a été changé tous les 3 jours. Les effets étudiés ont été la prolifération cellulaire estimée par test AlamarBlue® à J0 et à J7 (Figure II.18.), et la sécrétion de collagènes I et III par traitement d'images de microscopie confocale après marquage indirect des collagènes I et III (Figure II.19.).

La quantité cellulaire après une semaine de stimulation mécanique a significativement diminué par rapport au contrôle mais également par rapport à la quantité cellulaire initiale. L'intensité moyenne de fluorescence des essais montre une quantité constante de collagène I et une augmentation statistiquement significative par rapport au contrôle du collagène III. Ainsi, le rapport de collagène III sur I augmente sous l'effet de la stimulation cyclique choisie (3mm 90° 1Hz, 4h/j) et vaut respectivement 0,71±0,05 pour le groupe de contrôle et 0,91±0,15 pour celui stimulé mécaniquement.

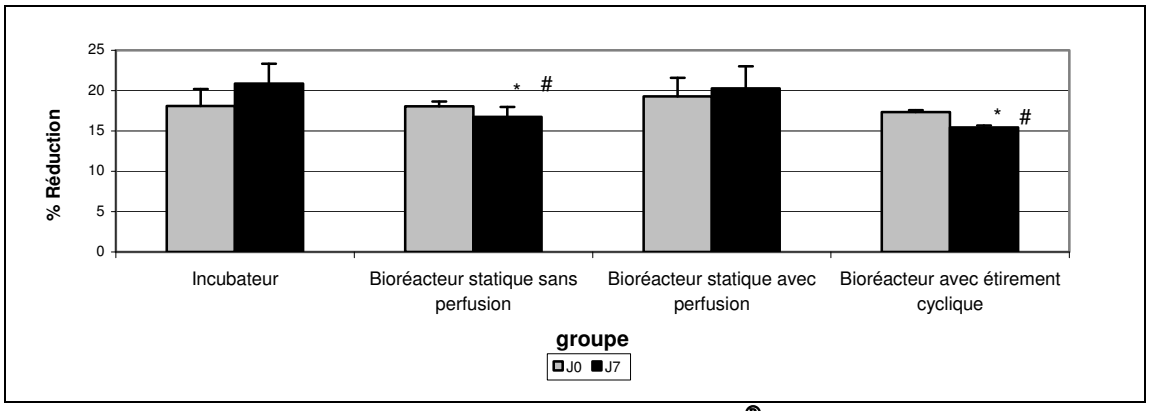


Figure II.18. Tests AlamarBlue® à J0 et J7
Contrôle (n = 9) ; autres groupes (n = 3)
* différence statistique par rapport au contrôle
# différence statistique par rapport au groupe bioréacteur statique avec perfusion

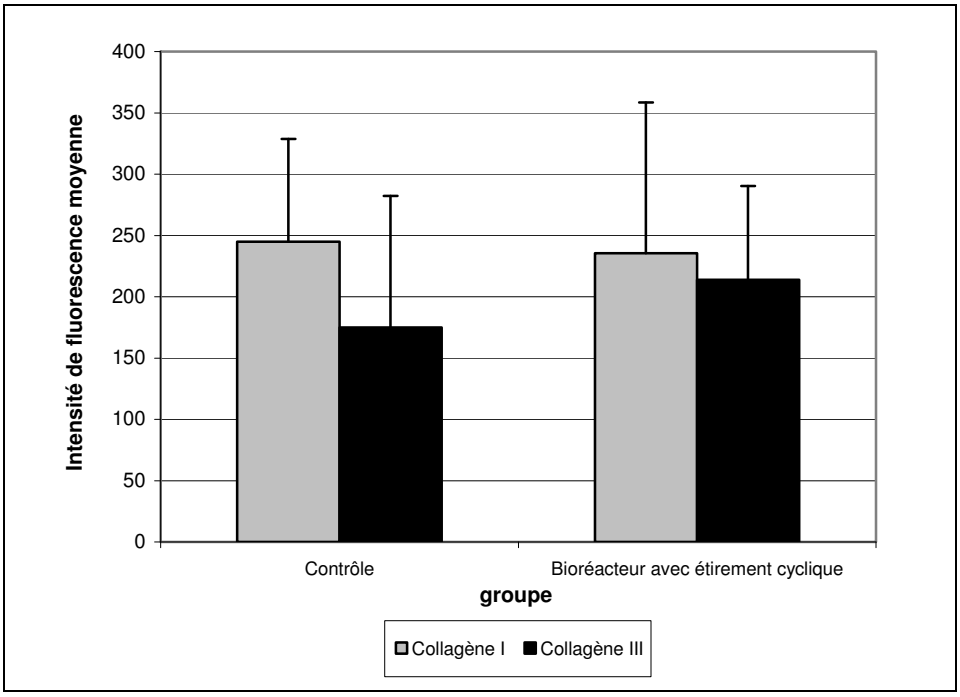


Figure II.19. Comparaison des intensités de fluorescence des collagènes I et III

II.4. DISCUSSION

II.4.1. ASPECT MECANIQUE

D'un point de vue mécanique, le système produit le mouvement souhaité, et permet l'application d'efforts suffisants aux sollicitations désirées. Au niveau de la commande, le bioréacteur ne remplit les conditions du cahier des charges que jusqu'à 20cycles/min. pour toutes les amplitudes en translation, mais uniquement jusqu'à 4mm d'amplitude en translation pour toutes les fréquences. En revanche, la rotation ne présente aucun problème. Ceci permet de tester les matrices de support jusqu'à 10% de déformation axiale, de 0 à 90° en torsion et

de 0 à 1Hz en fréquence. Au-delà de ces plages de fonctionnement, les contraintes ne peuvent être respectées pour des difficultés de choix de pas du moteur et d'accélérations imposées, toutefois les résultats obtenus restent acceptables. La programmation du pilotage des moteurs pas à pas imposait une consigne en un ou deux échelons en montée et en un échelon à l'arrêt. Ainsi, la mise en mouvement et les changements de sens se sont révélés contraignants aux fortes amplitudes de mouvements. De plus, cette solution, nécessite une détection de la position de début de cycle par des capteurs, ici des interrupteurs qui créent une variation sur l'étirement de la matrice de support.

Les possibilités étaient soit de demander à l'opérateur de changer le pas du moteur de la translation, ce qui ne réglait pas le problème des capteurs, soit de choisir une carte de pilotage des moteurs qui puisse calculer des rampes d'accélération et de décélération et d'enregistrer une position initiale servant de référence absolue. La deuxième solution a été retenue et est en cours de réalisation (carte de pilotage, Cortex Controller Ltd., UK). Les améliorations attendues sont :

- une diminution des bruits produits par le bioréacteur
- une augmentation de la durée de vie de cette machine
- une meilleure maîtrise de l'élongation imposée.

De plus, le pas de la vis, transformant le mouvement de rotation du moteur en translation, a été augmenté, passant de 2mm à 5mm. Ceci permet de réduire le nombre de tours nécessaires pour obtenir une translation de 10mm. Enfin, dans l'avenir, ce système vis-écrou peut être remplacé par un système de vis à billes précontraint qui donne les mêmes possibilités tout en réduisant les jeux.

D'autre part, une carte d'acquisition (PCI-9221, Adlink, Taiwan) a également été acquise pour permettre différentes évolutions du bioréacteur. Cette carte doit permettre d'enregistrer dans un premier temps la température et le pH dans le réservoir du bioréacteur pendant l'expérience à l'aide d'un thermocouple et d'une sonde pH autocavables. Elle permettra aussi de développer un logiciel qui gèrera les périodes de sollicitations mécaniques sur plusieurs jours. De plus, il a été prévu suffisamment d'entrée/sortie (16 entrées et 2 sorties) pour répondre aux évolutions futures du système, comme par exemple :

- gérer une régulation du pH en contrôlant l'électrovanne d'une bouteille de CO_2.
- contrôler la régulation en température et de l'hygrométrie de l'enceinte chauffante.
- enregistrer l'évolution de l'effort à l'extrémité des matrices de support pendant l'expérience, etc.

II.4.2. ASPECT CULTURE CELLULAIRE

Du point de vue de la culture cellulaire, nous avons tout d'abord montré que la matrice de support permettait bien la culture cellulaire sur une longue période (>2 mois). Il est à noter que la structure de la membrane en microfibre permet un alignement privilégié dans la direction longitudinale comme dans les tendons et les ligaments. Par contre, la durée de doublement de population est de l'ordre de 20 jours (entre 18 et 33 jours) ce qui est plus du double que dans des flacons de culture (4 à 7 jours). Nous avons ainsi montré que la matrice de support, bien que ralentissant la prolifération cellulaire, ne crée pas de biais sur les résultats expérimentaux à condition de comparer la culture dans le bioréacteur et dans un incubateur traditionnel sur le même type de support.

Au niveau du bioréacteur, la régulation en température est suffisante puisque, malgré des variations de température de la pièce d'environ 3°C sur quatre jours, la température dans le réservoir est restée entre 36,3 et 37,5°C avec une moyenne à 36,9°C.

La culture dans le bioréacteur, sur une semaine, n'ayant présenté ni contamination bactérienne, ni contamination fongique, nous pouvons en déduire que les chambres de culture restent stériles et que la procédure de montage, que nous avons mise au point ici, préserve la stérilité des matériels expérimentaux lors de l'assemblage du système de culture.

Par contre, la maîtrise de la stabilité du pH n'est pas suffisante. En effet, un pH de 7,5 est un peu trop basique pour des cultures cellulaires, bien qu'aucune différence statistique ne soit observée entre le groupe cultivé dans l'incubateur, et celui cultivé dans le bioréacteur avec perfusion mais sans stimulation mécanique, que ce soit avec le test AlamarBlue® ou par estimation de la densité cellulaire. Toutefois, la comparaison entre le groupe des cellules cultivées dans le bioréacteur sans perfusion et celui avec perfusion montre que l'apport de gaz est bénéfique à la culture cellulaire sans pour autant être optimal comme le montre le graphique de la Figure II.18. En effet, un ralentissement de la prolifération cellulaire semble exister entre le groupe de contrôle dans l'incubateur et celui dans le bioréacteur avec perfusion. Ces observations seraient à confirmer en augmentant le nombre d'essais et en mesurant la quantité d'ADN. Quoi qu'il en soit, un pH compris entre 7 et 7,4 serait préférable. La valeur du pH mesurée peut provenir d'une diminution de la pression partielle de CO_2 dans le réservoir par rapport à la bouteille de gaz. En effet, pour des raisons de sécurité, le réservoir permet l'échappement des gaz vers l'extérieur, un filtre 22µm assurant la stérilité en cas de dépression du réservoir par rapport à l'extérieur. D'autre part, la nécessité d'un apport permanent de gaz augmente les coûts de fonctionnement du bioréacteur. Un système fermé, étanche, englobant uniquement les réservoirs avec un apport en gaz pré-mélangé pourrait être

envisagé, voire une régulation du pH avec un apport unique de CO_2 dans le système. Ceci nécessiterait en plus du pH-mètre, une sonde de CO_2 afin de vérifier la pression partielle de ce gaz dans l'enceinte (le pH évoluant moins vite que la pression partielle). Ce système aurait comme avantage de pouvoir être chauffant et de n'avoir que cette partie à humidifier et non toute l'enceinte chauffante pour assurer les 60% d'humidité de l'atmosphère dans les réservoirs de milieu de culture. De plus, plus petite, elle pourrait être portative et permettrait de garder à température les réservoirs aux moments de l'assemblage et du démontage des chambres de culture (Figure II.20.). Une deuxième partie chauffante pourrait être prévue autour des chambres de culture, en atmosphère relativement sèche, ainsi un plus petit volume serait à chauffer et les risques de corrosion s'en trouveraient réduits.

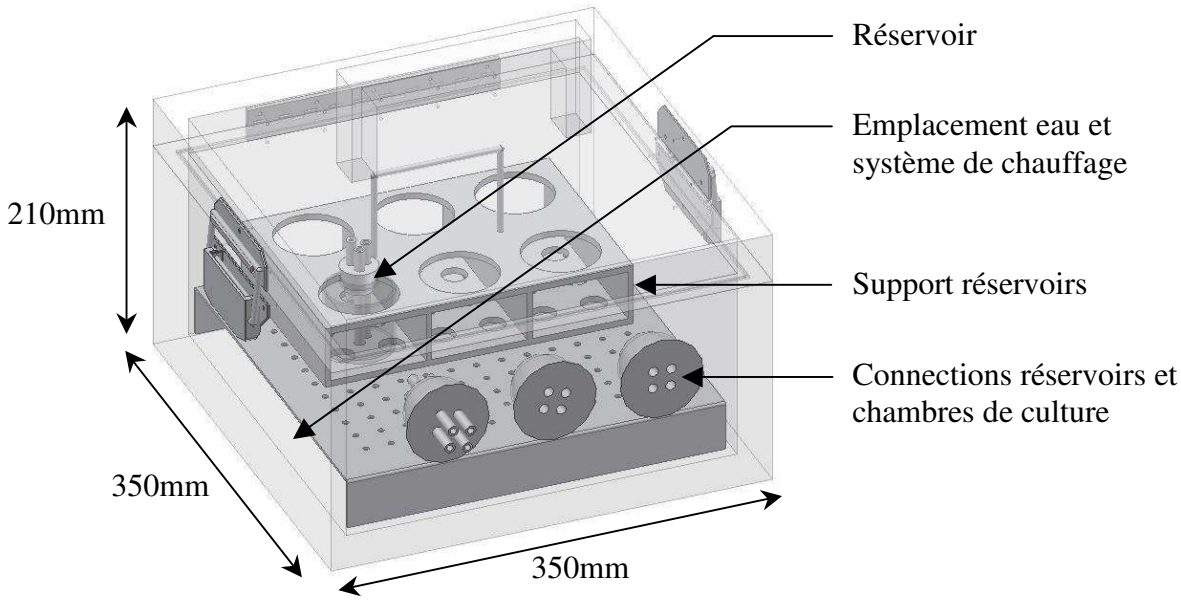


Figure II.20. Dessin tridimensionnel de l'enceinte ou incubateur chauffant et portatif

Enfin, les chambres de culture ont été adaptées petit à petit, il en résulte une forme qui peut être simplifiée. En effet, l'entrée et la sortie du milieu de culture ont été prévues au départ dans les bouchons haut et bas lorsque le corps principal des chambres se présentait sous forme d'un tube. Ce tube était d'une part, difficile à percer, et d'autre part, il était impossible d'y adapter les embouts « luer » nécessaires à la jonction avec le système de perfusion. Avec le nouveau modèle de chambre de culture, il est maintenant possible de prévoir cette fonction dans le bloc en polycarbonate de chaque chambre de culture. De plus, il était prévu dans la partie supérieure deux sorties de fluide, or pendant les essais nous n'avons jamais observé de fonctionnement simultané des deux sorties. Nous pouvons ainsi prévoir une entrée et une sortie par chambre de culture. Ainsi, le bouchon supérieur n'aurait plus d'autre

utilité que d'assurer l'étanchéité du système qui peut être intégré directement dans la partie haute du corps principal des chambres de culture comme le propose la Figure II.21.

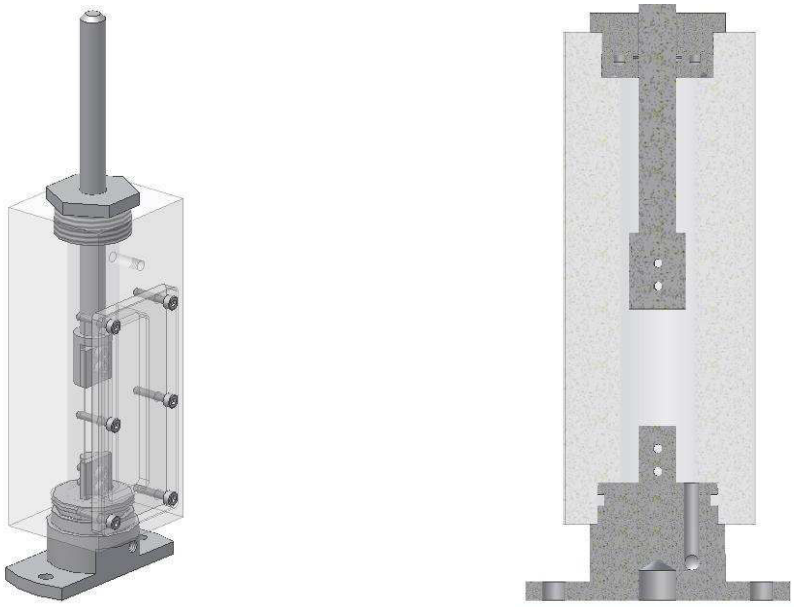


Figure II.21. Chambre de culture simplifiée en perspective et en coupe

II.4.3. CULTURE CELLULAIRE SOUS SOLLICITATION MECANIQUE CYCLIQUE

Pour évaluer la culture cellulaire sous sollicitation mécanique cyclique, nous avons choisi une translation de 3mm correspondant à une déformation longitudinale de 10% et d'une torsion de 90° à une fréquence de 1Hz pendant 4h par jour durant 7 jours. La stimulation mécanique n'a pas été imposée en continu pour éviter une possible apoptose des cellules comme le rapportent certaines études [SKUTEK *et al.*, 2003; ZHANG *et al.*, 2008b]. En effet, Skutek *et al.* ont montré qu'après 15min. de stimulation cyclique (5% d'étirement à 1Hz) le nombre de cellules en apoptose est plus élevé qu'en l'absence de stimulation et qu'après 1h le nombre de cellules en apoptose revenait à un niveau comparable à celui du contrôle. En revanche, d'autres études montrent au contraire que la stimulation mécanique augmente la prolifération cellulaire [BERRY *et al.*, 2003; YANG *et al.*, 2004].

Malgré cette précaution, les matrices de support présentent une diminution de la population cellulaire à J7 par rapport à J0 (Figure II.18.). Cette diminution de la population cellulaire pourrait provenir d'une période trop courte entre l'ensemencement cellulaire et la mise sous sollicitation mécanique (24h). En effet, pour les études présentant une augmentation de la population cellulaire, et non une diminution, une culture des cellules ensemencées était réalisée entre 36h et 5 jours selon l'étude avant de commencer les sollicitations mécaniques. Or, durant notre étude, les matrices de support étaient stimulées

mécaniquement 24h après ensemencement. Zhang *et al.* ont observé également une diminution de la population cellulaire dès 3h d'étirement (10% à 1Hz) avec une pré-culture de 24h [ZHANG *et al.*, 2008b]. En tenant compte de ces observations, le nombre de cellules peut diminuer pour un problème d'apoptose mais aussi du fait d'une mauvaise adhésion cellulaire. Les cellules sont ensemencées sur une membrane faite de fibres d'environ 1µm de diamètre. Il n'est pas impossible que les cellules aient moins de points focaux d'adhésion et de ce fait adhèrent moins bien. Ainsi, lorsqu'elles sont mises sous sollicitations mécaniques, il n'est pas impossible qu'une partie des cellules se détache de la matrice de support en plus de l'augmentation du nombre de cellules en apoptose.

Des études supplémentaires, au cours desquelles les matrices de support ensemencées sont cultivées pendant 3 jours avant d'être stimulées mécaniquement, sont en cours de réalisation pour confirmer cette observation. De plus, une étude utilisant des matrices de support dont la membrane microfibrillaire serait plus dense pourrait peut-être confirmer cette hypothèse.

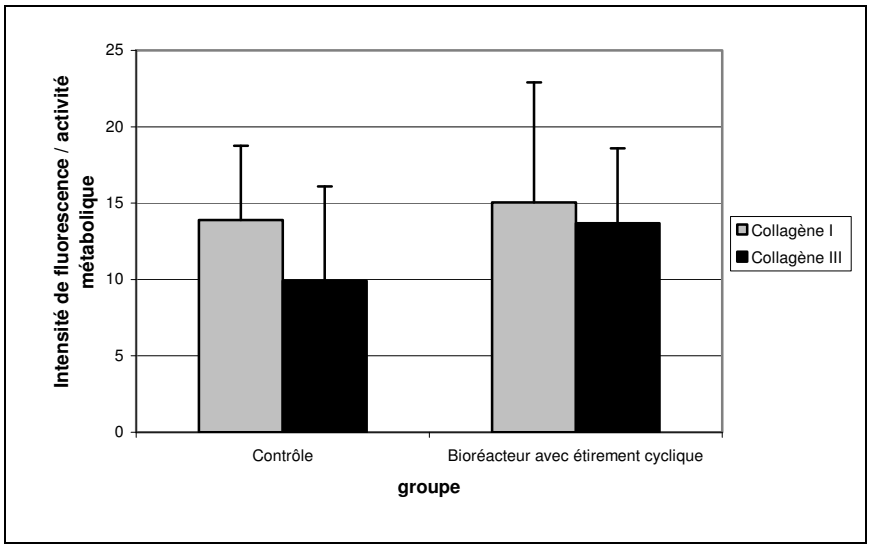


Figure II.22. Comparaison des intensités de fluorescences normées des collagènes I et III

L'étude des protéines de collagènes I et III montre une nette stimulation de la sécrétion de collagène III sous l'effet des sollicitations mécaniques. Par contre, dans le cas du collagène I, peu de différences sont visibles entre le groupe de contrôle et celui stimulé mécaniquement (Figure II.19.). Toutefois, en tenant compte de la diminution du nombre de cellules pour le groupe stimulé et la prolifération cellulaire pour le groupe de contrôle, la quantité estimée de protéines de collagène I par cellule est supérieure pour le groupe stimulé mécaniquement par rapport au contrôle (Figure II.22.). Ainsi, la stimulation mécanique de traction-torsion cyclique augmente la sécrétion des protéines de collagènes I et III. Cette observation a été

également rapportée lors d'études comparables [ALTMAN *et al.*, 2002a] ou d'études sous stimulation d'étirement cyclique [KIM *et al.*, 2002; ZHANG *et al.*, 2008a].

Enfin, notre travail montre que le rapport de la quantité de collagène III sur celle de collagène I a également augmenté passant de 0,71±0,05 pour le groupe de contrôle à 0,91±0,15 pour le groupe stimulé mécaniquement. Le rapport de collagène III/I pour le groupe de contrôle est toutefois plus élevé en comparaison avec le rapport établi (0,45±0,05) lors d'une étude réalisée sur support en silicone au laboratoire par Mme Zhang [ZHANG, 2008]. Nous pouvons donc émettre l'hypothèse que la structure fibrillaire de la matrice de support a une influence sur la sécrétion de collagène III. Une étude identique à la nôtre, mais sur un support en film de silicone, permettrait de vérifier notre hypothèse.

Par ailleurs, la valeur du rapport en collagène III/I du groupe de contrôle dans notre étude est également plus élevée de celle observée par Amiel *et al.* pour des fibroblastes ligamentaires du genou chez l'humain (0,55±0,06, [AMIEL *et al.*, 1984]). Ceci montrerait que nos résultats sont trop élevés et ne permettrait pas l'obtention des caractéristiques du tissu souhaité au niveau de la matrice extracellulaire. Il est difficile de se prononcer sur les causes de tels résultats (matrice de support, conditions de culture…) et de l'effet sur la matrice extracellulaire finale. En effet, actuellement, l'influence de la forme du support sur la différenciation cellulaire est encore assez mal connue et le rapport de collagène III/I des fibroblastes ligamentaires cultivés sans sollicitation mécanique est établi vers 0,55 alors que ce même rapport au niveau de la matrice extracellulaire de ligament n'est que de 0,1. A notre connaissance, seuls Moreau *et al.* ont étudié dernièrement [MOREAU *et al.*, 2008] les taux de collagènes de CSMM, cultivées *in vitro,* sur une matrice de support fibrillaire [HORAN *et al.*, 2006]. Ces auteurs ont observé un rapport de collagènes III/I de 0,21±0,07 pour le groupe statique, résultat plus proche que celui obtenu dans le cas des fibroblastes de peau (0,26±0,15, [CHEN *et al.*, 2004]). Il est à noter que si la matrice de support est également fibrillaire, la taille des fibres est différente. En effet, leur matrice de support utilise des fibres de soie torsadées de 38±5,6µm de diamètre. Ces fibres sont beaucoup plus grosses que les fibres de collagènes dont le diamètre varie entre quelques dizaines et quelques centaines de nanomètres. Par contre, la matrice de support en fibre de PLCL élaborée au sein de notre laboratoire est plus proche de la structure collagénique de fibres alignées préférentiellement dans le sens longitudinal et dont le diamètre est de 2,6±0,3µm [VAQUETTE, 2008]. Ces différences entre un support en silicone et des matrices fibrillaires suggèrent une influence du substrat sur la sécrétion cellulaire, et qu'un substrat de fibres alignées induit un comportement

fibroblastique ligamentaire. Ceci est conforté par les observations d'une étude comparative de la réponse de CSMM et de fibroblastes de LCA cultivés *in vitro* sur une matrice fibrillaire de l'ordre de 10µm de diamètre durant une semaine, menée par Liu *et al.* [LIU *et al.*, 2008a]. Cette étude portait sur les ARNm de collagène I et III et non sur les protéines, mais elle met en évidence que les CSMM transcrivent plus de collagène III sur un support fibrillaire (ARNm de collagène III/I = 0,48±0,2) au bout d'une semaine et que les fibroblastes de LCA transcrivent une proportion proche de ceux rapportés par Amiel *et al.* (ARNm de collagène III/I = 0,67±0,16). Ces observations bien qu'encourageantes méritent d'être vérifiées au niveau de la traduction en protéine, les résultats sur les protéines de collagène I et III de l'étude rapportée par Liu *et al.* ne permettant pas de déterminer le rapport relatif de collagènes. Ainsi, une comparaison du rapport de collagènes obtenu lors de notre étude pour le groupe mécaniquement stimulé au rapport de collagène III/I de fibroblastes ligamentaires sur le même support permettrait de confirmer les hypothèses sur l'influence du support ainsi que de vérifier la validation de la matrice de support développée au sein de notre équipe.

Enfin, nos résultats sont à confirmer à l'aide d'une technique plus précise que la fluorescence en microscopie confocale. Nous n'avons actuellement pas encore réalisé ces tests pour des contraintes techniques. En effet, nous avons rencontré des difficultés à collecter les protéines des cellules par les méthodes habituelles de décollement de cellules et lyse puis centrifugation afin de réaliser des analyses par Westernblot, ELISA, ou RIA. Les cellules ensemencées sur la matrice de support tridimensionnelle sont difficilement récupérées après traitement par de la trypsine. Des analyses quantitatives sur lame après coupe histologique sont en cours de réalisation afin de vérifier les résultats obtenus.

II.5. CONCLUSION

Au niveau mécanique, le bioréacteur a été validé. Bien qu'il existe encore un léger écart entre la consigne et la fréquence des cycles pour les valeurs élevées de translation, notre bioréacteur correspond au cahier des charges initial. Notons toutefois qu'une automatisation est nécessaire pour assurer une bonne reproductibilité des essais. Sachant que les études à venir devront être menées sur plusieurs semaines avec des périodes de sollicitations mécaniques et des périodes de repos, il est nécessaire d'automatiser le début et la fin des périodes de sollicitations mécaniques ainsi que l'apport de gaz. Ainsi, nous avons d'ores et déjà entrepris cette automatisation pour une journée et il est prévu de pouvoir choisir jusqu'à une semaine, à l'aide de la carte d'acquisition et de la carte de pilotage.

En ce qui concerne la culture cellulaire, bien que le système actuel mérite quelques améliorations, la culture des cellules dans notre bioréacteur sans sollicitation mécanique est assez comparable à celle obtenue dans un incubateur régulé en température et en CO_2, respectivement à 37°C et 5% de CO_2. Parmi les améliorations prévues dans le futur, citons certains asservissements des paramètres internes du bioréacteur comme ceux de :

- la température
- le pH du milieu de culture
- les pressions partielles en O_2 et CO_2
- l'hygrométrie.

Dans cet objectif, nous proposons une solution intégrant la régulation de tous ces paramètres à l'aide d'un système fermé hermétiquement au niveau des réservoirs (Figure II.20.). Une étude approfondie de cette solution en fonction des contraintes d'assemblage sous hotte mérite d'être menée. Le prototype que nous proposons présente l'avantage d'être portatif et donc pourrait permettre dans l'avenir de maintenir la température et l'hygrométrie de l'environnement des chambres de culture pendant leur assemblage dans le cas d'un bioréacteur à 6 chambres ou plus.

La validation du bioréacteur est donc en grande partie acquise bien que quelques points faibles aient été identifiés. Les résultats que nous avons obtenus pour la culture sous sollicitation mécanique montrent que la sécrétion protéique est stimulée par ces sollicitations. Toutefois, étant donné le petit nombre d'essais rapportés dans la littérature et compte-tenu de la diversité des supports de culture utilisés, l'ensemble de ces résultats ne constitue pas une population statistiquement représentative, et aucune conclusion fiable ne peut encore aujourd'hui être tirée. Comme nous l'avons évoqué plus haut, il serait intéressant dans un premier temps de comparer ces résultats avec des CSMM aux réponses de fibroblastes ligamentaires. Des études plus longues -environ 4 semaines- permettraient d'observer une matrice extracellulaire, et de quantifier les proportions de collagène III/I des fibres hétérotypiques de la matrice extracellulaire formées et les comparer aux fibres de collagènes des ligaments natifs du genou.

Chapitre III :
MODELE THERMODYNAMIQUE DU COMPORTEMENT DES TENDONS D'ACHILLE DE LAPIN

III.1. ETUDE EXPERIMENTALE

III.1.1. MATERIELS ET METHODES

L'étude expérimentale a été réalisée sur des tendons d'Achille de lapins blancs (femelle) de Nouvelle-Zélande de 4±0,57kg (Cégav, France).

III.1.1.1. Prélèvement des tendons

Les lapins ont été anesthésiés puis euthanasiées par injection intraveineuse de pentobarbital sodique (30mg/kg, suivi d'une injection létale). Les pattes antérieures étaient ensuite rasées au niveau du tendon d'Achille, et la peau était incisée à l'aide d'un scalpel. Le tendon était alors isolé des diverses membranes conjonctives l'entourant à l'exception du paratendon. Un point de suture en U perforant les 3 faisceaux du tendon d'Achille était pratiqué suivi d'une ligature fermée par deux nœuds plats réalisés le plus haut possible sur le tendon d'Achille avant la jonction musculaire. Les tendons ont été alors prélevés en coupant une partie du muscle du mollet (Triceps sural) au niveau de l'insertion tendon-muscle et en sectionnant le calcanéum au niveau de l'insertion osseuse du tendon. La partie musculaire était éliminée par pelage (grattage du muscle à l'aide de la lame du scalpel sans couper les membranes l'entourant). Enfin, les tendons ont été conservés dans des tubes de 50mL contenant du tampon PBS, à température ambiante, afin de les préserver de toute déshydratation en attendant leur utilisation dans les 4 heures suivant le prélèvement.



Figure III.1. Tendon d'Achille prélevé sur un lapin
A : jonction tendon-muscle ; B : os calcanéum sectionné

III.1.1.2. Montage du dispositif

Les essais ont été réalisés à l'aide d'une machine de traction Adamel Lhomargy DY.22 (MTS, MN, USA), munie d'un capteur de 5kN, et équipée d'un bain salin construit par

notre laboratoire (A. Gérard) et thermostaté, à 37°C à l'aide d'un bain-marie et d'un échangeur de chaleur (Figure III.2.). Chaque tendon était placé dans le système d'amarrage de la machine de traction : un mors cylindrique conçu pour couler l'insertion osseuse des tendons d'Achille dans un ciment orthopédique (Palacos®R, Heraeus, Allemagne) et un mors auto-serrant pour la partie musculaire préalablement placée entre deux morceaux de papier de verre.

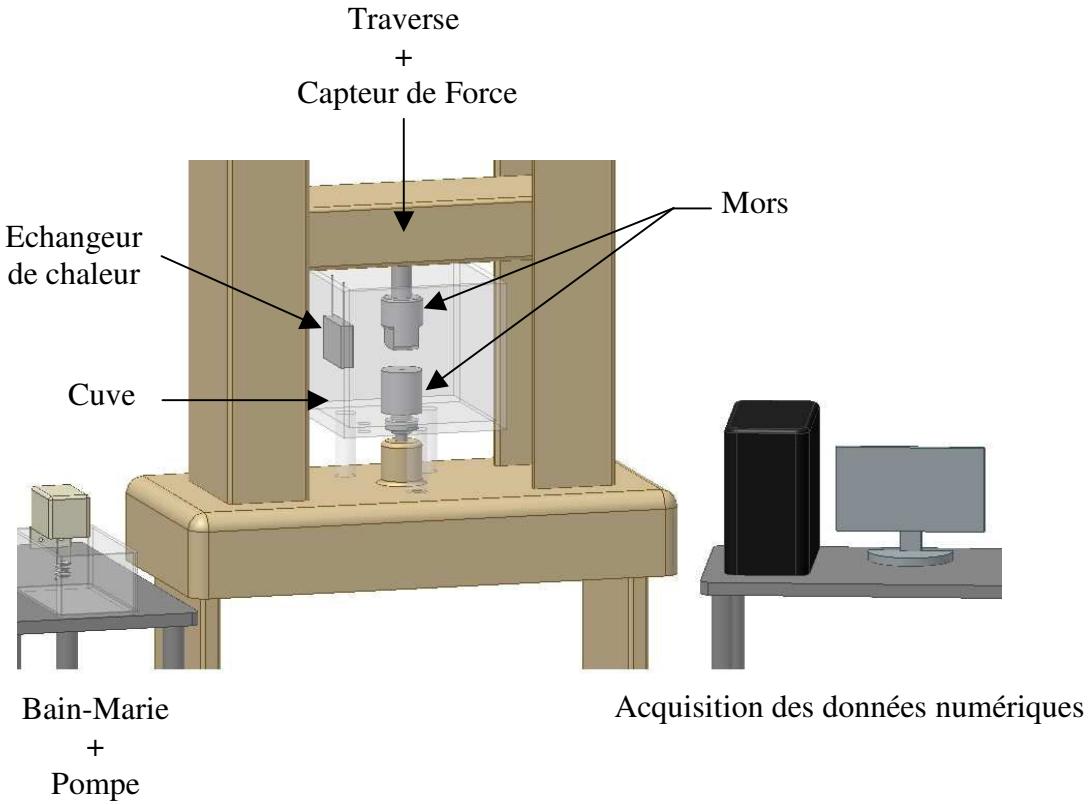


Figure III.2. Schéma du dispositif expérimental

Avant chaque campagne d'essais, le capteur de force était remis à zéro et le tendon était étiré à raison de 1mm/min. jusqu'à obtenir une force de 1N. La cuve est alors remplie d'eau saline (NaCl) à 0,9% (w/v) entre 30 et 35°C. Le système est laissé au repos jusqu'à obtenir l'équilibre thermique, à 37±0,5°C, et salin, soit environ 60min. L'élongation du tendon est ensuite ajustée afin d'obtenir 1N à l'équilibre (longueur équivalente à la longueur *in vivo* d'une patte au repos).

Nous estimons alors, la section moyenne du tendon en calculant la moyenne de la section en trois endroits (basse, moyenne et haute). Les dimensions de chaque section sont mesurées dans deux directions orthogonales et la morphologie de chaque section est considérée elliptique (Figure III.3.) conformément à la relation (III.1.), [HASHEMI *et al.*, 2005]). Enfin, la longueur initiale entre mors est systématiquement mesurée.

$$A_0 = \pi R_1 R_2 \qquad \textbf{(III.1.)}$$

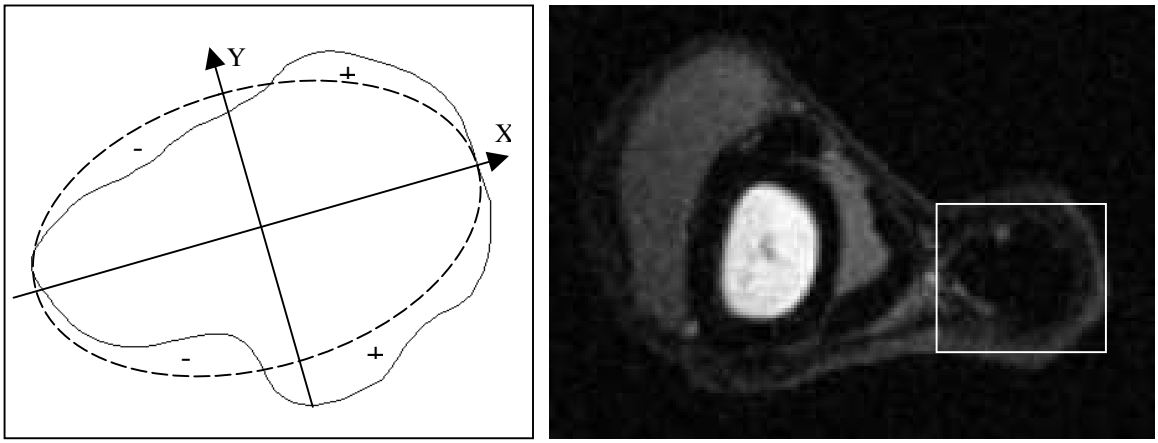


Figure III.3. Approximation de la section du tendon d'Achille obtenue par IRM
A droite, cliché IRM de la section d'une patte antérieure de lapin, le cadre blanc délimite la zone du tendon d'Achille. A gauche, contour du tendon d'Achille (ligne continue) obtenu à partir du cliché IRM et ellipse approximant la section. Les surfaces à l'intérieurs et à l'extérieurs de l'ellipse moyenne se compensent.

III.1.1.3. Sollicitations mécaniques imposées

Pour toutes les sollicitations mécaniques, le temps, le déplacement de la traverse et la force ont été enregistrés par ordinateur toutes les 50ms, à l'exception des essais de relaxation où la force a été enregistrée toutes les 50ms durant les 200 premières secondes puis toutes les 30s jusqu'à arrêt de l'essai.

Traction simple

Les essais de traction simple ont été réalisés à vitesse de traverse constante de sorte que la vitesse d'élongation initiale soit de $0{,}02s^{-1}$, en charge jusqu'à une élongation λ de 1,1.

Des cycles de charge et décharge ont été appliqués à vitesse d'élongation initiale $\dot{\lambda}$ de $0{,}02s^{-1}$, en chargeant successivement jusqu'aux élongations suivantes : $\lambda =$ 1,02 ; 1,05 ; 1,09 puis jusqu'à 1,10 en déchargeant à chaque fois jusqu'à annulation de la force.

Relaxation

Les essais de relaxation ont été effectués en imposant d'abord une sollicitation de traction simple, à vitesse d'élongation initiale de $0{,}02s^{-1}$, suivie d'un maintien à élongation constante. L'essai de relaxation était arrêté lorsque l'état de relaxation était considéré comme atteint, c'est-à-dire, lorsque la variation de force était inférieure à 0,5N durant 60min. Ainsi, des tests de relaxation ont été réalisés successivement aux élongations suivantes : 1,02 ; 1,04 ;

1,06 ; 1,08 suivi d'un étirement jusqu'à 1,10 puis d'une décharge complète (force nulle), suivi enfin d'un essai de relaxation.

Cycles de fatigue et de fluage dynamique

Les essais de fatigue ont été réalisés à vitesse d'élongation initiale de $0{,}02s^{-1}$ en alternant, durant 2000s, des cycles de charge jusqu'à obtenir une élongation de 1,04 et de décharge jusqu'à obtenir l'annulation de la force.

Les essais de fluage dynamique ont été réalisés en appliquant des cycles de traction simple, à vitesse d'élongation initiale de $0{,}02s^{-1}$, en charge jusqu'à obtenir en force l'équivalent du poids de l'animal (≈40N) et en décharge jusqu'à annulation de la force, durant 400s.

III.1.2. RESULTATS EXPERIMENTAUX

La traction simple des tendons d'Achille, chez le lapin, présente la forme caractéristique des tractions simples de tendons et ligaments sans endommagement (cf. §I.3.1.) : une augmentation progressive du module d'élasticité du tendon (Figure III.4.).

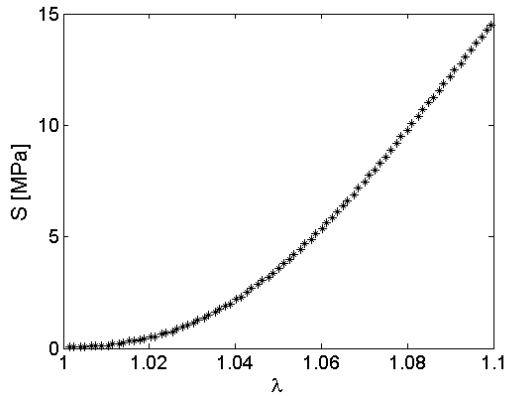


Figure III.4. Réponse typique en traction simple à vitesse d'élongation constante

Elongation λ en fonction de la contrainte de Piola-Kirchhoff S.

Vitesse de traverse appliquée tels que $\dot{\lambda} = 0{,}02s^{-1}$

Les cycles de charge et de décharge mettent en évidence la sensibilité de ces tissus à l'histoire du chargement (boucles d'hystérésis). De plus, il est à noter que lors de la décharge, le module tangent décroît rapidement jusqu'à une valeur comparable au module tangent initial (Figure III.5.).

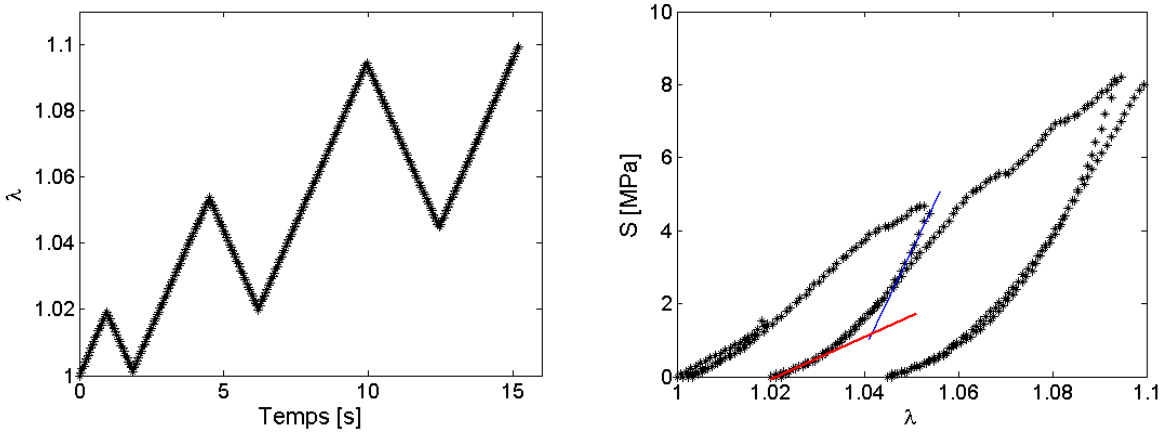


Figure III.5. Cycles de charge et de décharge à vitesse d'élongation constante

A gauche : chargement imposé en élongation en fonction du temps. A droite : réponse correspondante en contrainte du tendon au chargement appliqué. En bleu, module tangent en début de décharge ; en rouge, module tangent en fin de décharge et en début de chargement suivant. $|\dot{\lambda}| = 0,02\text{s}^{-1}$

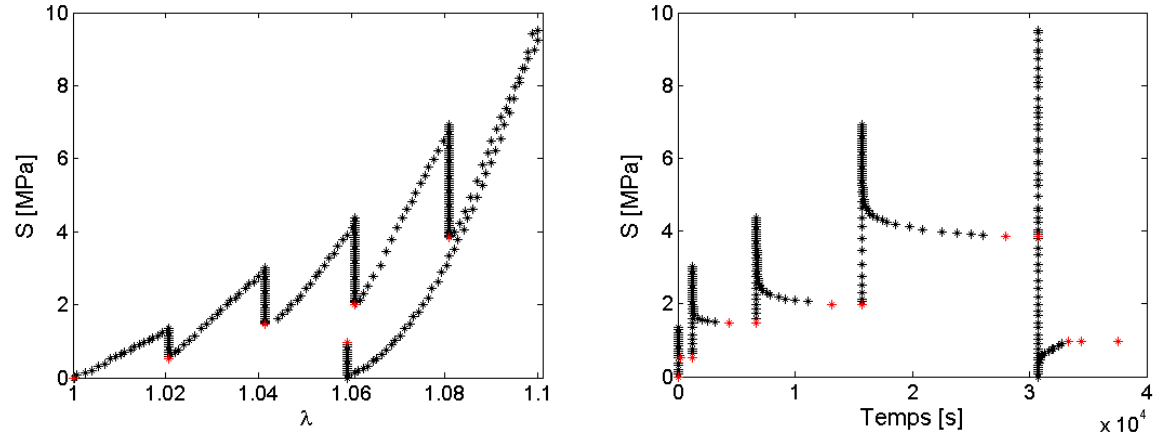


Figure III.6. Séquences d'essais de relaxation successifs

En noir réponse du tendon aux chargements (courbes de relaxations lissées) ; en rouge relaxation atteinte. $\dot{\lambda} = 0,02\text{s}^{-1}$ en charge et décharge $\dot{\lambda} = 0$ en relaxation.

Les essais de relaxation présentent de multiples informations aux niveaux instantané et relaxé (Figure III.6.). Il apparaît une nette dépendance entre le niveau d'élongation imposé (λ) et le temps de relaxation (Tableau III.1.). De plus, ces essais permettent de mettre en évidence l'état relaxé et son évolution en fonction de l'élongation en charge, et également sa dépendance vis-à-vis de l'histoire du chargement (Figure III.6.). En effet, l'essai de relaxation après décharge présente un cycle d'hystérésis de l'état instantané (force nulle dès 1,06 d'élongation) mais également de l'état relaxé (les états relaxés en charge et en décharge ne coïncident pas pour une même élongation).

Tableau III.1. Evolution du temps de relaxation et de la contrainte relaxée

Elongation imposée (λ)	1,02	1,04	1,06	1,08	1,06 (après décharge)
Temps de relaxation [s]	219	3089	6387	12239	3686
Contrainte relaxée [MPa]	0,54	1,6	2,24	4,5	1,08

Enfin, les cycles de fluage et de fatigue présentent des effets de rochet (Figure III.7.A) ainsi qu'un adoucissement du matériau pour les cycles de fatigue (Figure III.7.D) et une certaine accommodation lors des premiers cycles (Figure III.7.C).

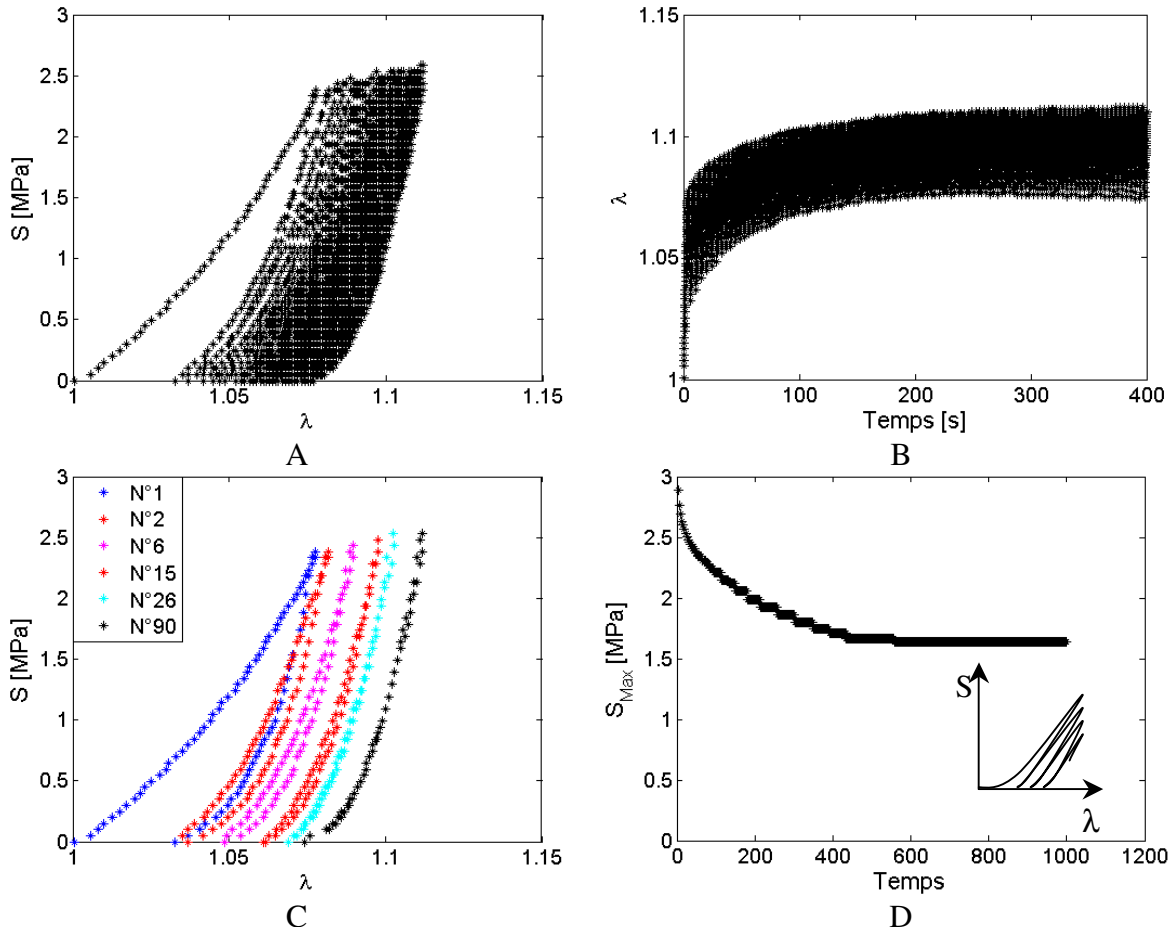


Figure III.7. Cycles de fluage dynamique et de fatigue à vitesse d'élongation constante

A : Contrainte en fonction de l'élongation ; B : Elongation en fonction du temps ;
C : Illustration de quelques cycles de fluage dynamique ; D : Contraintes maximales des cycles de fatigue.

Vitesse d'élongation constante : $|\dot{\lambda}| = 0,02 s^{-1}$

III.2. FORMALISME THERMODYNAMIQUE

III.2.1. INTRODUCTION

A travers les différents tests mécaniques que nous avons réalisés et compte tenu de la littérature (e.g. [FUNG, 1993; PIOLETTI et RAKOTOMANANA, 2000; WEISS et GARDINER, 2001]), le tendon s'avère être un matériau viscoélastique non-linéaire dont l'état relaxé dépend fortement de l'histoire du chargement (cf. §III.1.2.). Notre étude bibliographique sur les tendons et sur les modèles développés pour décrire leur comportement (cf. §I.3.1), nous a amené, pour rendre compte de nos observations, à concevoir un modèle fondé sur un formalisme thermodynamique non-linéaire des états hors-équilibre, formalisme faisant actuellement l'objet de développements par l'équipe de Mécanique du Solide du LEMTA depuis plus de vingt ans ([ARIEBY, 2007; CUNAT, 1985; CUNAT, 1996; MAGNENET *et al.*, 2008; MRABET *et al.*, 2004]).

Cette approche de type Thermodynamique des Processus Irréversibles s'inscrivant dans la Thermodynamique des Relaxations appliquée aux milieux continus, permet de décrire, au niveau d'un volume élémentaire représentatif (VER), les caractéristiques microscopiques (physico-chimie des processus mis en jeu) ou macroscopiques (analyse phénoménologique des réponses). Pour cela, le VER doit être un volume élémentaire « suffisamment petit » pour que les gradients des variables intensives (champs de contrainte, de déformation et de température) puissent y être considérés comme nuls, tout en étant « suffisamment grands » pour pouvoir parler de milieu continu.

III.2.2. EQUATIONS DE BASE

L'approche thermodynamique présenté ici s'appuie sur la relation de Gibbs généralisée aux situations hors-équilibre au niveau du VER du système considéré. Cette relation, pour un VER hors-équilibre, peut s'écrire en terme de vitesse :

$$\dot{u}\left(s, \underline{\underline{\varepsilon}}, \underline{n}\right) = T\dot{s} + \underline{\underline{\sigma}} : \dot{\underline{\underline{\varepsilon}}} + \underline{\mu}.\dot{\underline{n}} \qquad \textbf{(III.2.)}$$

où u est l'énergie interne spécifique, T la température absolue du système, s l'entropie spécifique, $\underline{\underline{\sigma}}$ le tenseur des contraintes de Cauchy, $\underline{\underline{\varepsilon}}$ le tenseur des déformations, $\underline{\mu}$ le vecteur des potentiels chimiques des entités constituant le système, $\underline{n}$ le vecteur des quantités de matière, ramenées à l'unité de volume, associées aux potentiels chimiques.

La variation des quantités de matière $\left(\dot{\underline{n}}\right)$ traduit, pour un système fermé, les

réorganisations internes de la matière hors-équilibre. L'utilisation des degrés d'avancement et de l'affinité au sens de De Donder [DE DONDER, 1936] permet d'écrire :

$$\begin{cases} \dot{\underline{n}} = \underline{\nu}.\dot{\underline{\xi}} \\ \underline{A} = -\underline{\mu}.\underline{\nu} \end{cases} \quad \textbf{(III.3.)}$$

où $\underline{\nu}$ est le vecteur des coefficients stœchiométriques des espèces chimiques mises en jeu, $\underline{\xi}$ le vecteur des degrés d'avancement des réactions mises en jeu, et $\underline{A}$ le vecteur des affinités des réactions internes (à l'équilibre : A=0).

Ainsi, la relation (III.2.) s'écrit maintenant :

$$\dot{u}\left(s, \underline{\underline{\varepsilon}}, \underline{n}\right) = T\dot{s} + \underline{\underline{\sigma}} : \dot{\underline{\underline{\varepsilon}}} - \underline{A}.\dot{\underline{\xi}} \quad \textbf{(III.4.)}$$

Cette relation est complétée par la relation de Gibbs-Duhem qui peut s'écrire :

$$0 = T\dot{s} + \underline{\underline{\sigma}} : \dot{\underline{\underline{\varepsilon}}} - \underline{A}.\dot{\underline{\xi}} \quad \textbf{(III.5.)}$$

III.2.3. LOIS D'ETAT

A partir de la forme intégrale de la relation (III.4.) nous pouvons déduire les équations d'état du système par dérivation des forces thermodynamiques :

$$\begin{cases} \underline{\underline{\sigma}}\left(\underline{\underline{\varepsilon}}, s, \underline{\xi}\right) = \dfrac{\partial u}{\partial \underline{\underline{\varepsilon}}}\left(\underline{\underline{\varepsilon}}, s, \underline{\xi}\right) \\ T\left(\underline{\underline{\varepsilon}}, s, \underline{\xi}\right) = \dfrac{\partial u}{\partial s}\left(\underline{\underline{\varepsilon}}, s, \underline{\xi}\right) \\ -\underline{A}\left(\underline{\underline{\varepsilon}}, s, \underline{\xi}\right) = \dfrac{\partial u}{\partial \underline{\xi}}\left(\underline{\underline{\varepsilon}}, s, \underline{\xi}\right) \end{cases} \quad \textbf{(III.6.)}$$

Après dérivation par rapport au temps, nous obtenons le système d'équations suivant :

$$\begin{pmatrix} \dot{\underline{\underline{\sigma}}} \\ \dot{T} \\ -\dot{\underline{A}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} u_{,\underline{\underline{\varepsilon}}\underline{\underline{\varepsilon}}} & u_{,\underline{\underline{\varepsilon}}s} & u_{,\underline{\underline{\varepsilon}}\underline{\xi}} \\ u_{,s\underline{\underline{\varepsilon}}} & u_{,ss} & u_{,s\underline{\xi}} \\ u_{,\underline{\xi}\underline{\underline{\varepsilon}}} & u_{,\underline{\xi}s} & u_{,\underline{\xi}\underline{\xi}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \dot{\underline{\underline{\varepsilon}}} \\ \dot{s} \\ \dot{\underline{\xi}} \end{pmatrix} \quad \textbf{(III.7.)}$$

Enfin, en définissant le vecteur des variables généralisées extensives, $\underline{y} = \left(\underline{\underline{\varepsilon}}, s\right)^T$, et le vecteur des variables généralisées duales associées (intensives), $\underline{Y} = \left(\underline{\underline{\sigma}}, T\right)^T$, nous pouvons simplifier cette dernière relation (III.7.) qui s'écrit alors :

$$\begin{pmatrix} \dot{\underline{Y}} \\ -\dot{\underline{A}} \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \underline{\underline{a}}^{u} & \underline{\underline{b}} \\ \underline{\underline{b}}^{T} & \underline{\underline{g}} \end{pmatrix} \begin{pmatrix} \dot{\underline{y}} \\ \dot{\underline{\xi}} \end{pmatrix} \qquad \textbf{(III.8.)}$$

où $\underline{\underline{a}}^{u}$ est la matrice de Tisza qui régit la réponse élastique instantanée dans le cas purement élastique [TISZA, 1977], $\underline{\underline{b}}$ la matrice des effets des variables internes et $\underline{\underline{g}}$ la matrice des dissipations. Ce système d'équations constitue la base du modèle thermodynamique présenté ici. De plus, il est supposé qu'au voisinage de l'équilibre les matrices de Tisza, de couplage et de dissipation sont constantes. Enfin, il est à noter que le développement mathématique de ce modèle a été effectué pour un couplage de type thermomécanique mais qu'il pourrait également l'être pour d'autres couplages intégrant, par exemple, des phénomènes piézoélectriques, magnétiques,… La forme analytique générique serait alors la même, bien que les matrices de Tisza et de couplages, ainsi que les variables contenues dans les vecteurs $\underline{y}$ et $\underline{Y}$ seraient de nature différente.

III.2.4. RELATIONS CINETIQUES ET SPECTRE DE RELAXATION

III.2.4.1. Etat Relaxé

Nous définissons l'état relaxé comme un état dans lequel les réactions internes sont stationnaires [EL ALAM *et al.*, 2002]. C'est-à-dire que la variation de l'affinité des différentes réactions est nulle :

$$\dot{\underline{A}}^{r} = 0 \qquad \textbf{(III.9.)}$$

En utilisant la deuxième équation de l'équation (III.8.), pour un état relaxé défini ci-dessus, il vient :

$$\dot{\underline{\xi}}^{r} = -\underline{\underline{g}}^{-1}.\underline{\underline{b}}^{T}.\dot{\underline{y}} \qquad \textbf{(III.10.)}$$

En remplaçant dans l'équation (III.8.), la variation du vecteur des affinités, $\dot{\underline{A}}$, s'exprime alors sous la forme :

$$\dot{\underline{A}} = -\underline{\underline{g}}.\left(\dot{\underline{\xi}} - \dot{\underline{\xi}}^{r}\right) \qquad \textbf{(III.11.)}$$

Ainsi, en intégrant et en supposant que le système était à l'équilibre à l'instant initial, la relation (III.11.) s'écrit à l'instant t :

$$\underline{A} = -\underline{\underline{g}}.\left(\underline{\xi} - \underline{\xi}^{r}\right) \qquad \textbf{(III.12)}$$

III.2.4.2. Loi cinétique d'Onsager

Nous avons défini dans le paragraphe précédent un état relaxé et un état hors-équilibre. Il convient de définir maintenant une cinétique permettant de décrire le passage de l'état instantané à l'état relaxé. Pour cela, Cunat propose d'introduire en première approximation une équation cinétique linéaire [CUNAT, 1985]. Cette relation associe l'affinité, $\underline{A}$, à la variation de l'avancement de réaction, $\dot{\underline{\xi}}$, *via* une matrice $\underline{\underline{L}}$ constante et symétrique conformément à la théorie d'Onsager :

$$\dot{\underline{\xi}} = \underline{\underline{L}}.\underline{A} \qquad \textbf{(III.13.)}$$

Nous pouvons ainsi définir une matrice, $\underline{\underline{\tau}}$, dont les valeurs propres $\left(\tau_j \quad j = 1..N\right)$ sont les temps de relaxation des processus du système intervenant lors des réactions et/ou réarrangements internes. Par combinaison de (III.11.) et (III.13.), nous obtenons :

$$\begin{cases} \dot{\underline{\xi}} = -\underline{\underline{\tau}}^{-1}\left(\underline{\xi} - \underline{\xi}^{r}\right) \\ \underline{\underline{\tau}}^{-1} = \underline{\underline{L}}.\underline{\underline{g}} \end{cases} \qquad \textbf{(III.14.)}$$

Ainsi, nous pouvons écrire pour chaque processus j la cinétique de relaxation :

$$\dot{\xi}_j = -\frac{\xi_j - \xi_j^{r}}{\tau_j} \qquad \textbf{(III.15.)}$$

III.2.4.3. Modélisation des temps de relaxation

Temps de relaxation

La modélisation des temps de relaxation est un point important du modèle. Ainsi, un apport suffisant d'énergie à un système en équilibre peut le faire évoluer vers un état excité avec une certaine probabilité [EYRING *et al.*, 1982]. Chaque processus interne (j) interviendra dans cette évolution selon une cinétique qui lui est propre, et qui est caractérisée par un temps de relaxation, τ_j. Nous postulons que les temps de relaxation vérifient :

$$\tau_j = \frac{1}{\nu_j P_j^+} \qquad \textbf{(III.16.)}$$

où ν_j est la fréquence de saut d'un état d'énergie à un autre pour le processus j et P_j^+ la probabilité de saut. Nous proposons ensuite de faire l'hypothèse que tous les processus ont la même fréquence de saut et retient l'approximation de Guggenheim [GUGGENHEIM, 1939] pour un degré de liberté :

$$\nu_j = \nu = \frac{k_B T}{h} \qquad \textbf{(III.17.)}$$

où k_B est la constante de Boltzmann et h la constante de Planck. Compte tenu du fait qu'un ensemble d'atomes, ou de molécules, présente plus d'un degré de liberté, la fréquence de saut d'un tel système peut donc différer de celle de Guggenheim. Pour améliorer cette description, Cunat propose de faire intervenir un facteur de glissement $a_v\left(\underline{\dot{y}}, \underline{\xi}\right)$ fonction des variables $\underline{\dot{y}}$ et $\underline{\xi}$:

$$\nu = a_v\left(\underline{\dot{y}}, \underline{\xi}\right)\frac{h}{k_B T} \qquad \textbf{(III.18.)}$$

Par ailleurs, la probabilité de passage d'un état d'équilibre à un état activé de niveau d'énergie E, est supposée obéir à la loi d'Arrhénius :

$$P_j^+(E) = \exp\left(-\frac{\Delta F_j^+}{RT}\right) \qquad \textbf{(III.19.)}$$

où ΔF^+ représente la variation d'énergie libre entre l'état d'équilibre et l'état excité, R la constante des gaz parfaits, et T la température absolue du système. Ainsi, pour chaque processus, une telle probabilité de saut pourra être définie en fonction de la variation d'énergie libre associée à chaque processus. En exploitant la relation (III.16.), la fréquence et la probabilité de saut définies dans les relations (III.18.) et (III.19.), nous pouvons alors exprimer le temps de relaxation de chaque processus :

$$\tau_j = \frac{h}{k_B T} a_v\left(\underline{\dot{y}}, \underline{\xi}\right)\exp\left(\frac{\Delta F_j^+}{RT}\right) \qquad \textbf{(III.20.)}$$

Par ailleurs, nous pouvons affiner le modèle en tenant compte du fait que si la sollicitation appliquée au système est de forte amplitude, alors l'énergie d'activation, ΔF_j^+, peut dépendre du chargement et donc du temps. Nous pouvons approcher cette énergie

d'activation sous sollicitation au premier ordre par rapport à une énergie d'activation de référence (énergie d'activation à l'état stationnaire) :

$$\Delta F_j^+ = \Delta F_j^{+,r} + \Delta\left(\Delta F_j^+\right) \qquad \textbf{(III.21.)}$$

De ce fait, le terme non-linéaire de la variation de l'énergie d'activation, à tout instant, est lié à l'écart entre l'état actuel et celui à l'équilibre, plus l'écart est important, plus les non-linéarités sont prépondérantes. Cunat propose de relier cette variation d'énergie d'activation à l'écart entre les variables observables de l'état actuel et celles de l'état d'équilibre. Il introduit donc un volume d'activation apparent $\left(\underline{K_Y}\right)$ des processus mis en jeu :

$$\Delta\left(\Delta F_j^+\right) = \underline{K_Y}.\left(\underline{Y} - \underline{Y^r}\right) \qquad \textbf{(III.22.)}$$

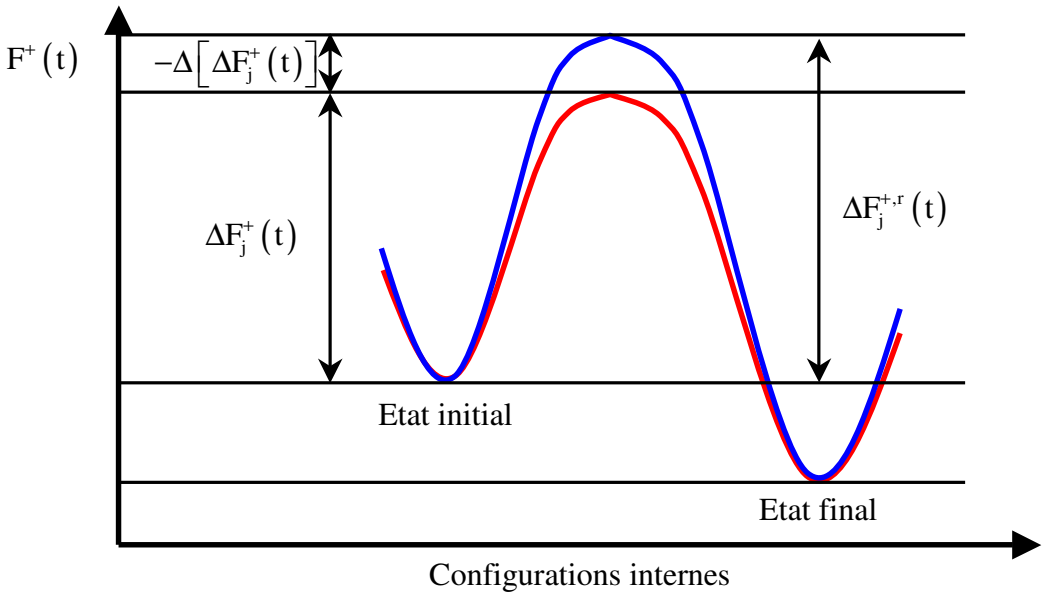


Figure III.8. Représentation schématique de la variation de la barrière d'énergie
En bleu représentation du col d'activation de l'état d'équilibre ; en rouge celui du col d'activation de l'état activé

Par ailleurs, nous pouvons définir un temps de relaxation de référence qui est atteint lorsque le système est à l'équilibre :

$$\tau_j^r = \frac{h}{k_B T} \exp\left(\frac{\Delta F_j^{+,r}}{RT}\right) \qquad \textbf{(III.23.)}$$

Ainsi, en remplaçant les relations (III.21.) à (III.23.) dans la relation (III.20.), nous obtenons :

$$\begin{cases} \tau_j = \tau_j^r a\left(\underline{Y}, \underline{Y}^r, \dot{\underline{y}}, \underline{\xi}\right) \\ a\left(\underline{Y}, \underline{Y}^r, \dot{\underline{y}}, \underline{\xi}\right) = a_v\left(\dot{\underline{y}}, \underline{\xi}\right) \exp\left[\dfrac{\underline{K_Y}.\left(\underline{Y} - \underline{Y}^r\right)}{RT}\right] \end{cases} \qquad \textbf{(III.24.)}$$

Spectre des temps de relaxation de référence

Ce modèle définit le comportement du milieu régi par des processus présentant des modes propres associés à des temps de relaxation propres. L'ensemble des modes supposés coopératifs (équation III.16.) définit alors un spectre des temps de relaxation (les processus ont tous la même fréquence de saut d'énergie). Concernant la plage des temps de relaxation, pour un système à N modes, nous supposerons qu'ils sont répartis linéairement sur une échelle logarithmique de longueur D (en décades). Nous faisons donc intervenir le temps de relaxation le plus long et le nombre de modes choisis :

$$\tau_j^r = \tau_N^r 10^{-D\left(\frac{N-j}{N-1}\right)} \qquad \textbf{(III.25.)}$$

Ce domaine des temps de relaxation, bien que discret, tend vers un domaine continu dès 50 modes lorsque D est supérieur ou égale à 6 [CUNAT, 1985; CUNAT, 1988; CUNAT, 1996].

Poids des modes dissipatifs

Bien que les processus soient considérés comme coopératifs, ils ne représentent pas la même probabilité d'occurrence. La contribution de chaque mode à la réponse globale est donnée par un poids que nous pouvons définir à l'aide de l'écart-type de la densité de probabilité associée à ce mode. Pour cela supposons un test de relaxation isotherme appliqué à un système fermé qui a subi une sollicitation mécanique suffisamment rapide pour qu'aucun processus n'ait le temps de se relaxer, il vient :

$$du = 0 = Tds_i - \underline{A}.d\underline{\xi} \qquad \textbf{(III.26.)}$$

Nous en déduisons pour la production d'entropie :

$$\frac{ds_i}{dt} = \frac{\underline{A}}{T}.\frac{d\underline{\xi}}{dt} \qquad \textbf{(III.27.)}$$

Nous pouvons calculer l'entropie produite entre le temps de début de relaxation, t_0, et un temps infiniment long, t_∞ correspondant respectivement aux états internes $\underline{\xi_0}$ et $\underline{\xi^r}$:

$$\Delta s_i = \int_{t_0}^{\infty} \frac{ds_i}{dt} dt = \int_{t_0}^{\infty} \frac{\underline{\underline{A}}}{T} . \frac{d\underline{\xi}}{dt} dt \approx \int_{\xi_0}^{\xi^r} \frac{\underline{\underline{A}}}{T} . d\underline{\xi} \qquad \textbf{(III.28.)}$$

En remplaçant l'affinité par la relation (III.12.), il vient :

$$\Delta s_i = -\frac{\underline{\underline{g}}}{2T} . \left(\underline{\xi_0} - \underline{\xi^r} \right)^2 \qquad \textbf{(III.29.)}$$

Nous avons vu (III.19.) que la probabilité de passage d'un état d'équilibre vers un état activé pouvait s'écrire :

$$P_j^+ = \exp\left(-\frac{\Delta F_j^+}{RT} \right) \qquad \textbf{(III.30.)}$$

Cette relation est à rapprocher de la théorie des fluctuations d'Einstein qui relie la probabilité P d'une fluctuation de l'avancement de réaction autour de l'équilibre et la production d'entropie :

$$P = C \exp\left(\frac{\Delta S_i}{R} \right) \qquad \textbf{(III.31.)}$$

En effet, le système étant en relaxation isotherme, la variation d'énergie libre dépend de la variation d'entropie interne :

$$\Delta F = -T \Delta S_i \qquad \textbf{(III.32.)}$$

La constante C est une constante de normalisation. Si nous sommons les probabilités de fluctuations pour tous les modes, nous obtenons :

$$\iiint P = 1 \;\Rightarrow\; C = \int_{-\infty}^{+\infty} \ldots \int_{-\infty}^{+\infty} \exp\left(-\frac{\Delta S_i}{R} \right) d\left(\xi_0^1 - \xi^{r,1} \right) \ldots d\left(\xi_0^j - \xi^{r,j} \right) \ldots d\left(\xi_0^N - \xi^{r,N} \right) \qquad \textbf{(III.33.)}$$

En prenant en compte les relations (III.29.), (III.31.) et (III.33.), les densités de probabilités P_j^+ obtenues apparaissent comme des gaussiennes de moyenne $\xi^{r,j}$ et d'écart-type σ_ξ :

$$\begin{cases} P_j^+ = \dfrac{1}{\sqrt{2\pi}\sigma_{\xi j}} \exp\left[-\dfrac{\left(\xi_0^j - \xi^{r,j}\right)^2}{2\sigma_{\xi j}^2} \right] \\ \sigma_{\xi j} = \sqrt{\dfrac{k_B T}{g_{jj}}} = \sqrt{\dfrac{L_{jj} k_B T}{L_{jj} g_{jj}}} \propto \sqrt{\tau_j} \quad [1] \\ P_j^+ = \prod_{j=1}^{N} P_j^+ \end{cases} \qquad \textbf{(III.34.)}$$

Enfin, comme nous l'avons précisé ci-dessus, le poids de chaque processus est défini au voisinage de l'équilibre à l'aide de la relation :

$$p_j^r = \frac{\sigma_{\xi j}}{\sum_{k=1}^{N} \sigma_{\xi k}} \qquad \textbf{(III.35.)}$$

ce qui peut s'écrire, en terme de temps de relaxation :

$$p_j^r = \frac{\sqrt{\tau_j}}{\sum_{k=1}^{N} \sqrt{\tau_k}} \qquad \textbf{(III.36.)}$$

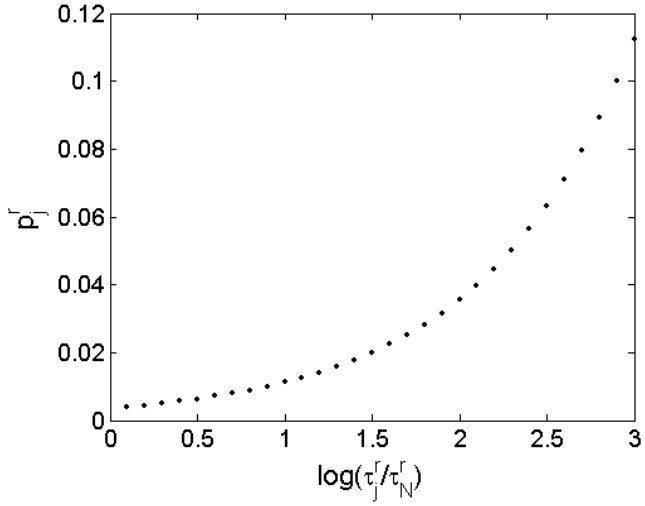


Figure III.9. Répartition des poids des processus dissipatifs
Pour 30 processus sur 3 décades. Les processus les plus lents influent le plus sur la réponse du matériau.

[1] Nous n'avons pas adopté la notation d'Einstein, la répétition d'indice n'indique pas une somme.

III.2.5. FORMALISME THERMODYNAMIQUE DE SOLLICITATIONS UNIAXIALES ISOTHERMES

Jusqu'à présent, nous avons brièvement décrit le modèle thermodynamique développé par Cunat en terme de variables de contrôle et de variables observables. Ce modèle, que nous allons appliquer au cas des tendons, permet la prise en compte d'un grand nombre de couplages : mécaniques, thermiques, électriques, magnétiques…

Dans cette section, nous allons donc appliquer le modèle au cas de sollicitations uniaxiales isothermes à déformation contrôlée, la contrainte étant le principal observable.

En intégrant la différence de la relation (III.8.) à l'état excité et à l'état relaxé, et en utilisant la relation (III.14.), il vient :

$$\dot{\xi}_j = -\frac{Y_j - Y_j^r}{b_j \tau_j} \qquad \textbf{(III.37.)}$$

Nous pouvons ensuite choisir nos variables dans la relation (III.8.) compte tenu des sollicitations uniaxiales isothermes imposées $\left(\dot{\underline{Y}} \to \dot{\sigma} \text{ et } \dot{\underline{y}} \to \dot{\varepsilon} \right)$, la loi de comportement (III.8.), devient donc :

$$\dot{\sigma} = E^u \dot{\varepsilon} - \sum_{j=1}^{N} \frac{\sigma_j - \sigma_j^r}{\tau_j} \qquad \textbf{(III.38.)}$$

où toutes les grandeurs sont de type scalaire. La réponse est donc la contrainte σ et la déformation imposée ε. Les paramètres E^u et τ_j représentent respectivement le module d'élasticité et le temps de relaxation du $j^{ème}$ mode.

Enfin, en complétant cette relation avec les relations (III.24.), (III.25.) et (III.36.), nous parvenons à formuler l'expression de la loi de comportement pour des sollicitations uniaxiales isothermes contrôlées où la déformation et sa vitesse sont imposées :

$$\begin{cases} \dot{\sigma} = E^u \dot{\varepsilon} - \sum_{j=1}^{N} \dfrac{\sigma_j - p_j^{r,0}\sigma^r}{\tau_j^{r,0} a\left(\sigma, \sigma^r, \dot{\sigma}\right)} & (a) \\ a\left(\sigma, \sigma^r, \dot{\varepsilon}\right) = a_v\left(\dot{\varepsilon}\right) \exp\left[\dfrac{K_\sigma \left|\sigma - \sigma^r\right|}{RT}\right] & (b) \\ \tau_j^{r,0} = \tau_N^{r,0} 10^{-D\left(\frac{N-j}{N-1}\right)} & (c) \\ p_j^{r,0} = \dfrac{\sqrt{\tau_j^{r,0}}}{\sum_{k=1}^{n} \sqrt{\tau_j^{r,0}}} & (d) \end{cases} \quad \textbf{(III.39.)}$$

où σ désigne la contrainte à l'instant t, σ^r la contrainte relaxée, N le nombre de modes de dissipation impliqués, D le nombre de décades du spectre des temps de relaxation discrétisé, $\tau_N^{r,0}$ le temps de relaxation de référence à l'état initial du processus le plus lent, K_σ le volume d'activation apparent des modes mis en jeu, et $p_j^{r,0}$ le poids du $j^{ème}$ mode à l'instant initial.

Pour résumer, ce modèle propose de décrire la variation de la réponse en contrainte du matériau sous la forme d'une partie instantanée $\left(E^u \dot{\varepsilon}\right)$ et d'une partie dissipative. Les cinétiques sont caractérisées par un spectre de temps de relaxation, et conduisent à un état d'équilibre correspondant à une contrainte dite relaxée (Figure III.10.).

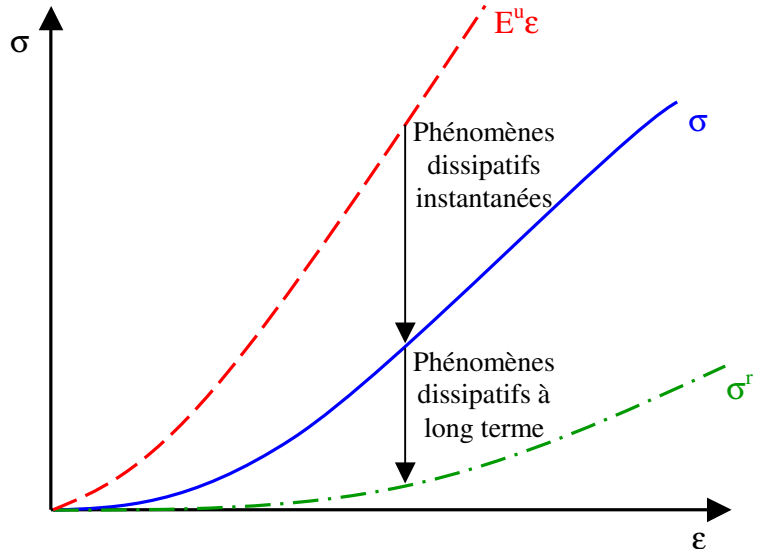


Figure III.10. Représentation schématique des différentes contributions
Le schéma transcrit l'ensemble des contributions (élasticité non-linéaire) intervenant dans l'équation III.39.a qui correspond à une sollicitation de traction à déformation contrôlée

III.3. MODELE MECANIQUE

Après avoir présenté le modèle thermodynamique développé au sein du laboratoire, une partie importante de notre travail a consisté à l'adapter à notre matériau : le tendon d'Achille de lapin néo-zélandais. Nous tiendrons compte des données de la littérature sur les tendons et les ligaments dont nous avons fait état dans le chapitre I, et de nos propres observations sur ce matériau.

III.3.1. REPONSE EN CONTRAINTE

Comme nous venons de le présenter (cf. §III.2.5.), la contrainte instantanée (σ) comprend une composante instantanée faisant intervenir le module d'élasticité apparent E^u, et une partie dissipative où interviennent la contrainte relaxée, les temps de relaxation instantanés τ_j dépendant eux-mêmes d'un temps de relaxation de référence et d'une fonction de glissement de ce spectre liée à l'histoire du chargement.

III.3.1.1. Module d'élasticité apparent

Différentes études expliquent l'augmentation du module tangent au cours d'un essai de traction de tendons par le recrutement de fibres de collagènes [DE VITA et SLAUGHTER, 2006; FRATZL *et al.*, 1997; LIMBERT et MIDDLETON, 2004; WOO *et al.*, 2006]. Pour notre part, nous avons observé, lors des essais cycliques que pendant les décharges, le module

tangent décroissait jusqu'à revenir à sa valeur initiale (Figure III.5.). Nous avons donc choisi de modéliser le module d'élasticité apparent comme la résultante d'un module d'élasticité initial, représentant la matrice non-fibreuse seule, et d'une composante de recrutement de fibres de collagènes. Expérimentalement, nous avons pu observer que le module apparent décroissait plus vite en décharge qu'il n'augmentait en charge. Ceci pourrait correspondre à un relâchement de fibres plus aisé et plus important que leur mise en tension. Pour modéliser ce phénomène de recrutement, nous avons adopté une fonction de distribution statistique de Weibull en charge et en décharge, comme l'avaient déjà envisagé [DE VITA et SLAUGHTER, 2006]. La formulation la plus simple que nous ayons trouvé pour l'instant est la suivante :

$$\begin{cases} E^{u,eff} = E_0^u + E^u f(\varepsilon) \\ f(\varepsilon) = \begin{cases} 1 - \exp\left[-\left(\dfrac{\varepsilon_{loc}(\varepsilon)}{\varepsilon_{th_c}} \right)^{\alpha_c} \right] & \text{en charge} \\ 1 - \exp\left[-\left(\dfrac{\varepsilon_{loc}(\varepsilon)}{\varepsilon_{th_d}} \right)^{\alpha_d} \right] & \text{en décharge} \end{cases} \end{cases} \quad \textbf{(III.40.)}$$

où E_0^u est le module d'élasticité initial (partie non-fibreuse), E^u le module lorsque toutes les fibres sont tendues et $f(\varepsilon)$ la fonction de distribution de Weibull en charge et en décharge. Pour chaque partie de la fonction de distribution, des paramètres ajustables sont introduits $\left(\varepsilon_{th_c}, \alpha_c, \varepsilon_{th_d}, \alpha_d\right)$ ainsi qu'une variable ε_{loc} qui est fonction de la déformation imposée ε telle que la fonction f soit continue.

III.3.1.2. Temps de relaxation de référence et fonction de glissement

Nous avons observé lors des essais de relaxation successifs que le temps de relaxation variait en fonction de l'élongation (Tableau III.1.). Nous avons donc intégré au temps de relaxation de référence une dépendance à la déformation. Cette relation a été modélisée empiriquement par une fonction parabolique :

$$\tau_j^r = \tau_j^{r,0} (\varepsilon + \varepsilon_0)^2 \quad \textbf{(III.41.)}$$

où $\tau_j^{r,0}$ est le temps de relaxation de référence à l'instant initial (ici à déformation nulle) et ε_0 un paramètre conduisant à un temps de relaxation non nul en début d'essai. Ce paramètre est maintenu constant lors des ajustements, de telle sorte que le plus faible temps de relaxation

reste supérieur au temps caractéristique de la propagation du son dans le tendon d'Achille au cours de l'essai.

Pour compléter le temps de relaxation instantané, une fonction de glissement du spectre des temps de relaxation a été choisie sur une base également empirique en fonction des observations faites durant les cycles de charge et de décharge. En effet, la diminution importante du module tangent lors de la décharge peut provenir du module d'élasticité mais également de variations rapides des temps de relaxation consécutives aux variations du volume d'activation apparent :

$$a\left(\sigma,\sigma^{r}\right)=\exp\left(\frac{K_0\left|\sigma-\sigma^{r}\right|+K_A\left(\sigma-\sigma^{r}\right)}{RT}\right) \qquad \textbf{(III.42.)}$$

où K_0 et K_A sont des paramètres ajustables homogènes à des volumes d'activation.

Il est à noter que nous n'avons pas introduit de dépendance vis à vis de la vitesse de déformation $\left(a_v=1\right)$ car nous avons réalisé des expériences à une seule vitesse de déformation.

III.3.2. CONTRAINTE RELAXEE

La contrainte relaxée a été étudiée par le biais d'essais de relaxation. Nous accèdons à cette donnée lorsque le matériau, contraint à vitesse nulle, présente un niveau de contrainte stable durant 1 heure. Sur le plan expérimental, nous avons remarqué que la contrainte relaxée variait d'une façon similaire à celle de la contrainte observable. De plus, après une décharge (Figure III.6.), nous avons pu observer un phénomène d'hystérésis. En effet, la contrainte relaxée pour une élongation de 1,06 en charge est supérieure à celle obtenue après une décharge à 1,06 (Figure III.6.). La contrainte relaxée est donc dépendante de l'histoire du chargement. Nous avons donc choisi le même formalisme thermodynamique pour décrire la contrainte relaxée. N'ayant pas accès à la contrainte d'équilibre stable, nous avons supposé que celle-ci était nulle, correspondant à l'état de contrainte pour des temps infiniment longs. Ainsi, le temps de relaxation associé a été choisi suffisamment long afin que seule la dissipation instantanée ait une influence sur la contrainte relaxée.

III.3.2.1. Module d'élasticité apparent

La contrainte relaxée semblant avoir un comportement expérimental similaire à celui de la contrainte observable, nous avons choisi une forme de module comparable :

$$E^{r,eff} = E_0^r + E^r \left[1 - \exp\left[-\left(\frac{\varepsilon}{\varepsilon_{th_R}} \right)^{\alpha_R} \right] \right] \quad \textbf{(III.43.)}$$

où ε_{th_R} et α_R sont des paramètres ajustables.

III.3.2.2. Fonction de glissement

Pour la fonction de glissement, nous avons également choisi une forme faisant intervenir une variation de l'énergie d'activation résultant du produit d'un volume d'activation apparent et de l'écart de contrainte séparant l'état relaxé et l'état d'équilibre stable. De plus, nous avons pris en compte la dépendance de la fonction de glissement à la vitesse de déformation, ce qui rend la contrainte relaxée naturellement indépendante de la vitesse :

$$\begin{cases} a^r = a_v \exp\left(\dfrac{K_{eq} \, |\sigma^r|}{RT} \right) \\ a_v = \begin{cases} 1 & \text{si } |\dot{\varepsilon}| < \dot{\varepsilon}_0 \\ \dfrac{\dot{\varepsilon}_0}{|\dot{\varepsilon}|} & \text{sinon} \end{cases} \end{cases} \quad \textbf{(III.44.)}$$

où K_{eq} représente le volume d'activation apparent pour passer de l'état relaxé à l'état d'équilibre stable, $\dot{\varepsilon}_0$ désigne un paramètre non physique d'adimensionnement qui est généralement fixé à $10^{-7} s^{-1}$.

III.3.3. EXPRESSION DU MODELE MECANIQUE COMPLET

Afin d'avoir une vue d'ensemble de la modélisation choisie pour les tendons d'Achille, nous proposons un bilan des équations régissant la loi de comportement (Figure III.11.).

• Contrainte observable **• Contrainte relaxée**

$$\dot{\sigma} = E^{u,eff}\,\dot{\varepsilon} - \sum_{j=1}^{N} \frac{\sigma_j - p_j^{r,0}\sigma^r}{\tau_j^{r,0}\left(\varepsilon+\varepsilon_0\right)^2 a\left(\sigma,\sigma^r\right)} \qquad \dot{\sigma}^r = E^{r,eff}\,\dot{\varepsilon} - \sum_{j=1}^{N} \frac{\sigma_j^r}{\tau_j^{eq,0} a^r\left(\sigma^r\right)}$$

• Modules d'élasticité apparents

$$\begin{cases} E^{u,eff} = E_0^u + E^u f(\varepsilon) \\ f(\varepsilon) = \begin{cases} 1-\exp\left[-\left(\dfrac{\varepsilon_{loc}}{\varepsilon_{th_c}}\right)^{\alpha_c}\right] & \text{en charge} \\ 1-\exp\left[-\left(\dfrac{\varepsilon_{loc}}{\varepsilon_{th_d}}\right)^{\alpha_d}\right] & \text{en décharge} \end{cases} \end{cases} \qquad E^{r,eff} = E_0^r + E^r\left(1-\exp\left[-\left(\frac{\varepsilon}{\varepsilon_{th_R}}\right)^{\alpha_R}\right]\right)$$

• Fonctions de glissement et spectre des temps de relaxation

$$a = \exp\left[\frac{K_0\,|\sigma-\sigma^r| + K_A(\sigma-\sigma^r)}{RT}\right] \qquad \tau_j^{r,0} = \tau_N^{r,0} 10^{-D\left(\frac{N-j}{N-1}\right)}$$

$$\begin{cases} a^r = a_v\ \exp\left(\dfrac{K_{eq}\,|\sigma^r|}{RT}\right) \\ a_v = \begin{cases} 1 & \text{si } |\dot{\varepsilon}| < \dot{\varepsilon}_0 \\ \dfrac{\dot{\varepsilon}_0}{|\dot{\varepsilon}|} & \text{sinon} \end{cases} \end{cases} \qquad \tau_j^{eq,0} = \tau_N^{eq,0} 10^{-D\left(\frac{N-j}{N-1}\right)}$$

$$p_j^{r,0} = \frac{\sqrt{\tau_j^{r,0}}}{\sum_{k=1}^{N}\sqrt{\tau_k^{r,0}}}$$

Figure III.11. Résumé de la modélisation des tendons d'Achille en traction uniaxiale

III.4. RESULTATS THEORIQUES

Nous avons confronté notre modèle aux résultats expérimentaux pour les cycles de charge et de décharge ainsi que pour les séquences de relaxation successives. Au vu du grand nombre de paramètres (19), nous avons procédé à un ajustement des paramètres par étapes. D'une part, certains paramètres $\left(\varepsilon_0, \dot{\varepsilon}_0, \tau_N^{eq,0}\right)$ n'ont pas de signification physique simple (cf. §III.3.), et servent à éviter des problèmes de singularité ou d'inhomogénéité, d'autres paramètres sont, par expérience, connus (N, D). Par ailleurs, le niveau de contrainte relaxée régit la contrainte actuelle mesurée sans n'être, toutefois, directement accessible sans essai de

relaxation. Nous avons donc d'abord déterminé les paramètres de la contrainte relaxée $\left(E_0^r, E^r, \varepsilon_{th_R}, \alpha_R, K_{eq}\right)$, lors d'un pré-ajustement, à l'aide des données obtenues en phase finale des essais de relaxation (Figure III.12.). Nous avons considéré que le niveau de contrainte relaxée était le même pour les deux essais par défaut d'information, sur cet état, pour l'essai de cycles de charge et de décharge (Figure III.13.). Le temps de relaxation de référence du processus le plus lent $\tau_N^{r,0}$ (cf. relation III.40.) a également été évalué, lors d'un pré-ajustement, en nous appuyant sur les résultats donnant la variation des temps de relaxation en fonction de la déformation (Tableau III.1.). Cette information n'étant pas non plus accessible lors des essais de charge et de décharge, nous avons admis que ce paramètre ne variait pas entre ces deux séquences de sollicitation. Enfin, le module d'élasticité initial E_0^u a été estimé à l'aide des pentes initiales des essais de relaxation successifs et de cycles de charge et décharge. Les valeurs de ces paramètres pré-ajustés et imposés sont présentées dans le Tableau III.2.

Tableau III.2. Valeurs des paramètres imposés et pré-ajustés

N	D	ε_0	$\tau_N^{eq,0}$ [s]	$\dot{\varepsilon}_0$ [s^{-1}]
30	3	$8x10^{-4}$	$1,5x10^8$	10^{-7}

A

E_0^r [MPa]	E^r [MPa]	α_R	ε_{th_R}	K_{eq} [cm^3/Mol]	E_0^u [MPa]	$\tau_N^{r,0}$ [s]
22	180	1,9	0,08	$-2,2x10^{-3}$	60	$1,3x10^6$

B

A : Paramètres de valeurs imposées ; B : Paramètres de valeurs pré-ajustées

Finalement les paramètres restants ont été ajustés en utilisant les informations restantes sur la contrainte obtenue lors des deux essais de charge et de décharge et des essais de relaxation (Tableau III.3., Figure III.13.).

Tableau III.3. Valeurs des paramètres déterminés en fonction des essais

	E^u [MPa]	α_c	ε_{th_c}	α_d	ε_{th_d}	K_0 [cm^3/Mol]	K_A [cm^3/Mol]
Séquences de relaxation successives	670	1,75	0,070	3	0,048	-2500	-3500
Cycles de charge-décharge	550	1,75	0,095	2.3	0,070	-1000	-3250

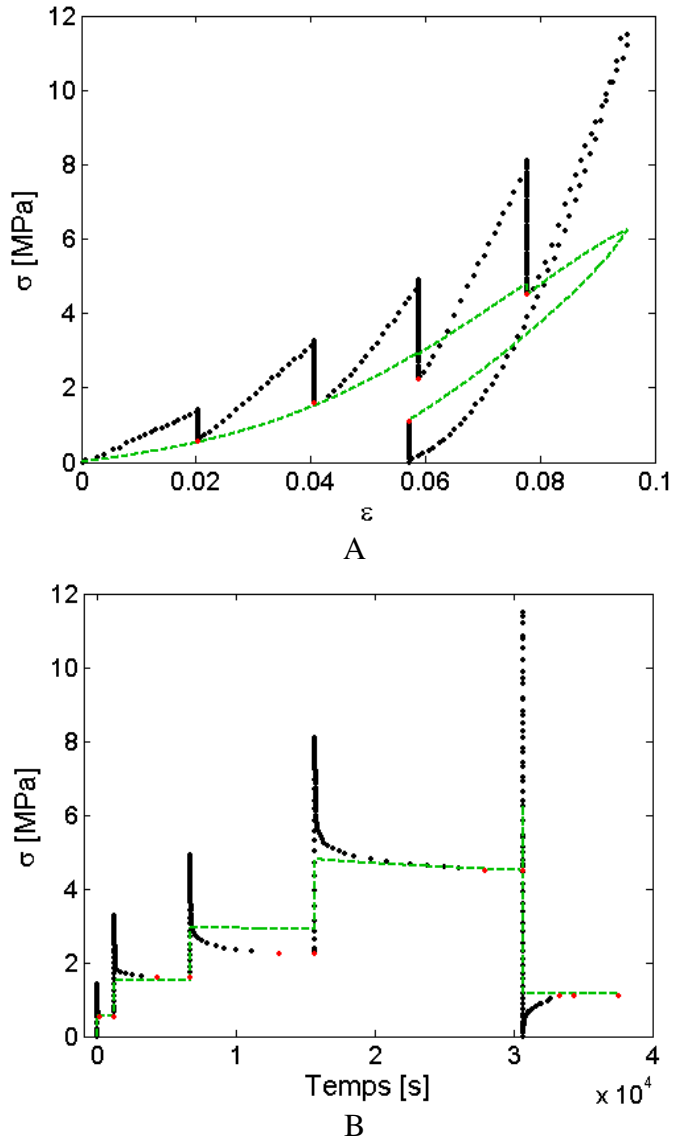


Figure III.12. Pré-ajustement des paramètres de la contrainte relaxée
En noir : résultats expérimentaux ; en rouge : contrainte relaxée expérimentale ;
en vert : contrainte relaxée théorique.

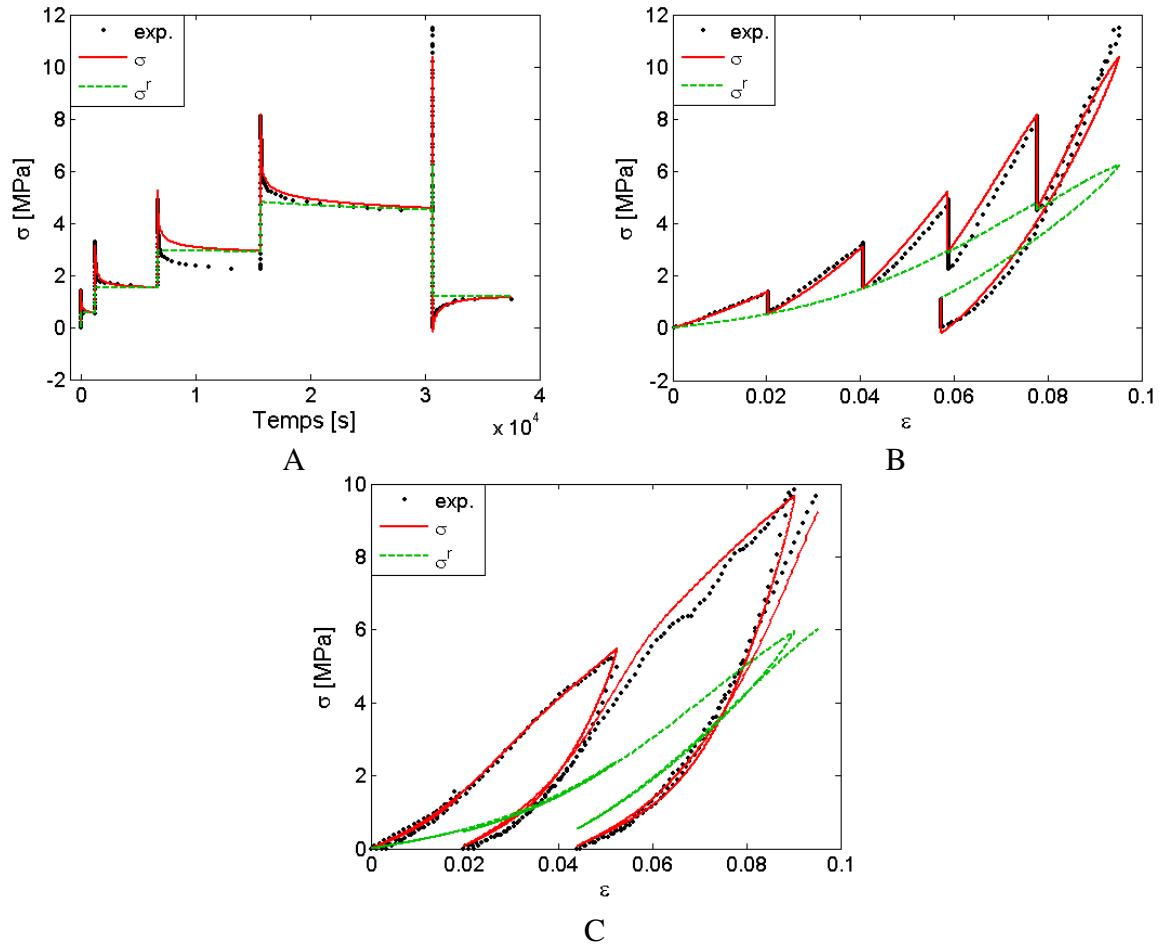


Figure III.13. Confrontation du modèle théorique et des résultats expérimentaux
A et B : Résultats de l'ajustement de paramètres pour les essais de relaxation en fonction du temps et de la déformation ; C : Résultat de l'ajustement de paramètres pour les cycles de charge et de décharge

III.5. ETUDE DE SENSIBILITE

Nous avons ensuite réalisé une étude de sensibilité des paramètres du modèle thermodynamique développé pour décrire le comportement mécanique des tendons. Rappelons que la sensibilité d'un paramètre est donnée par la relation (III.45.) sous la forme normée :

$$S_j^*(t) = \frac{\beta_j}{\sigma(\underline{\beta})} \frac{\partial \sigma^{pert}}{\partial \beta_j}\bigg|_{\beta_i \quad i \neq j} \qquad \textbf{(III.45.)}$$

où S_j^* est la sensibilité vis-à-vis du j^{ème} paramètre, β_j le j^{ème} paramètre, et σ^{pert} la réponse du modèle en contrainte perturbée par le j^{ème} paramètre.

L'étude analytique n'étant pas envisageable, nous avons traité numériquement le problème de l'estimation de la sensibilité de chaque paramètre en partant de l'approximation de (III.45.) suivante :

$$S_j^*(t) = \frac{\beta_j}{\sigma(t)} \frac{\sigma(t) - \sigma^{pert}(t)}{\Delta\beta_j} \qquad \textbf{(III.46.)}$$

où $\sigma(t)$ est la contrainte théorique pour le jeu de paramètres sans pertubation et $\sigma^{pert}(t)$ la contrainte théorique pour le même jeu de paramètres dont le jème paramètre est perturbé par $\Delta\beta_j$.

Les paramètres corrélés linéairement suivent la condition :

$$\exists! K \in \mathbb{R}^*, \forall t, \quad S_i^* = K S_j^* \quad i \neq j \qquad \textbf{(III.47.)}$$

De plus, la matrice de variance-covariance des sensibilités de chaque paramètre a été calculée en supposant l'écart-type du bruit de mesure égale à 1 :

$$V(\beta_i, \beta_j) = \mathrm{cov}(S_i^*, S_j^*) = \frac{1}{n} \sum_{k=1}^{n} \left[S_i^*(t_k) - \overline{S_i^*} \right] \left[S_j^*(t_k) - \overline{S_j^*} \right] \qquad \textbf{(III.48.)}$$

où cov est la covariance[2] de deux paramètres, $\overline{S_i^*}$ et $\overline{S_j^*}$ les sensibilités moyennes sur l'ensemble de l'essai des paramètres i et j et n le nombre de valeurs contenu dans l'essai.

Nous avons classé les paramètres du modèle par ordre de sensibilité pour chacun des deux essais ayant servi à l'ajustement des paramètres. Ainsi, nous avons pu identifier les paramètres (parmi les plus sensibles) à forte corrélation par une approche graphique complétée par une vérification de leur corrélation à l'aide d'une régression linéaire des sensibilités. L'étude portant sur 19 paramètres, nous présenterons uniquement la méthodologie et quelques exemples. Les résultats sont résumés dans les Tableau III.4. et Tableau III.5.

Nous avons appliqué à chacun des paramètres tour à tour une perturbation de 3% autour de sa valeur nominale. Nous avons alors recueilli les valeurs au cours du temps de la contrainte théorique ainsi perturbée, σ^{pert}, et les avons comparées à la contrainte théorique de référence selon la relation (III.46.). La variance de la sensibilité par rapport à chaque paramètre a alors été calculée afin de procéder à un classement des paramètres par ordre de sensibilité décroissante. Les paramètres jugés peu sensibles ont alors été écartés (sensibilité inférieure à 2% en séquences de relaxation successives, et inférieure à 1% pour les cycles de

[2] Si i=j alors la covariance correspond à la variance du paramètre.

charge et décharge), une méthode de pré-ajustement étant nécessaire pour ces derniers. Parmi les paramètres les plus sensibles, une étude de corrélation entre eux a été réalisée d'abord graphiquement en traçant $S_i^* = f\left(S_j^*\right)$ pour les couples de paramètres $\left(\beta_i, \beta_j\right)$ (Figure III.14.). Lorsque la courbe s'approchait d'une droite, une régression linéaire était alors réalisée afin de vérifier la corrélation (Figure III.15. et Tableau III.5.). Les paramètres étaient considérés comme corrélés si le coefficient de corrélation au carré était supérieur à 0,95.

Tableau III.4. Résultats de l'étude de sensibilité selon le test mécanique

Paramètres du modèle	Séquences de relaxation successives		Sollicitation en charge-décharge	
	Variance de S_j^*	Classement	Variance de S_j^*	Classement
E_0^u	**0,06**	**8**	**9,72**	**6**
E^u	**0,54**	**2**	**47,53**	**3**
ε_{th_c}	**2,3**	**1**	**289,87**	**1**
ε_{th_d}	**0,19**	**3**	**132,18**	**2**
α_c	**0,008**	**12**	5,22	9
α_d	**0,23**	**4**	**37,73**	**4**
K_0	**0,004**	**14**	2,78	12
K_A	0,04	10	**5,66**	**8**
$\tau_N^{r,0}$	**0,002**	**16**	**0,19**	**16**
N	**<0,002**	**17**	**0,01**	**18**
D	**<0,002**	**17**	**0,037**	**17**
ε_0	**<0,002**	**17**	**<0,001**	**19**
E_0^r	0,03	11	2,07	13
E^r	**0,12**	**6**	**9,36**	**7**
ε_{th_R}	**0,19**	**5**	**16,8**	**5**
α_R	0,045	9	3,67	11
K_{eq}	**0,09**	**7**	4,36	10
$\tau_N^{eq,0}$	**0,0044**	**13**	**0,21**	**14**
$\dot{\varepsilon}_0$	**0,0023**	**15**	**0,21**	**14**

En rouge les paramètres les moins sensibles ; en bleu les 8 paramètres les plus sensibles ; en noir les paramètres situés entre les deux précédentes catégories.

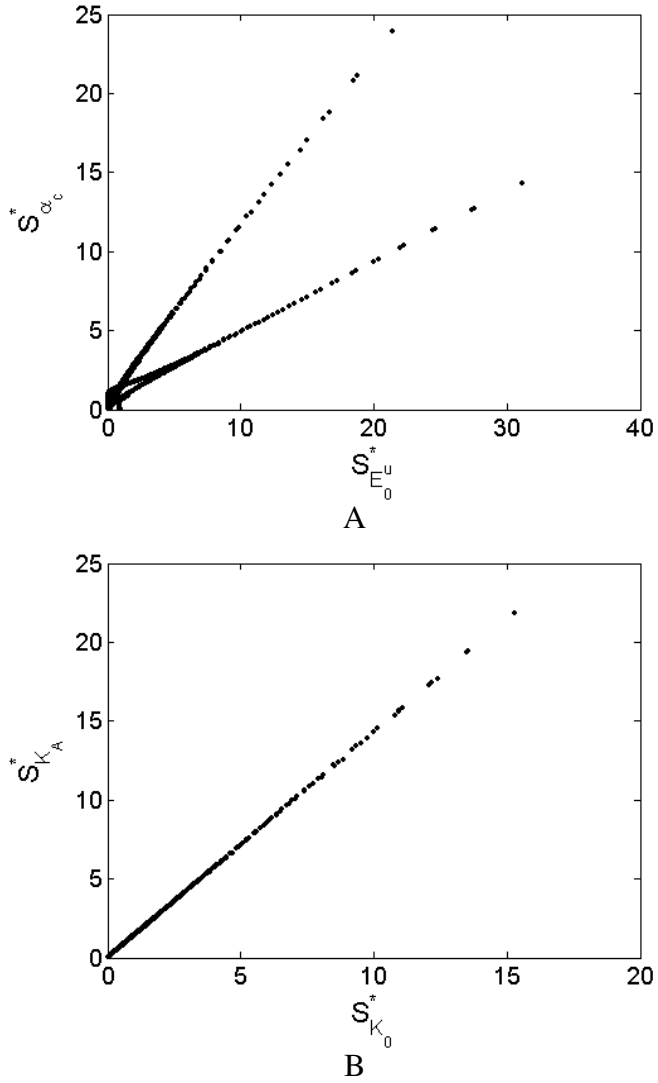


Figure III.14. Exemple de représentation graphique des sensibilités
A : exemple de paramètres non corrélés ; B : exemple de paramètres corrélés

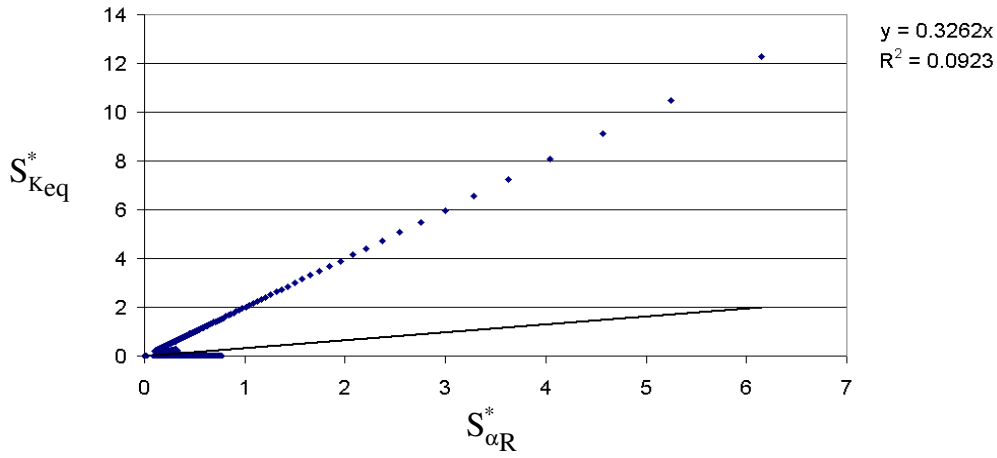


Figure III.15. Exemple de vérification de corrélation de paramètres
Ici, bien que la courbe semble être une droite, la régression linéaire montre qu'il n'y a pas de corrélation des paramètres pour l'essai complet

Tableau III.5. Paramètres sensibles linéairement corrélés

Séquences de relaxation successives		Sollicitation en charge-décharge	
Couples de paramètres corrélés	**Coefficient de corrélation**	**Couples de paramètres corrélés**	**Coefficient de corrélation**
E^u ε_{th_c}	0,998	E^u ε_{th_c}	0,9996
E^u K_A	0,957	E^u ε_{th_d}	0,996
ε_{th_c} K_A	0,952	ε_{th_c} ε_{th_d}	0,996
ε_{th_d} α_d	0,999	K_0 K_A	1
K_0 K_A	1		

Cette analyse fait ressortir la faible sensibilité des paramètres que nous avions choisis de fixer pour des raisons de non-signification physique $\left(\varepsilon_0, \dot{\varepsilon_0}\right)$ ou par manque d'informations $\left(\tau_N^{eq,0}, N, D\right)$. D'autre part, elle a permis de sélectionner les paramètres peu sensibles ou de même sensibilité mais corrélés, nécessitant une méthodologie spécifique d'ajustement. Par exemple, bien que les paramètres de la contrainte relaxée $\left(E_0^r, E^r, \varepsilon_{th_R}, \alpha_R, K_{eq}\right)$ aient un impact fort sur la contrainte observable, leur sensibilité reste modérée lors des tests de relaxation. Il est donc nécessaire, d'ajuster ces paramètres en extrayant les informations pertinentes de ce type d'essais (valeur de la contrainte relaxée et durée pour l'atteindre). Il était donc judicieux de faire un pré-ajustement de ces paramètres. D'autre part, bien qu'ils présentent une sensibilité importante lors des essais de charges et de décharges, ces paramètres ne sont pas aisés à ajuster puisque nous n'avons pas accès à l'évolution de la contrainte relaxée au cours de cette catégorie de test. Nous devons donc, par défaut, utiliser les valeurs des paramètres de l'état relaxé obtenues lors d'essais de relaxation et supposer qu'ils évoluent de la même manière. Enfin, le temps de relaxation du mode le plus lent $\left(\tau_N^{r,0}\right)$ reste peu sensible par rapport aux autres paramètres, et nécessite également un pré-ajustement en utilisant la variation des temps de relaxation en fonction de la déformation.

Il nous reste donc 8 paramètres $\left(E_0^u, E^u, \varepsilon_{th_c}, \varepsilon_{th_d}, \alpha_c, \alpha_d, K_0, K_A\right)$ à ajuster en utilisant l'ensemble de chaque chargement. Parmi ces paramètres, certains sont fortement

corrélés (Tableau III.5.). Bien que corrélés, ces paramètres, $\left(E^u, \varepsilon_{th_c}, \varepsilon_{th_d}, \alpha_d\right)$, sont également très sensibles, à l'exception des paramètres $\left(K_0, K_A\right)$ qui sont complètement corrélés par construction de la loi de comportement (III.41.). De plus, ces deux paramètres jouent le même rôle tant que $\left(\sigma - \sigma^r\right)$ reste positif. Il est donc possible de commencer l'ajustement en évaluant leur somme et en les dissociant lors des décharges où la contrainte observable est inférieure à la contrainte relaxée.

Toutefois, nous constatons que tous les paramètres ne sont pas toujours nécessaires pour un test mécanique donné. En effet, si le test mécanique ne contient pas de décharge, certains paramètres peuvent être inutiles $\left(\varepsilon_{th_d}, \alpha_d ...\right)$. Ainsi, en fonction de l'essai uniaxial que nous souhaitons modéliser, le modèle peut être adapté en ne conservant que les paramètres les plus pertinents.

III.6. DISCUSSION

III.6.1. LES TESTS MECANIQUES

L'étude expérimentale sur les tendons d'Achille de lapins a permis de vérifier et de collecter, sur un type de tendon, un ensemble de propriétés mécaniques rapportées dans la littérature par différents auteurs ([ABRAMOWITCH et WOO, 2004; CIARLETTA *et al.*, 2008; FUNG, 1993; WOO *et al.*, 2006; WREN *et al.*, 2003; YIN et ELLIOTT, 2004]). En effet, de nombreux travaux font état des propriétés mécaniques des tendons ou des ligaments, mais peu d'auteurs présentent un ensemble de propriétés mécaniques d'un même tissu. Or, les propriétés de ces tissus varient d'un type de tendon, ou de ligament, à un autre selon leur fonction, le type d'articulation, et leur composition en collagènes, élastine et protéoglycanes. Outre la variation de comportement en fonction du type de tendon, le conditionnement précédent la campagne d'essais mécaniques, les conditions hydriques, salines et thermiques influencent significativement les résultats des essais. Ne parvenant pas à obtenir, dans la littérature, des tests mécaniques complets (charge, relaxation, décharge, fluage) sur le même type de tissu et dans les mêmes conditions expérimentales, nous avons opté pour la constitution d'une banque de données expérimentales sur le tendon d'Achille de lapin. Nous avons ainsi pu avoir accès à des informations rarement rapportées dans la littérature, comme l'évolution de la contrainte de relaxation et le temps de relaxation en fonction de la déformation.

Au niveau du pré-conditionnement, de nombreux auteurs pratiquent des cycles de chargement en petite perturbation (de l'ordre de 2% de déformation) et à faible vitesse. Selon les auteurs, ce pré-conditionnement peut représenter 10 cycles, ou est appliqué jusqu'à l'apparition d'une stabilisation de l'amplitude maximale de la contrainte cyclique ([CIARLETTA *et al.*, 2008; PIOLETTI, 1997]). Cette pratique est comparable à un échauffement lié à l'activité physique, qui a pour conséquence de changer les propriétés mécaniques du tissu ce qui se traduit, entre autre, par une variation de dissipation perceptible sur les boucles d'hystérésis lors des décharges ([CIARLETTA *et al.*, 2008]). Pourtant, ce pré-conditionnement n'est généralement pas pris en compte dans les modèles. Nous avons donc opté pour un pré-conditionnement influant le moins possible sur l'histoire du chargement en évitant d'appliquer des cycles et en chargeant très lentement le tendon jusqu'à l'obtention d'une pré-tension de 1N après relaxation de 60 minutes afin d'atteindre également l'équilibre thermique à 37°C et salin (niveau physiologique) [ABRAMOWITCH et WOO, 2004].

Une précaution a été prise concernant l'orientation des faisceaux des tendons par rapport aux sollicitations mécaniques. En effet, l'orientation des faisceaux et donc des fibres de collagènes par rapport à la direction de sollicitation est un paramètre dont le contrôle se révèle important notamment pour obtenir des résultats reproductibles [PIOLETTI, 1997]. Notons que les faisceaux du tendon d'Achille ne sont pas tous alignés côte à côte dans la direction longitudinale. Leurs orientations relatives varient les unes par rapport aux autres, allant jusqu'à une orientation hélicoïdale. Ainsi, nous avons pratiqué une « ligature » proche du muscle, pour conserver au mieux leurs orientations respectives et garder la cohésion de l'ensemble du tendon.

Au niveau des résultats expérimentaux, nous avons observé qualitativement les propriétés mécaniques rapportées dans la littérature à vitesse d'étirement constante [ABRAMOWITCH et WOO, 2004; FUNG, 1993; PIOLETTI, 1997; WREN *et al.*, 2003]. Mais nous avons aussi pu remarquer que les tests de relaxation dépendaient de la déformation de façon non-linéaire, dépendance également observée par Provenzano *et al.* et Yin *et al.* [PROVENZANO *et al.*, 2002; YIN et ELLIOTT, 2004]. Nous avons mis en évidence des cycles d'hystérésis lors de cycles de charge et de décharge, ce qui est conforme aux observations de Ciarletta *et al.* [CIARLETTA *et al.*, 2008] ainsi que le phénomène d'adoucissement du matériau lors de cycles de fatigue également observé par Fung, Abramowitch *et al.,* et Weiss *et al.* [ABRAMOWITCH et WOO, 2004; FUNG, 1993; WEISS et GARDINER, 2001].

Du point de vue quantitatif, il est difficile de comparer les résultats du fait des différences de conditionnement et de la grande variété des tissus testés d'une étude à une autre. Toutefois, nous pouvons comparer les modules d'élasticité tangents. Du fait du recrutement de fibres, ce module augmente avec l'étirement et la vitesse d'étirement. Généralement, ce module est mesuré dans la partie « linéaire » de la courbe de réponse contrainte-déformation qui correspond à une zone comprise entre 6 et 10% de déformation. Nous avons pu mesurer un module d'élasticité de 186±74MPa. Tandis que, Nagasawa *et al.* [NAGASAWA *et al.*, 2008] ont mesuré, sur des lapins blancs du Japon de 2,4 à 3,5Kg, un module de 131±11MPa. Ces résultats sont du même ordre de grandeur, les différences pouvant provenir de l'âge (et donc du poids), de la race de lapins et de la vitesse d'étirement plus faible que la nôtre (20mm/min. contre environ 30mm/min.).

Enfin, pour la première fois à notre connaissance, le comportement de l'état relaxé des tendons en charge, mais surtout en décharge, a pu être étudié expérimentalement. En effet, nos expériences montrent que l'état relaxé des tendons d'Achille présentent également une dissipation d'énergie rendant le matériau à cet état dépendant du temps et non purement élastique comme le proposait les modèles publiés jusqu'à présent [ABRAMOWITCH et WOO, 2004; FUNG *et al.*, 1979; PEÑA *et al.*, 2007].

L'ensemble de nos résultats expérimentaux nous permet de cerner de façon assez fine les propriétés du tendon d'Achille à vitesse d'étirement constante dans la direction longitudinale. Pour une vision plus exhaustive des propriétés de ce matériau, nous pouvons imaginer de réaliser des essais à vitesse croissante ainsi qu'une analyse par viscoanalyseur permettant de mieux appréhender l'évolution du module complexe en fonction de la fréquence et l'effet de la vitesse sur la réponse en contrainte.

Pour l'instant, nous avons choisi d'adapter le formalisme thermodynamique aux sollicitations isothermes à vitesse de déformation contrôlée.

III.6.2. LE MODELE

La modélisation que nous avons proposée (Figure III.11.) permet de rendre compte du comportement macroscopique des tendons à partir d'une description du VER des phénomènes fortement non-linéaires dépendant de l'histoire du chargement et caractéristique des tendons. Ainsi, nous avons pu y intégrer une description de type composite associant une partie non-fibrillaire représentant la substance fondamentale et une partie fibrillaire impliquant la théorie de recrutement de fibres de collagènes, préalablement proposé par De Vita *et al.* [DE VITA et

SLAUGHTER, 2006] (équation III.40.). Les résultats d'ajustement des paramètres du modèle montrent clairement que le module d'élasticité fibrillaire $\left(E^u\right)$ ne concerne pas uniquement les fibres de collagènes de type I. En effet, il est actuellement admis que le module des fibres de collagène I est compris entre 1 et 10GPa [SASAKI et ODAJIMA, 1996; VESENTINI *et al.*, 2005], la dispersion des estimations étant due à la difficulté de mesurer précisément la section d'une fibre de collagène. Nous avons estimé un module apparent de la partie fibrillaire bien inférieur : 550 à 670MPa lorsque toutes les fibres sont tendues. Cette différence significative peut s'expliquer comme étant liée à une homogénéisation de l'ensemble des fibres intervenant dans le transfert des efforts au sein des tendons. Ainsi, nous pouvons supposer que d'autres molécules, comme l'élastine ou les protéoglycanes, peuvent intervenir.

Notre modèle propose de relier l'énergie d'activation des processus dissipatifs à l'écart entre la réponse en contrainte et la contrainte à l'état relaxé, *via* un volume d'activation apparent (relation III.42.). Les résultats d'ajustement des paramètres aux expériences conduisent à deux volumes d'activation apparents distincts en fonction du signe de l'écart entre la réponse en contrainte et la contrainte relaxée $\left(\sigma - \sigma^r\right)$. En effet, les volumes d'activation apparents ont été estimés, pour le test de relaxation, à -6000 et 1000cm^3Mol^{-1} respectivement pour $\sigma > \sigma^r$ et $\sigma < \sigma^r$ et à -4250 et 2250cm^3Mol^{-1} pour l'essai cyclique de charge et de décharge. Ces valeurs nous renseignent sur le volume caractéristique des réarrangements de liaisons et par conséquent sur une longueur caractéristique, en supposant en première approximation que ce volume est sphérique. Nous obtenons ainsi les diamètres caractéristiques suivants : 2,7nm et 2,4nm si $\sigma > \sigma^r$, et 1,5nm et 2nm si $\sigma < \sigma^r$, respectivement pour les essais de relaxation successifs et de cycles de charge et décharge. Il semble donc que deux structures différentes interviennent lors de ces sollicitations mécaniques. Au vu des valeurs obtenues dans les deux cas, les fibrilles de collagènes interviennent que ce soit avec des liaisons inter-fibrillaires $\left(\sigma > \sigma^r\right)$ ou intra-fibrillaires $\left(\sigma < \sigma^r\right)$. Les liaisons inter-fibrillaires pourraient correspondre au complexe protéoglycane-fibrille de collagène permettant la cohésion entre fibrilles de collagènes *via* les GAGs [DANIELSON *et al.*, 1997; WEBER *et al.*, 1996]. Cette observation est cohérente avec la valeur du module élastique de la partie fibrillaire $\left(E^u\right)$. En effet, si le complexe protéoglycane-fibrille de collagène intervient dans la transmission d'efforts, il est normal que

le module d'élasticité global soit plus faible que celui mesuré pour des fibres de collagène I (de 1 à 10GPa, [SASAKI et ODAJIMA, 1996; VESENTINI *et al.*, 2005]). Toutefois, cette modélisation de la transmission des efforts par ce complexe est régulièrement réfutée [FESSEL *et al.*, 2008; PROVENZANO et VANDERBY, 2006], bien que des études réalisées par Danielson *et al.* [DANIELSON *et al.*, 1997] montrent que la décorine joue un rôle crucial dans l'obtention de fibres de collagènes saines.

Le spectre des temps de relaxation, ainsi que la modélisation de son évolution en fonction de la déformation, bien que semi-empirique, est cohérent avec les spectres de temps de relaxation rapportés dans la littérature. En effet, à l'aide de nos paramètres ajustés aux résultats de nos expériences, nous avons pu simuler une expérience, rapportée par Abramowitch *et al.* [ABRAMOWITCH et WOO, 2004] faite sur des LLE de mouton. Nous avons obtenu un spectre de temps de relaxation s'étendant de 1 à 1048s, alors que les auteurs avaient estimé ce spectre entre 0,54 et 1602s. Les différences sont relativement faibles compte tenu des différences de tissus et d'échantillon.

Enfin, ce modèle intègre, pour la première fois à notre connaissance, le comportement du tissu à l'état relaxé afin d'approcher au mieux le comportement des tendons et ligaments mis en évidence par les tests mécaniques réalisés (cf. §III.1.2.).

III.6.3. AJUSTEMENT DES PARAMETRES DU MODELE

Pour intégrer les effets de non-linéarité du comportement mécanique des tendons, dans un modèle, il est nécessaire de prendre en compte un nombre élevé de paramètres. Cependant, il n'est pas aisé d'ajuster tous ces paramètres simultanément. Comme l'a montré l'étude de sensibilité, certains paramètres sont soit trop peu sensibles soit trop fortement corrélés pour pouvoir les ajuster en une seule fois. De plus, comme nous l'avons déjà souligné, selon le test mécanique réalisé, les informations correspondant à tel ou tel phénomène (par exemple à l'état relaxé), ne sont pas toujours directement accessibles.

Ainsi, les méthodes d'optimisation habituellement utilisées telles que la méthode du gradient, Gauss-Newton ou même celle de Levenberg-Marquart, qui dépendent fortement de l'uplet de paramètres initialement proposés, ne permettraient pas de trouver la meilleure solution de façon univoque. Ces méthodes donnent accès à des minima, qu'ils soient locaux ou globaux, or, le modèle étant fortement non-linéaire, il peut exister un nombre élevé de minima locaux, il devient alors nécessaire de tester un grand nombre d'uplets initiaux. Nous pensons donc qu'il est nécessaire de prévoir une séquence de pré-ajustement des paramètres

en extrayant des résultats expérimentaux, les informations utiles à chaque groupe de paramètres (cf. §III.4.).

Toutefois, la question de l'ajustement automatique des paramètres se pose. Un ajustement automatique permettrait en effet d'assurer une certaine reproductibilité de l'ajustement d'un test mécanique à l'autre ou de comparer plusieurs applications du même modèle. Pour cela, des méthodes d'optimisation globales et non locales doivent être employées, telles que les algorithmes génétiques par exemple. Ces méthodes permettent d'obtenir le minimum global d'une fonction, s'il existe, quel que soit le nombre de paramètres. Par contre, étant fondées sur l'obtention d'une « population » sélectionnée selon ces caractères à chaque génération, ces méthodes requièrent un grand nombre d'itérations (de générations). La population d'individus doit être suffisamment grande pour couvrir l'espace des valeurs admissibles à chaque paramètre servant de « gène » aux individus de la population ainsi définie. Le temps de calcul s'en trouve donc fortement augmenté par rapport aux méthodes « classiques ». Ainsi, des méthodes dites hybrides ont été développées afin d'accélérer l'optimisation par le couplage d'une méthode génétique, pour approcher les paramètres au voisinage du minimum global, à une méthode classique du type Levenberg-Marquart, pour déterminer les valeurs des paramètres du minimum global.

III.7. CONCLUSION

Les expériences réalisées sur les tendons d'Achille de lapin blanc de Nouvelle-Zélande, nous ont permis de proposer une approche globale du comportement mécanique de ce type de tissu sollicité en traction simple dans la direction longitudinale, à 37°C et dans un milieu physiologique. Nous avons pu modéliser les non-linéarités du comportement des tendons, déjà reconnues par la communauté scientifique, et nous avons également mis en évidence l'existence de l'état relaxé ainsi que de la dépendance de cet état vis-à-vis de l'histoire de chargement (Figure III.6.). La forte dépendance des tendons vis-à-vis de l'histoire de la sollicitation mécanique a soulevé la question du pré-conditionnement des tendons avant l'expérience qui n'est pas pris en compte par la plupart des modèles.

A notre connaissance, aucun des modèles actuels ne permet de décrire les chargements complexes réalisés, nous avons donc été amenés à développer ce nouveau modèle. Rappelons que les dernières avancées en ingénierie tissulaire en régénération, *in vivo*, des tendons nécessitent le développement d'un modèle unifié permettant de décrire le comportement mécanique des tissus sains selon différents tests mécaniques. En effet, actuellement l'évaluation mécanique des tendons en ingénierie tissulaire se limite dans la majorité des cas à

une comparaison d'essais de traction uniaxiale. Or ces tests sont peu pertinents pour cerner de façon précise les propriétés des tendons et risquent de devenir assez vite obsolètes si nous voulons évaluer correctement les tendons régénérés par rapport aux tendons sains. Par conséquent, pour affiner l'évaluation, la prise en compte des effets dissipatifs de ces tissus est nécessaire. De plus, pour ne pas réaliser des études essentiellement qualitatives, l'ingénierie tissulaire doit se doter de modèles physiques permettant de quantifier et d'établir une base de comparaison objective des paramètres physiques pour les différents tissus explorés (les tendons et ligaments en ce qui nous concerne).

Les premiers résultats fournis par notre modèle coincident avec les ordres de grandeur des paramètres physiques rapportés dans la littérature, lorsque la comparaison est possible. Bien que d'ores et déjà performant, ce modèle devra être complété par confrontation avec une base de données expérimentales issue d'essais à vitesse de déformation variable et d'essais de fatigue.

La performance du modèle est indissociable d'un nombre important de paramètres, et une méthode d'optimisation de minimum global pour l'ajustement des paramètres est nécessaire au développement futur du modèle et à l'évaluation des structures et tissus utilisés en ingénierie tissulaire des tendons et des ligaments. En attendant une telle méthode, une procédure d'ajustement des paramètres en fonction de leur signification physique a été mise en place et pourra constituer pour l'avenir une première estimation.

Chapitre IV :
EVALUATION MECANIQUE DES STRUCTURES DE SUBSTITUTION DES TENDONS

Dans le chapitre précédent, nous avons présenté un modèle thermodynamique appliqué aux tendons qui permet de décrire la réponse à des sollicitations mécaniques plus ou moins exigeantes. Outre l'intérêt académique que représente le développement d'un modèle intégrant un grand nombre des propriétés mécaniques d'un tel matériau, c'est l'évaluation et la comparaison, dans une plage de déformations physiologiques, des structures de substitution aux tendons et ligaments utilisées en ingénierie tissulaire qui ont motivé nos investigations. Un modèle élaboré exige souvent un grand nombre de paramètres. C'est pourquoi, nous proposons, dans ce chapitre, une première procédure d'évaluation des tendons et ligaments n'utilisant qu'une partie des propriétés, jugées pertinentes. Cette procédure, tout en étant plus précise que les tests actuellement réalisés en ingénierie tissulaire, de part la réduction du nombre de paramètres, devrait faciliter la comparaison des matériaux à partir de ces paramètres.

Dans ce chapitre, nous allons nous efforcer, dans un premier temps, de présenter cette procédure par le choix des différentes sollicitations mécaniques, puis de la tester sur deux structures de substitution utilisées en ingénierie tissulaire des tendons et ligaments (cf. §IV.3.3.).

IV.1. PROPOSITION DE PROCEDURE D'EVALUATION

Nous avons présenté différents aspects des propriétés mécaniques des tendons : non-linéarités de la contrainte observable et relaxée, corrélation entre spectre des temps de relaxation et déformation, etc. (cf. §III.1.). De plus, notre étude bibliographique a montré que la décharge était insuffisamment décrite par la plupart des modèles classiques. Seuls Ciarletta *et al.* confrontent leur modèle à un cycle de charge et de décharge [CIARLETTA *et al.*, 2008].

En tenant compte des différentes observations expérimentales, nous avons élaboré un test de chargement mécanique rendant compte d'un maximum de non-linéarités des tendons tout en gardant à l'esprit la nécessité de réduire le nombre des paramètres du modèle. Les non-linéarités que nous avons choisies de conserver pour l'évaluation des structures de substitution sont : le recrutement de fibres, la dissipation permettant le passage de l'état activé à l'état relaxé et les processus mis en jeu lors de la décharge. Nous rappelons que la dissipation, dans notre modèle (Figure III.11.), permettant le passage de l'état activé à l'état relaxé comprend la dépendance du spectre des temps de relaxation à la déformation ainsi que le volume d'activation apparent. Nous avons choisi de ne pas tenir compte de la dépendance de l'état relaxé vis-à-vis du chargement dans le but de limiter le nombre de paramètres à

comparer. Nous adopterons donc une forme élastique parmi celle déjà utilisée pour décrire le comportement des tendons et ligaments en traction simple.

Ainsi, pour rendre compte du recrutement de fibres, nous proposons de réaliser un chargement uniaxial, à vitesse d'élongation constante de $0{,}02s^{-1}$, dans la direction longitudinale du tendon donnant ainsi accès aux paramètres $E_0^u, E^u, \varepsilon_{th_c}$ et α_c. La dissipation pourra être caractérisée par des essais de relaxation permettant ainsi d'accéder à la fois au spectre des temps de relaxation, son évolution en fonction de la déformation et le volume d'activation. Nous rappelons que le modèle comporte deux volumes d'activation dépendant du signe de $\left(\sigma - \sigma^r\right)$. Nous proposons donc de réaliser deux essais de relaxation successifs à deux déformations différentes en charge, ainsi nous aurons accès aux paramètres $\tau_N^{r,0}$ et $K_0 + K_A$. Ceci permet de rendre compte des phénomènes précités sans rendre le test d'évaluation trop long. Enfin, les processus mis en jeux lors des décharges peuvent être mis en évidence lors d'une décharge. Une seule décharge permet à la fois, la mise en évidence des processus de décharge et de faire l'hypothèse que l'effet dissipatif sur la contrainte relaxée reste faible. Nous avons remarqué, lors des séquences de relaxation successives, que les paramètres de relachement de fibres $\left(\varepsilon_{th_d}, \alpha_d\right)$ étaient importants dans la fin de la décharge. En effet, la réponse en contrainte, lors d'une décharge, est pratiquement linéaire en début de décharge et seulement en fin de décharge le module tangent décroît fortement. Par conséquent en choisissant de limiter la décharge à une faible amplitude, nous pourrons faire l'hypothèse que la diminution du module d'élasticité reste faible, permettant ainsi de s'affranchir de ces paramètres et de ne conserver que le paramètre K_A.

Pour résumer, nous proposons de réaliser des essais d'évaluation à vitesse d'élongation constante en charge et en décharge de $0{,}02s^{-1}$, comprenant deux relaxations dans une plage de déformation physiologique, aux élongations respectives de 1,04 et 1,06 suivies d'une décharge jusqu'à une élongation de 1,05.

IV.2. ADAPTATION DU MODELE

Comme nous l'avons précisé précédemment, le chargement mécanique proposé a été imaginé dans le but d'une évaluation quantitative, tout en s'affranchissant de certains paramètres $\left(E_0^r, E^r, \varepsilon_{th_R}, \alpha_R, \tau_N^{eq,0}, K_{eq}, \dot{\varepsilon}_0, \varepsilon_{th_d}, \alpha_d\right)$. Bien que ce chargement comporte une

décharge, nous faisons l'hypothèse que les effets dissipatifs sur la contrainte de relaxation sont faibles car l'amplitude de la décharge est limitée. Ainsi, la contrainte de relaxation peut être supposée purement élastique et prendre la forme d'un recrutement de fibres. N'ayant observé que trois points de l'évolution de la contrainte relaxée (à 1 ; 1,04 et 1,06), nous proposons d'utiliser un modèle à deux paramètres déjà employé dans la littérature pour décrire le comportement des tendons et ligaments : le modèle de Mooney-Rivlin à deux paramètres pour les matériaux incompressibles [WEISS et GARDINER, 2001].

$$\sigma^r = C_{10}\left(\lambda^2 - \frac{1}{\lambda}\right) + C_{01}\left(\lambda - \frac{1}{\lambda^2}\right) \qquad \textbf{(IV.1.)}$$

De plus, le fait que l'amplitude de la décharge reste faible (passage de 1,05 à 1,04 en élongation) permet de faire l'hypothèse que le relâchement de fibres n'influe que modérément sur la variation du module élastique apparent pour les raisons évoquées ci-dessous. Le module d'élasticité effectif (III.40.) de la contrainte mesurée $\left(E^{u,eff}\right)$ s'écrit alors :

$$E^{u,eff} = E_0^u + E^u\left[1 - \exp\left(-\left(\frac{\varepsilon}{\varepsilon_{th}}\right)^{\alpha}\right)\right] \qquad \textbf{(IV.2.)}$$

Pour résumer, nous proposons une version simplifiée du modèle mécanique du tendon d'Achille sous la forme suivante :

$$\begin{cases} \dot{\sigma} = E^{u,eff}\dot{\varepsilon} - \sum_{j=1}^{N}\left(\dfrac{\sigma_j - p_j^{r,0}\sigma^r}{\tau_j^{r,0}\left(\varepsilon+\varepsilon_0\right)^2 a\left(\sigma,\sigma^r\right)}\right) \\ E^{u,eff} = E_0^u + E^u\left[1 - \exp\left(-\left(\dfrac{\varepsilon}{\varepsilon_{th}}\right)^{\alpha}\right)\right] \\ \sigma^r = C_{10}\left(\lambda^2 - \dfrac{1}{\lambda}\right) + C_{01}\left(\lambda - \dfrac{1}{\lambda^2}\right) \\ a = \exp\left[\dfrac{K_0\,|\sigma - \sigma^r| + K_A(\sigma - \sigma^r)}{RT}\right] \\ \tau_j^{r,0} = \tau_N^{r,0}\,10^{-D\left(\frac{N-j}{N-1}\right)} \\ p_j^{r,0} = \dfrac{\sqrt{\tau_j^{r,0}}}{\sum_{k=1}^{N}\sqrt{\tau_k^{r,0}}} \end{cases} \qquad \textbf{(IV.3.)}$$

Il est à remarquer que nous avons réduit le modèle à 12 paramètres $\left(E_0^u, E^u, \varepsilon_{th}, \alpha, \tau_N^{r,0}, \varepsilon_0, K_0, K_A, N, D, C_{10}, C_{01}\right)$ dont 3 sont fixés (ε_0, N, D, cf. §III.3.). Ainsi, il ne reste plus que 9 paramètres à ajuster, nombre de paramètres comparable aux modèles déjà existants, de 5 à 11 paramètres ([FUNG, 1993; PEÑA *et al.*, 2007; PIOLETTI et RAKOTOMANANA, 2000].

IV.3. MATERIELS ET METHODES

IV.3.1. SOLLICITATIONS IMPOSEES

Nous avons utilisé le même dispositif expérimental que celui décrit au chapitre précédent (cf. §III.1.1.2.) : soit une machine de traction bicolonne munie d'un bain thermostaté à 37°C contenant de l'eau salée à 0,9% (w/v). Seuls les mors et la valeur de la pré-tension ont été adaptés aux structures testées. Les différences de dispositifs et de pré-tension seront précisées pour chaque structure lors de leur présentation.

Après montage du dispositif, attente de l'équilibre thermique et salin (60min.), et mise à zéro du capteur de force, nous avons imposé à chaque structure le même chargement de traction simple longitudinale :

- une traction à vitesse d'élongation constante ($0,02s^{-1}$) jusqu'à une élongation de 1,04 ;
- une relaxation de 3500s ;
- une deuxième traction à vitesse constante ($0,02s^{-1}$) jusqu'à une élongation de 1,06 ;
- une deuxième relaxation de 7000s ;
- une décharge à vitesse constante ($0,02s^{-1}$) jusqu'à une élongation de 1,05 ou jusqu'à annulation de la force ;
- une troisième relaxation de 3000s :
- une troisième traction à vitesse constante ($0,02s^{-1}$) jusqu'à une élongation de 1,08 :
- une troisième décharge à vitesse constante ($0,02s^{-1}$) jusqu'à l'élongation de 1,05 ;
- une dernière charge à vitesse constante ($0,02s^{-1}$) jusqu'à une élongation de 1,1.

Les amplitudes d'élongation du début de chargements ont été choisies pour les raisons évoquées au paragraphe §IV.1., les durées des phases de relaxation ont été choisies en se fondant sur nos connaissance des temps de relaxation des tendons d'Achille aux élongations choisies. La fin du chargement permet de complèter les comportements étudiés en début de chargement par la mise en évidence de la dépendence de la contrainte relaxée vis-à-vis de l'histoire du chargement (relaxation après décharge) et le comportement de ces tissus sous sollicitations cycliques. Par conséquent, la fin du chargement, qui ne servira pas à la

détermination des paramètres du modèle simplifié, permettra de vérifier que les comportements du modèle restent réalistes et que les choix de simplification sont judicieux.

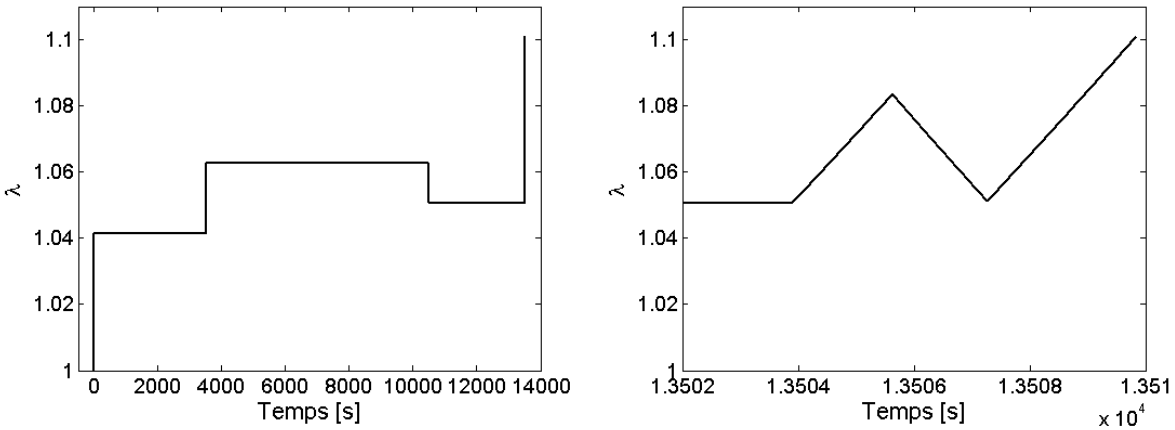
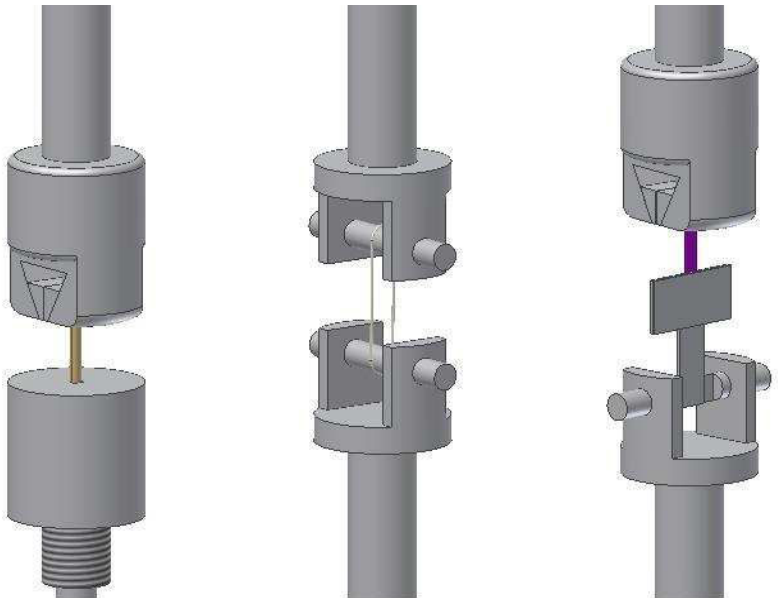


Figure IV.1. Chargement appliqué aux structures étudiées

A gauche chargement complet en fonction du temps ; à droite agrandissement de la fin du chargement.

IV.3.2. TENDONS D'ACHILLE

Pour cette expérience (Figure IV.1.) trois tendons d'Achille ont été prélevés sur trois lapins blancs de Nouvelle-Zélande, de 3,6 à 4,5 Kg, selon la procédure déjà présentée au chapitre précédent (cf. §III.1.1.1.). Les tests mécaniques ont été réalisés dans les 4 heures suivant le prélèvement. La procédure de montage du dispositif expérimental était la même que pour les précédents tendons (cf. §III.1.1.2.)



A **B** **C**

Figure IV.2. Représentation schématique des différents mors utilisés pour l'évaluation

Présentations des mors utilisés lors des tests en fonction de la structure utilisées : pour les tendons (A), pour la matrice en fibres torsadées (B), pour la matrice en fils de suture tricotés (C)

IV.3.3. MATRICES DE SUPPORT

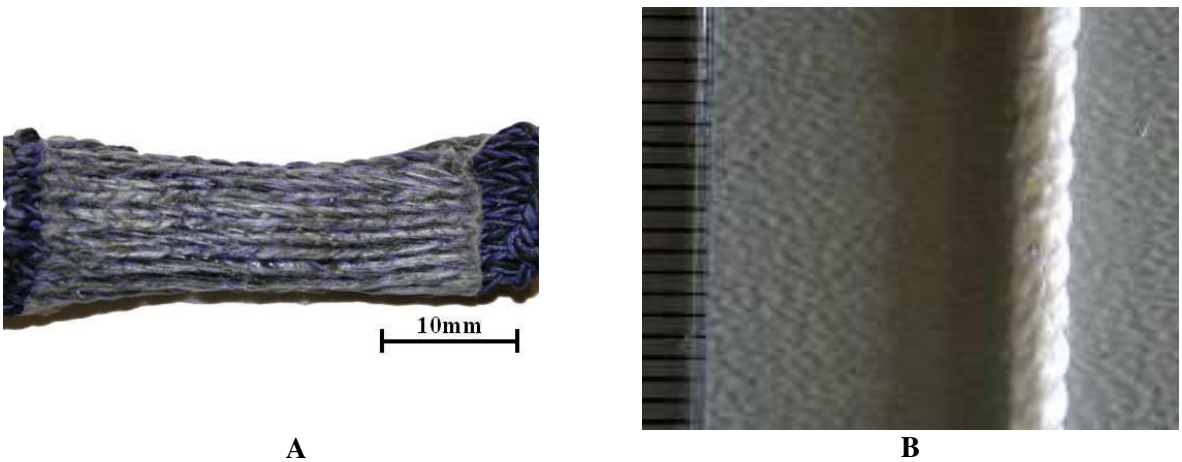
Nous avons choisi deux matrices de support utilisées en ingénierie tissulaire de ligaments et de tendons pour illustrer notre propos.

IV.3.3.1. Matrice en fibres de soie torsadées

Des matrices en fibres de soie blanche (provenant de cocons de chenille du Bombyx) torsadées (Figure IV.3.B.) ont été fabriquées, selon la méthode décrite par Horan *et al.* [HORAN *et al.*, 2006], par le laboratoire du Pr. H.Q. Chen (Université de Sichuan, Chine) et testées mécaniquement par nos soins.

Ce type de structure a dernièrement été utilisé pour réaliser une étude des effets de torsion cyclique et de facteurs de croissance sur des CSMM [MOREAU *et al.*, 2008].

Cette structure étant de forme cylindrique, nous avons utilisé un modèle de mors de forme cylindrique comme le montre la Figure IV.2.B, en fermant la boucle ainsi formée autour des mors à l'aide d'un nœud coulant permettant de diminuer les concentrations de contraintes au niveau du nœud tout en évitant le glissement après mise sous tension. Nous avons appliqué une pré-tension de 5N pour éliminer le glissement initial possible dû au nœud coulant, puis nous avons mesuré la longueur initiale entre les axes des mors et la section apparente de l'échantillon en l'approximant à un disque.



A **B**

Figure IV.3. Matrices de support étudiées

A : Matrice à 4 fils de suture (soie noire et Vicryl violet) tricotés et recouvert de microfibres de PLCL ;
B : Matrice de fibres de soie blanche torsadées (fournies par Pr. H.Q. Chen, Université de Sichuan, Chine)

IV.3.3.2. Matrice tricotée / microfibrillaire

Des études préléminaires [VAQUETTE, 2008] sur la matrice de support utilisée pour les expériences réalisées avec le bioréacteur (cf. §II.3.1.2.), ont montré que la structure présente un comportement mécanique en contrainte similaire aux tendons en traction simple et en cycle. Toutefois, cette structure ne permet pas de transmettre des efforts suffisants puisque sa force à la rupture est d'environ 50N, bien plus faible que les efforts à transmettre par un tendon d'Achille. Nous avons profité de cette étude pour essayer de renforcer la structure afin d'améliorer les propriétés mécaniques de cette matrice de support. Ainsi, nous avons conservé la structure en tricot, mais en tricotant un faisceau de 4 fils de suture 4-0 (deux fils de soie noires et deux fils de Vicryl, formé de PLGA) sur 15 rangs avec 8 mailles par rang (Figure IV.3.A). Sur cette structure tricotée, nous avons déposé des fibres de PLCL par electrospinning comme précédemment (cf. §II.3.1.2.).

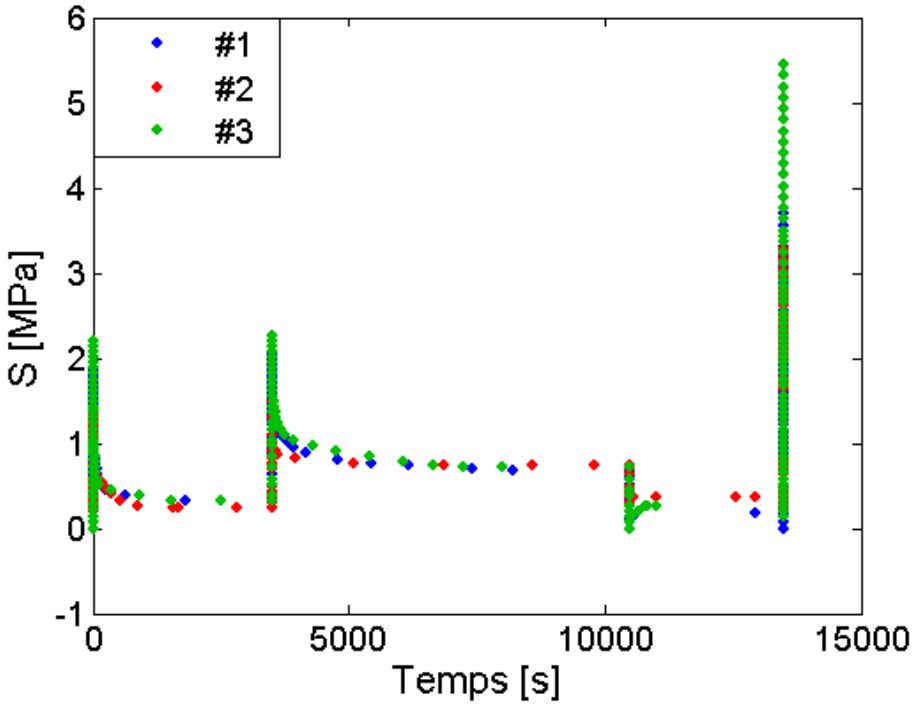
La structure étant de forme plate, nous avons remplacé le mors inférieur par un mors plat (Figure IV.2.C). Une pré-tension de 5N a été appliquée afin d'assurer que la matrice soit bien pré-tendue. La longueur initiale entre les mors et la section apparente de la matrice ont été mesurées en début d'expérience en approximant sa section à une aire rectangulaire.

IV.4. RESULTATS

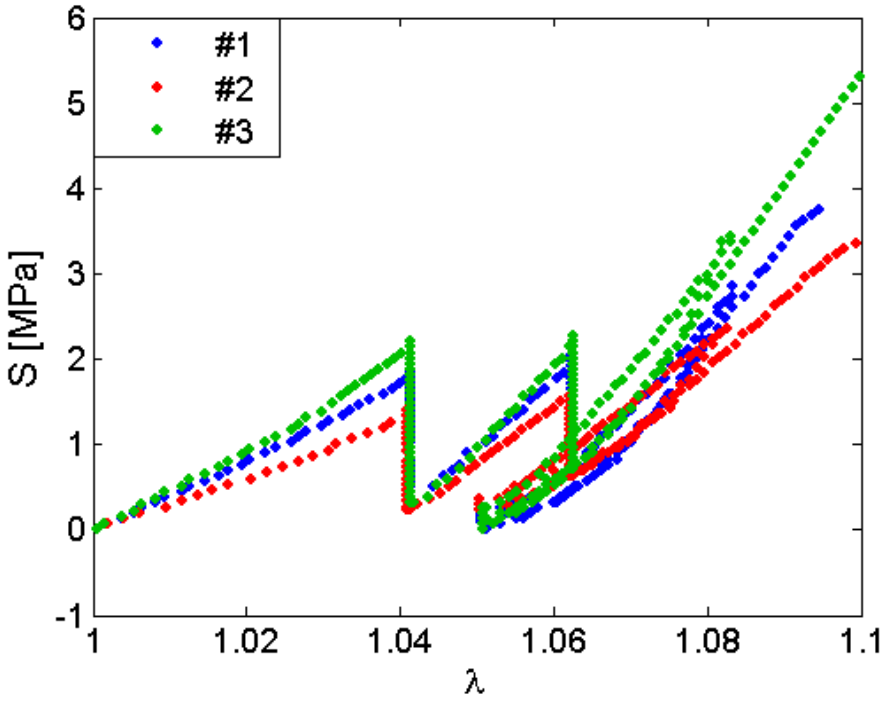
IV.4.1. RESULTATS EXPERIMENTAUX

Nous avons réalisé le chargement mécanique (cf §IV.3.1.) sur trois tendons d'Achille provenant de trois lapins permettant ainsi d'obtenir une première évaluation de la dispersion des résultats d'un tendon à l'autre. Ces résultats sont présentés à la Figure IV.4. et dans le Tableau IV.1. Nos pouvons remarquer que le comportement mécanique des tendons d'Achille testés à l'aide de ce chargement, est comparable à celui observé lors des premiers tests évoqués au chapitre précédent (cf. §III.1.1.2.). Les légères différences d'amplitude de la contrainte avec la précédente étude peuvent provenir du poids des animaux testés. En effet, les lapins pour cette expérience étaient moins gros car plus jeunes, un manque de maturité des tendons d'Achille pourrait donc expliquer ces différences. En revanche, leur comportement est homogène et semblable à ceux évoqués au chapitre III, à savoir : un temps de relaxation fonction de niveau de déformation, une contrainte relaxée qui dépend de l'histoire de chargement, un module tangent qui croît progressivement avec la déformation, et enfin, une décroissance en décharge du module tangent significativement plus rapide que son augmentation en charge (cf. §III.1.2. et Figure IV.4.). Nous pouvons donc considérer que cet échantillonnage de tendons d'Achille de lapin est représentatif de leurs comportements. Ces

essais peuvent donc servir de référence pour estimer les paramètres mécaniques identifiés par le modèle en vue d'une confrontation avec les structures vouées à les substituer.



A



B

Figure IV.4. Réponse des tendons d'Achille de lapin au chargement

A : Réponse des tendons en fonction du temps ; B : Réponse des tendons en fonction de l'élongation

Tableau IV.1. Résultats expérimentaux caractéristiques de la relaxation et de la rupture

		Section [mm^2]	Temps de relaxation [s]	Contrainte relaxée [MPa]	Force à la rupture [N]
Tendon d'Achille (n = 3)	1,04	15,40±0,25	1631±125	0,3±0,1	387±84
	1,06		3674±230	0,7±0,0	
	1,05 (après décharge)		137±123	0,3±0,1	
Matrice en fibres torsadées (n = 1)	1,04	1,02	2502	8,8	139
	1,06		3904	13,0	
	1,05 (après décharge)		0	0	
Matrice en fils tricotés (n = 1)	1,04	10,20	24	1,0	391
	1,06		298	1,3	
	1,05 (après décharge)		86	0,8	

Le chargement a ensuite été appliqué sur deux structures différentes (cf. §IV.3.3.2. et §IV.3.3.1.) servant de substitut en ingénierie tissulaire de ligament. Les résultats de ces tests mécaniques sont présentés à la Figure IV.5. : A et B pour la matrice en fibres de soie torsadées, et C et D pour celle en fils de suture tricotés. Les résultats expérimentaux sur les tests de relaxation et de rupture ont été regroupés dans le Tableau IV.1.

Ces résultats montrent qualitativement d'importantes différences entre-elles mais également avec les tendons d'Achille. En effet, la structure en fibres de soie torsadées présente des contraintes très élevées dues à sa section très faible(1,02mm^2) par rapport à celle d'un tendon réel (≈15,40mm^2). Par exemple, à l'élongation de 1,04 (Figure IV.5.A et B et Tableau IV.1.), cette structure oppose une contrainte de 12,5MPa contre de 1,4 à 2,2MPa pour les tendons au même niveau d'élongation, pourtant ces contraintes représentent une force transmise de seulement 12N contre environ 25,8N pour les tendons. En revanche, la structure tricotée présente une contrainte plus proche de celle des tendons (1,6MPa en contrainte à l'élongation de 1,04), mais la force transmise y correspondant reste faible (15N).

Au niveau du comportement en relaxation, la strucutre torsadée a des temps de relaxation comparable à ceux des tendons sauf après la décharge (Tableau IV.1.). Par contre, la structure tricotée présente des temps de relaxation bien plus courts que ceux des tendons (de l'ordre de la centaine de seconde pour la structure contre quelques milliers de secondes pour les tendons) traduisant une différence de viscosité. D'autre part, le taux de relaxation (rapport de la contrainte relaxée sur la contrainte en début d'essai de relaxation), pour les deux structures, sont bien plus élevés que les tendons (de 0,6 à 0,7 pour les structures contre

0,15 à 0,5 pour les tendons). Les tendons ont ainsi une capacité à restituer l'énergie mécanique contrairement aux structures de substitution.

Enfin, le comportement en début de décharge montre que le module d'élasticité de la structure en fibres de soie torsadées est bien plus élevé que celle des tendons alors que celle en fils tricotés se rapproche plus du comportement observé pour les tendons d'Achille de lapin, excepté en « recharge » ou le module tangent de cette structure est plus élevé qu'en fin de décharge contrairement à la structure torsadée (Figure IV.5. B et D).

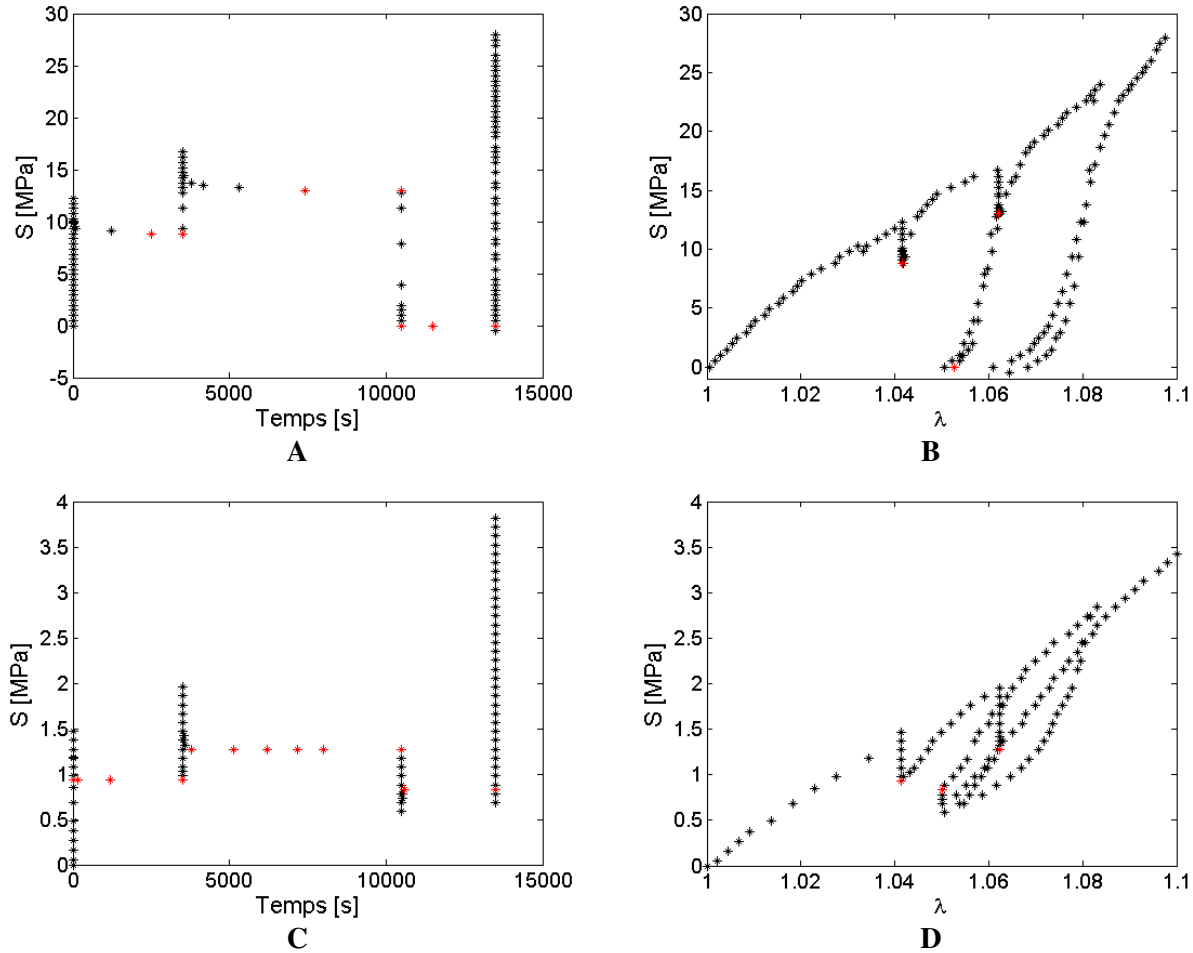


Figure IV.5. Réponse en temps et en élongation des structures au chargement

A et B : Réponse de la matrice de support en fibres de soie torsadées ;
C et D : Réponse de la matrice de support en fils de suture tricotés et microfibre.
En noir les points expérimentaux et en rouge les points expérimentaux où l'état relaxé est atteint

IV.4.2. AJUSTEMENTS DES PARAMETRES

Comme nous l'avons évoqué au paragraphe §IV.1., nous avons réalisé l'ajustement des paramètres du modèle simplifié en utilisant le début du chargement jusqu'à la décharge incluse (cf. §IV.3.1). Bien que le modèle soit légèrement simplifié, nous avons ajusté les

paramètres d'une façon similaire à celle présentée au chapitre précédent (cf. §III.4.). Nous avons donc pré-ajusté la contrainte relaxée (équation IV.3.) à l'aide des valeurs obtenues expérimentalement aux élongations de 1 ; 1,04 et 1,06 (valeur en rouge à la Figure IV.5.) donnant ainsi la valeur des paramètres du modèle de Mooney-Rivlin à deux paramètres $(C_{10}$ et $C_{01})$. De même, le temps de relaxation de référence du processus le plus lent, $\tau_N^{r,0}$, a été préalablement ajusté à partir des temps de relaxation aux élongations de 1,04 et 1,06. Puis, le volume d'activation apparent $K_0 + K_A$ a été ajusté en utilisant les essais de relaxations en charge, pour σ supérieur à σ^r. L'ensemble des charges et des essais de relaxation a servi à ajuster les paramètres du module d'élasticité effectif, $E^{u,eff}$ (équation IV.3.). Enfin, le volume d'activation apparent $K_0 - K_A$ (équation IV.3.) a été évalué en utilisant la décharge, puisqu'elle a été réalisée après une essai de relaxation, nous avons directement σ inférieur à σ^r.

Les résultats des ajustements de paramètres pour les expériences réalisées sur chaque tendon d'Achille de lapin sont présentés aux figures Figure IV.6. et Figure IV.7. et dans le Tableau IV.2. Nous pouvons remarquer que les résultats sur la partie du chargement, ayant servi à l'ajustement des paramètres du modèle simplifié, sont relativement bien simulés par le modèle tant en contrainte qu'en contrainte relaxée. Une nuance est toutefois à faire en ce qui concerne la décharge où le modèle montre un écart par rapport aux résultats expérimentaux. Cette différence pourrait provenir du choix de description élastique du comportement de la contrainte relaxée. Toutefois, cette différence reste faible vis-à-vis du gain en simplification d'analyse par la diminution du nombre des paramètres employés pour décrire la contrainte relaxée (de 7 pour le modèle complet, Figure III.11., contre 2 pour le modèle simplifié, équation IV.1.). Ainsi, le paramètre $K_0 - K_A$ sera difficile à commenter, surtout au vu de la dispersion de ce paramètre entre tendons.

D'autre part, le modèle simplifié reste cohérent puisque lorsque nous appliquons, à ce modèle, les valeurs moyennes de chaque paramètre, sa réponse en contrainte simule de façon réaliste le comportement des tendons d'Achille à la fois sur la partie servant à l'ajustement de paramètres (Figure IV.8.) mais également sur le reste du chargement (Figure IV.9.). En effet, malgré l'écart induit par l'indépendance de la contrainte relaxée modélisée vis-à-vis de l'histoire de chargement, nous pouvons remarquer que le modèle suit assez bien le comportement durant le cylce en charge et décharge (Figure IV.9.B et C). Nous pouvons toutefois remarquer que le module tangent en recharge de la réponse du modèle simplifié est

plus élevé que celui des tendons. Cette différence n'est pas étonnante puisque nous n'avons pas pris en compte la différence de relâchement de fibres par rapport à leur recrutement. Globalement, le choix des simplifications a été judicieux et ne diminue que modérément les performances du modèle. Remarquons enfin que tant que l'ajustement le permet, nous maintenons pour ce chargement les paramètres de la distrubution de Weibull $(\varepsilon_{th}, \alpha)$ aux valeurs respectives de 0,1 et 1,75. Ceci permet de simplifier encore l'analyse et la comparaisons des paramètres des tissus et stuctures.

Tableau IV.2. Valeurs des paramètres ajustés aux expériences sur les tendons d'Achille

Paramètres du modèle		Tendon d'Achille			
		#1	#2	#3	Moyenne ± Ecart type
E_0^u	[MPa]	43,6	30	56,7	43,4±13,4
E^u	[MPa]	205,4	191,4	223,3	206,7±16
ε_{th}		0,1	0,1	0,1	0,1
α		1,75	1,75	1,75	1,75
$K_0 + K_A$	[$\times 10^3 cm^3 Mol^{-1}$]	-6	-6,5	-5	-5,8±0,8
$K_0 - K_A$	[$\times 10^3 cm^3 Mol^{-1}$]	-45	-96,5	-37	-59,5±32,3
$\tau_N^{r,0}$	[$\times 10^5 s$]	6,8	5	7	6,3±1,1
N		30	30	30	30
D		3	3	3	3
ε_0	[$\times 10^{-4}$]	8	8	8	8
C_{10}	[MPa]	66	121,9	76,1	88±29,8
C_{01}	[MPa]	-65,9	-124,8	-76,3	-89±31,4

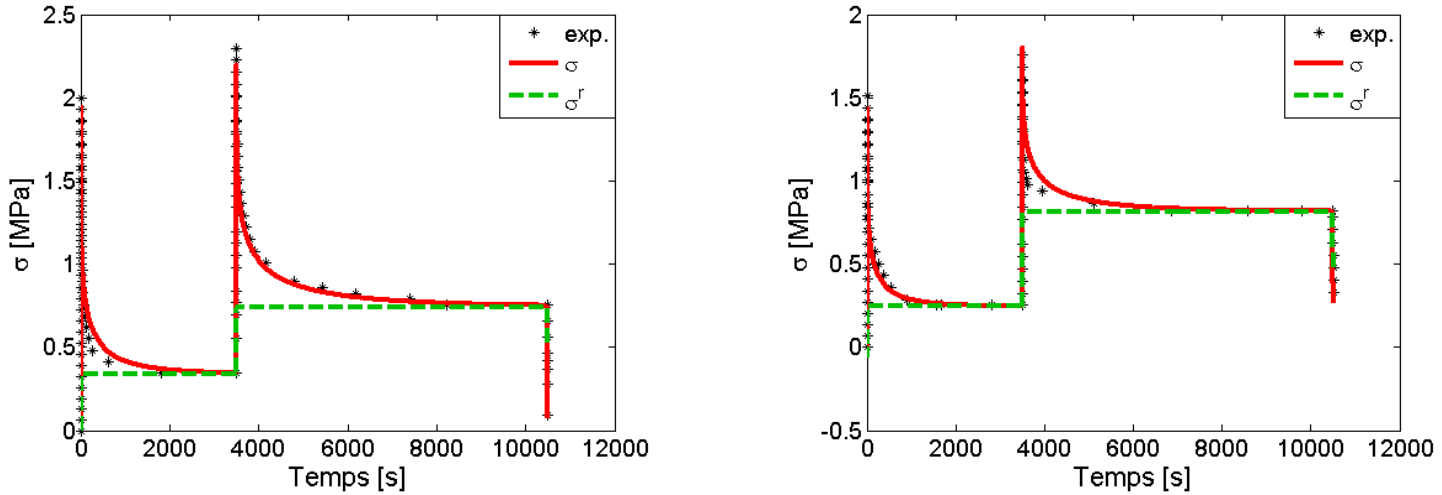


Figure IV.6. Courbes d'ajustement du modèle simplifié aux réponses des tendons en fonction du temps

A : Tendon #1 ; B : Tendon #2 ; C : Tendon #3

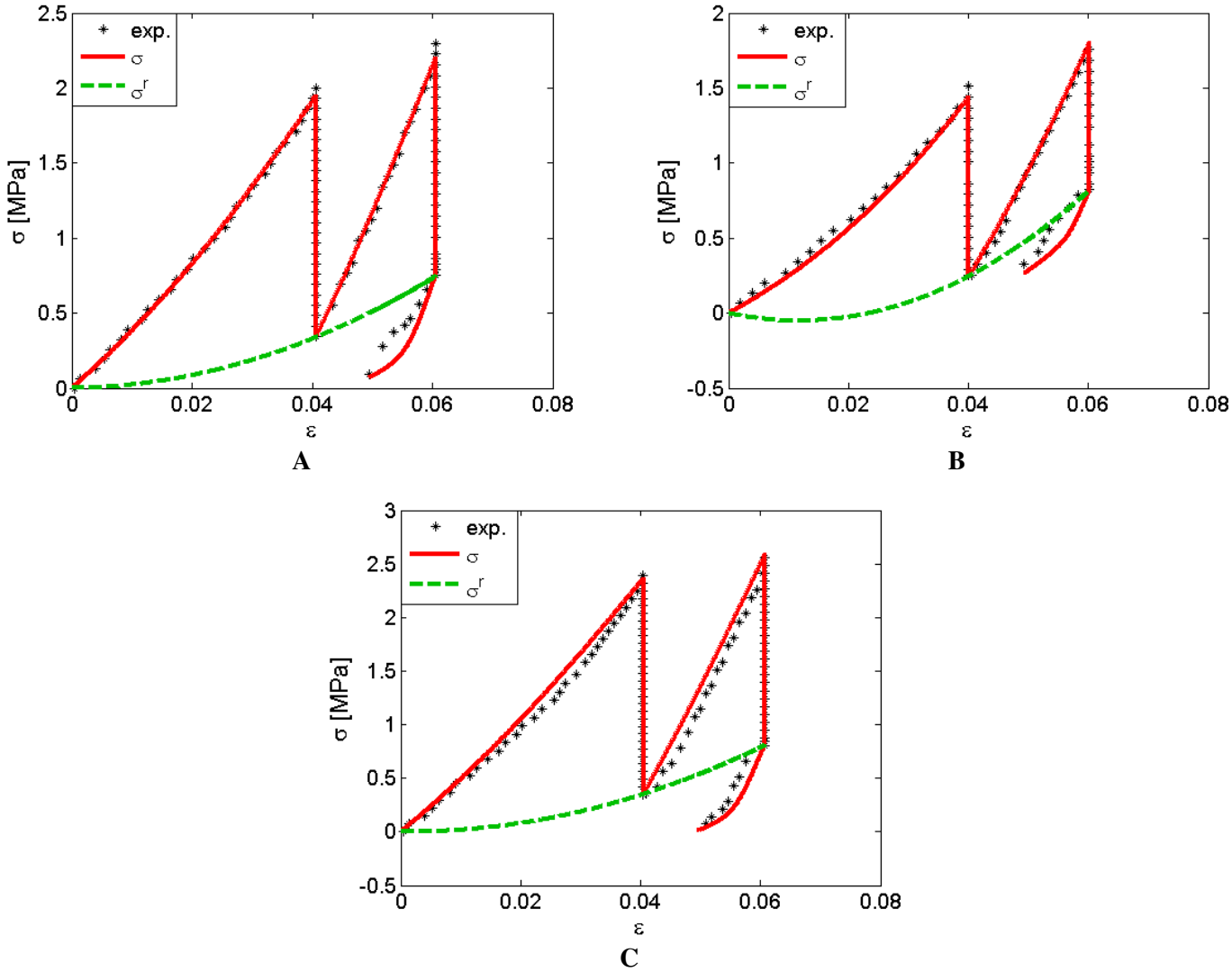
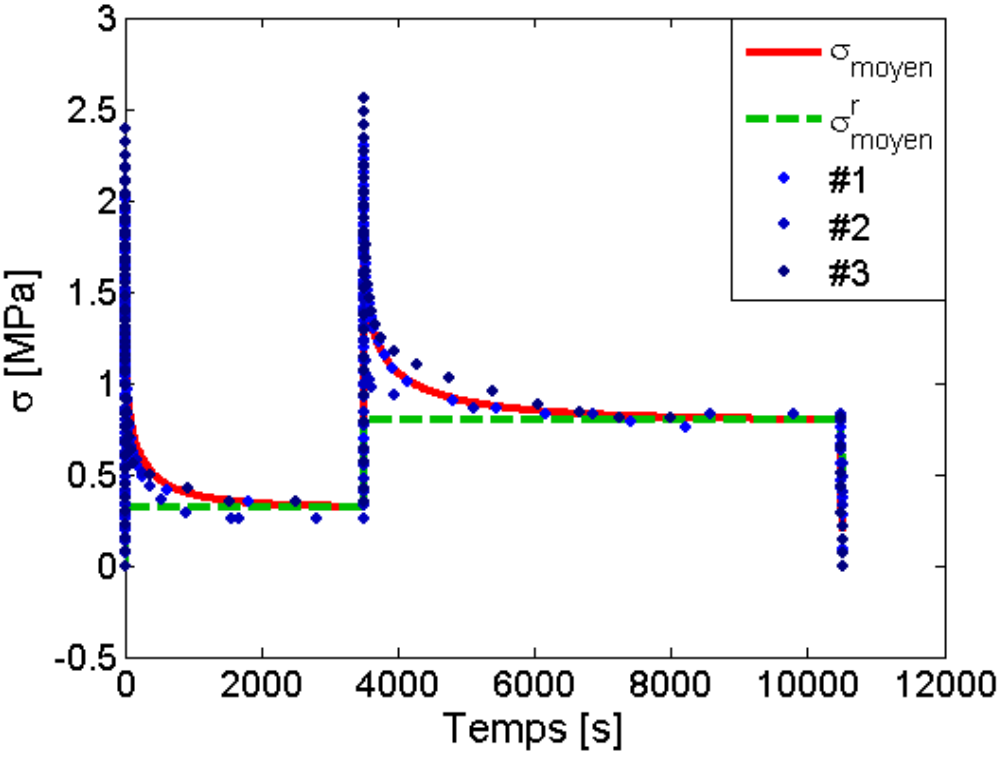
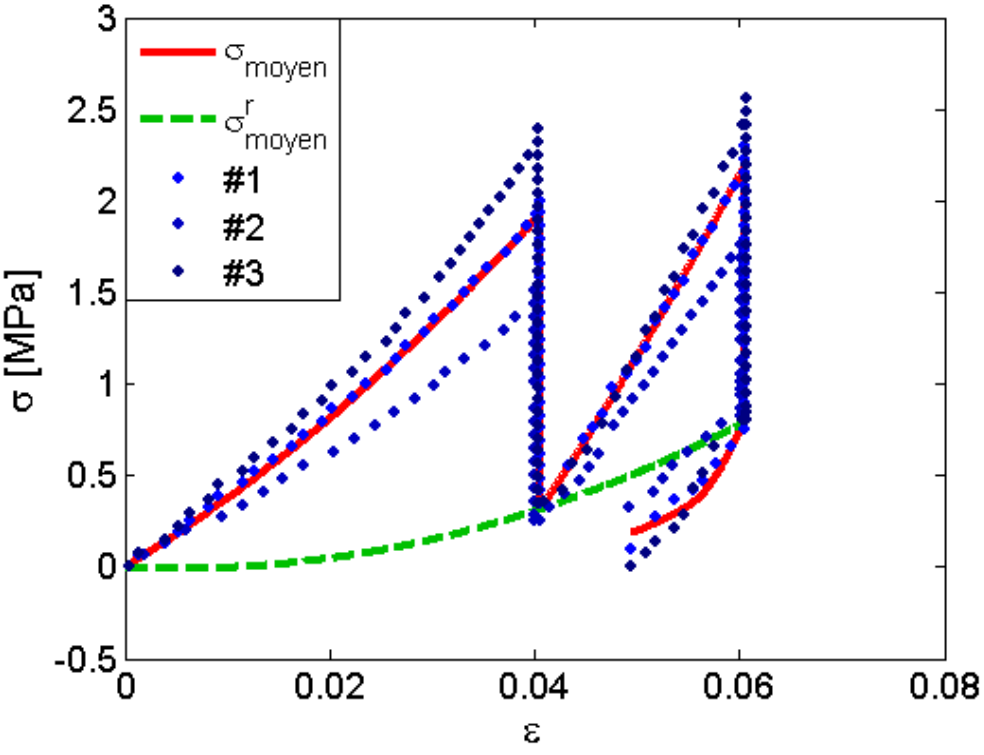


Figure IV.7. Courbes d'ajustement du modèle simplifié aux réponses des tendons en fonction de la déformation

A : Tendon #1 ; B : Tendon #2 ; C : Tendon #3

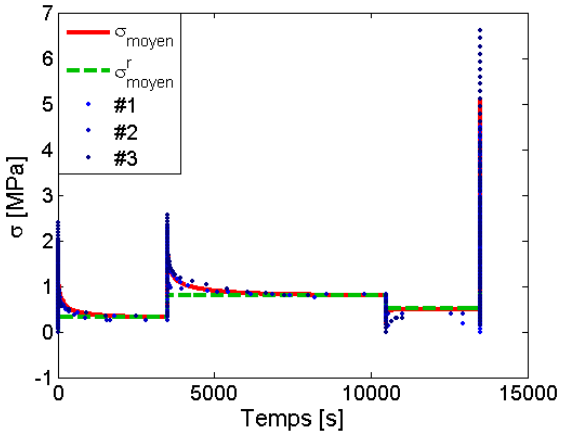


A

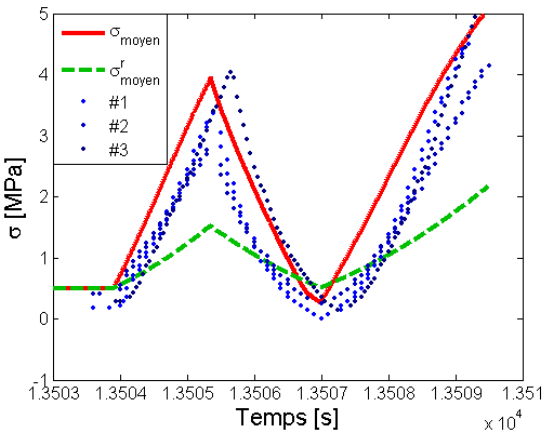


B

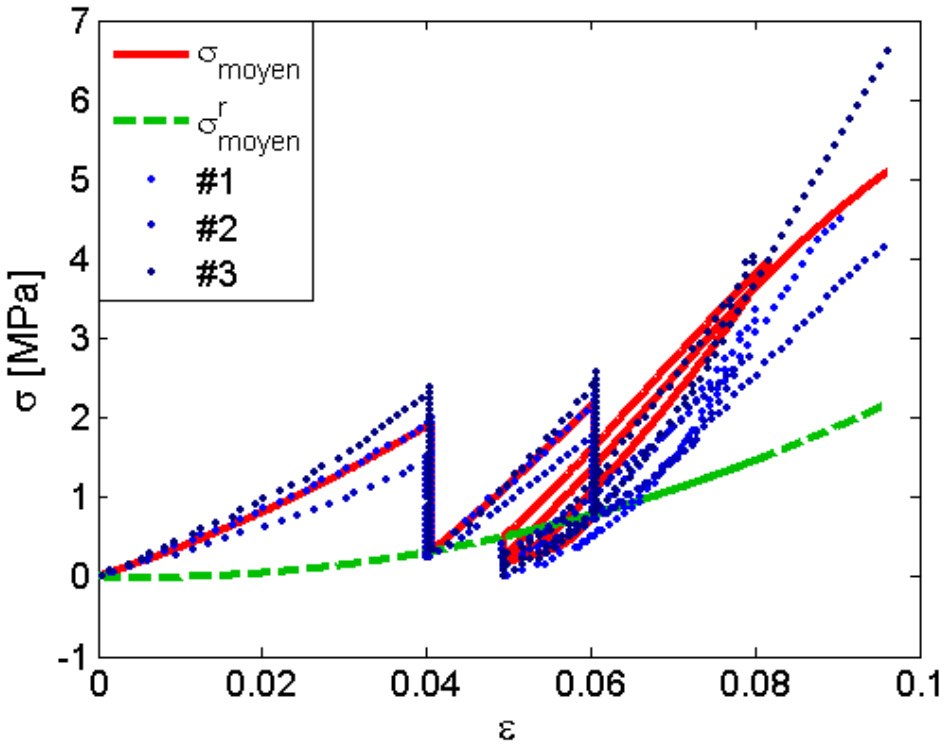
Figure IV.8. Comparaison de la réponse des tendons et du modèle simplifié
La moyenne des paramètres ajustés à la réponse de chaque tendon a été appliquée au modèle simplifié



A



B



C

Figure IV.9. Vérification de la cohérence du modèle simplifié

La cohérence du modèle simplifié a été effectuée en simulant la fin du chargement à l'aide des paramètres moyens déjà ajustés avec le début du chargement et en le comparant à la réponse des tendons d'Achille. A et C : Comparaison du modèle simplifié aux réponses des tendons pour le chargement complet en temps et en déformation ; B : Comparaison du modèle simplifié en fonction du temps sur la fin du chargement (cycle)

Après avoir étudié les tendons d'Achille à partir du chargement choisi pour l'évaluation des structures de substitution des tendons et ligaments, et valider le choix des simplifications du modèle, nous avons estimer les paramètres des tests mécaniques réalisés sur les deux structures de substitutions choisies. Ces résultats d'estimation de paramètres sont résumés par la Figure IV.10. et le Tableau IV.3.

L'ajustement des paramètres (Tableau IV.3.) confirme les premières interprétations faites sur nos expériences vis-à-vis du module d'élasticité apparent et des temps de relaxation. En effet, le module d'élasticité apparent de la matrice en fibres torsadées est bien plus élevé que celui des tendons d'Achille (1670MPa pour E^u) contrairement à celui de la matrice tricotée (137,2MPa pour E^u) qui s'en rapproche plus ($E^u = 206,7 \pm 16$ pour les tendons). Remarquons que les paramètres $(\varepsilon_{th}, \alpha)$ sont très différents de ceux des tendons pour la matrice torsadée du fait des différences de niveaux de contrainte entre-eux. Quant aux temps de relaxation $\left(\tau_N^{r,0}\right)$, la matrice de fibres torsadées se rapproche bien sur ce point du comportement des tendons ($\tau_N^{r,0}$ vaut 6×10^5s contre $6,3\pm1,1\times10^5$s pour les tendons), alors que la matrice en fils tricotés présente un temps de relaxation $\tau_N^{r,0}$ beaucoup plus faible ($4,5\times10^5$s). Enfin, bien qu'il soit difficile de parler de volume d'activation pour des structures multiconnexes, nous pouvons remarquer que le paramètre $K_0 + K_A$, qui conditionne la vitesse de diminution de la contrainte sur la durée de relaxation (équation IV.3.), sont très proches de celui des tendons pour les deux structures (Tableau IV.3.). Ainsi, la structure en fibre torsadée présente un comportement en relaxation assez comparable à celle des tendons contrairement à la structure tricotée.

Enfin, le comportement relaxé des structures est très différent de ceux des tendons, l'une ayant un comportement relaxé pratiquement linéaire et l'autre présentant une courbure inversée (Figure IV.10.).

Tableau IV.3. Comparaison des structures de substitution avec les tendons d'Achille

Paramètres du modèle	Matrice en fibres torsadées	Matrice en fils tricotés	Tendon moyen
E_0^u [MPa]	380	33,4	43,4±13,4
E^u [MPa]	1670	137,2	206,7±16
ε_{th}	0,044	0,1	0,1
α	7,3	1,75	1,75
$K_0 + K_A$ [$\times 10^3 cm^3 Mol^{-1}$]	-5,3	-7	-5,8±0,8
$K_0 - K_A$ [$\times 10^3 cm^3 Mol^{-1}$]	-1,4	-3	-59,5±32,3
$\tau_N^{r,0}$ [$\times 10^5 s$]	6	4,5	6,3±1,1
N	30	30	30
D	3	3	3
ε_0 [$\times 10^{-4}$]	8	8	8
C_{10} [MPa]	112,1	-35,4	88±29,8
C_{01} [MPa]	-18,5	27,8	-89±31,4

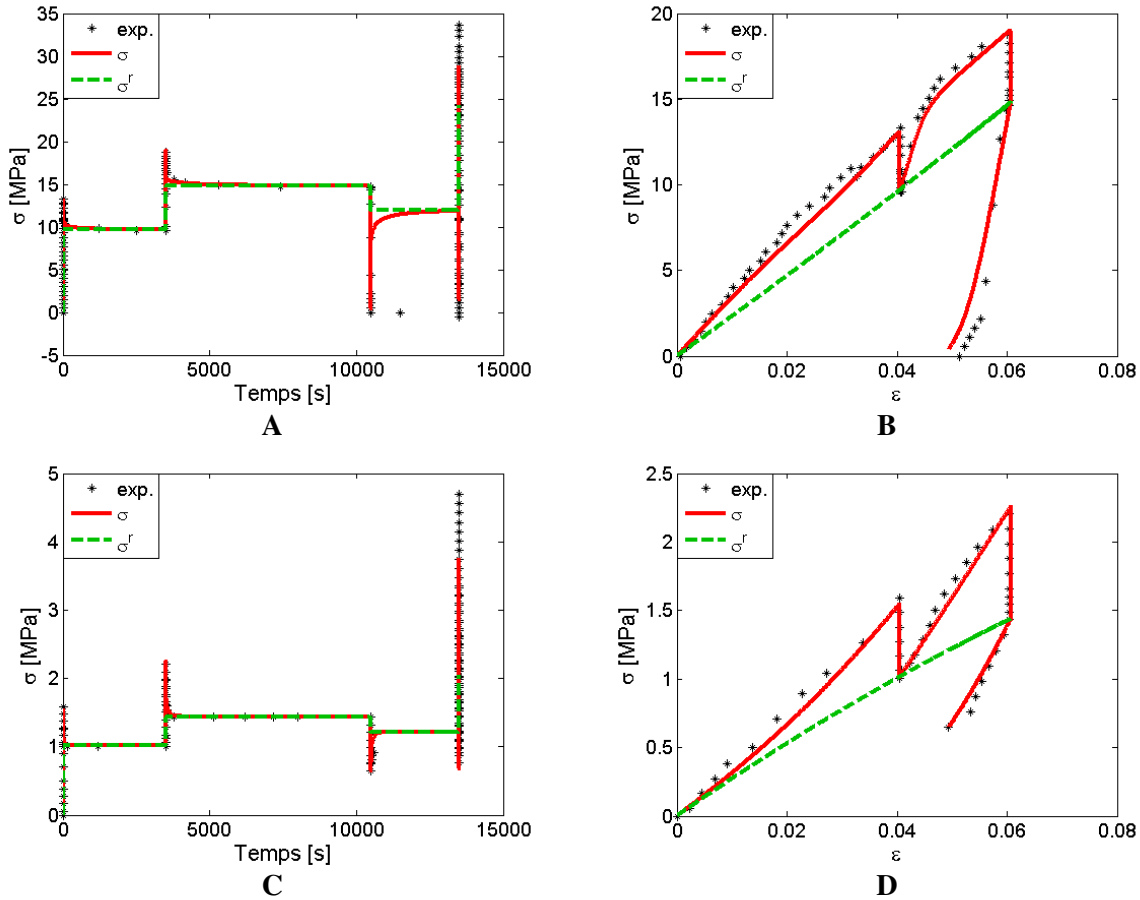


Figure IV.10. Courbes d'ajustement du modèle simplifié aux réponses des structures
A et B : Matrices en fibres torsadées ; C et D : Matrice en fils de suture tricotés

IV.5. CONCLUSION

Ces dix dernières années, nous avons assisté à des avancées considérables dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. L'évaluation des tendons et des ligaments par l'intermédiaire de tests de traction simple ou dans le meilleur des cas d'essais de traction suivis d'une relaxation, n'est pas suffisante pour évaluer la qualité mécanique des structures de substitution par rapport aux tissus sains. Il est donc impératif de développer des modèles permettant de réaliser et de simuler des tests d'évaluation plus proches des conditions physiologiques des tissus tendineux, afin de s'assurer de la qualité mécanique de ces structures en vue de leur implantation. En effet, il est indispensable de pouvoir évaluer ces structures de substitution pour mieux identifier les causes des observations faites lors d'expériences de régénération tissulaire.

Ainsi, nous proposons un chargement type pour la comparaison mécanique des structures de substitution, des néo-tissus, ou des tissus régénérés, par rapport aux tendons sains. Pour estimer les paramètres mécaniques caractéristiques de ces tissus, nous avons adapté le modèle thermodynamique présenté au chapitre III, pour diminuer le nombre de paramètres et ainsi simplifier l'estimation de paramètres et l'étude comparative tout en gardant un comportement acceptable du modèle. Nous avons réussi à ne garder que 9 paramètres significatifs des 14 paramètres du modèle complet. Ceci permet de limiter le nombre de paramètres devant être fixé pendant l'estimation de paramètre puisque nous proposons pour l'instant une procédure d'évaluation nécessitant moins de degrés de liberté que le modèle complet n'en comporte. Sans cette diminution du nombre des paramètres du modèle, nous serions donc obliger de donner des valeurs arbitraires pour certains paramètres tels que ε_{th_d} et α_d par exemple. Or, pour des strutures a priori différentes des tendons, il est difficilement justifiable de donner arbitrairement des valeurs aux paramètres fixés à l'aide de mesures faites sur des tendons. Il est donc plus commode d'adapter le modèle à cette procédure en le simplifiant. Toutefois, nous avons pu montrer que nos simplifications permettent de conserver un comportement réaliste du modèle (Figure IV.9.).

Les paramètres du modèle que nous pouvons qualifier de simplifié, nous ont permis de comparer deux matrices de support utilisées en ingénierie tissulaire aux tendons sains. L'ajustement des paramètres (Tableau IV.2. et Tableau IV.3.) a permis de conclure de façon univoque sur les différences entre ces trois types de tissus (tendons et matrices de support). Cette comparaison est en accord avec l'analyse qualitative faite en première approximation à l'aide des données expérimentales (Figure IV.4. et Figure IV.5.). En effet, l'estimation de

paramètres a montrer que le module d'élasticité de la structure torsadée est trop élevé par rapport à celui des tendons contrairement à la structure tricotée, que le comportement en relaxation de la matrice de structure torsadée est assez proche de celui des tendons contrairement à la matrice tricotée et que le comportement relaxé des structures de substitution est très différent de celui des tendons.

De ce fait, mécaniquement, aucune des deux structures n'est parfaite pour remplacer les tendons d'Achille de lapin dans le sens où il n'y a pas de compatibilité parfaite entre ces structures et les tendons. Toutefois, la structure en fils de suture tricotés se rapproche plus du comportement des tendons, excepté en relaxation et en transmission de force. Bien que nous ayons amélioré cette dernière caractéristique mécanique en tricotant 4 fils à la fois, la structure n'est toujours pas assez résistante pour se substituer parfaitement au tendon d'Achille et mérite d'être encore améliorée surtout au niveau de la viscosité de ce « matériau » afin d'améliorer la structure vis-à-vis des temps de relaxation qui sont actuellement bien trop courts. Or, ce comportement peut s'avérer être un paramètre important dans la stimulation des cultures cellulaires lors de la construction tissulaire. En effet, des études ont montré [GERMAIN *et al.*, 2004] que la stimulation statique n'a qu'une faible influence sur les sécrétions protéiques contrairement aux stimulations cycliques. Ainsi, une structure qui se relaxe durant environ une heure peut permettre une stimulation plus souple des cellules ensemencées dessus, et peut être moins stressante que la stimulation cyclique permanente, ou de prolonger la stimulation mécanique de façon progressive.

Enfin, vis-à-vis de la culture tissulaire, la structure en fibres de soie torsadées est trop dense, et limite la colonisation cellulaire en profondeur, contrairement à celle en fils de suture tricotés qui est très poreuse permettant facilement l'apport de nutriments, et donc la colonisation cellulaire de la structure en son cœur.

Nous pouvons conclure que cette étude représente une validation de l'utilisation de notre modèle pour l'évaluation mécanique des tissus produits par l'ingénierie tissulaire des ligaments et tendons, ainsi que la sélection et l'optimisation de structures de substitution des tendons et ligaments.

CONCLUSION ET PERSPECTIVES

L'ingénierie tissulaire est une discipline récente qui est en plein développement depuis une dizaine d'années. Cette discipline a un fort intérêt clinique puisqu'elle s'est donnée comme objectif la culture et/ou la régénération de tissus vivants pour pallier les problèmes liés à l'immunocompatibilité et à la rareté des greffons. Pour cela, différentes voies expérimentales sont actuellement explorées : la construction tissulaire *in vivo et in vitro* à partir de cellules autologues ou de cellules génétiquement modifiées.

Notre équipe s'intéresse plus particulièrement aux études de culture *in vitro* et *in viv*o utilisant des CSMM pour la reconstruction de tendons et de ligaments. Bien que le remplacement de tendons et de ligaments représente un confort pour le patient, nous avons vu (cf. §I.1.3.) qu'actuellement les conséquences d'une mauvaise reconstruction de ligament ou de tendon est coûteuse pour la société. Par exemple, une ligamentoplastie du LCA induit régulièrement, outre une gêne pour le patient, des risques d'arthrose du genou dont le coût pour la société se chiffre, chaque année, en centaines de millions d'euros en interventions chirurgicales, en rééducations et en arrêts de travail. La recherche en ingénierie tissulaire de ligaments et de tendons s'avère potentiellement intéressante pour la société. De plus, ces tissus étant passifs, ils représentent un groupe de matériaux plus simples à régénérer permettant ainsi de développer nos connaissances et nos techniques de régénérations tissulaires qui seront peut-être, plus tard, transposables pour la culture de tissus plus complexes comme des muscles (cœur, artères,…), des cellules du système nerveux central, etc.

En attendant de telles avancées, notre travail de recherche s'est porté sur le développement d'outils d'étude et d'évaluation *in vitro*, *via* la conception d'un bioréacteur de ligaments et de tendons de nouvelle génération et le développement d'une modélisation mécanique vouée à rendre compte d'un grand nombre des propriétés mécaniques de ces tissus.

Le bioréacteur développé au cours de ce travail de thèse est le premier de cette génération en France et en Europe et le troisième au niveau mondial [ALTMAN *et al.*, 2002b; THE *et al.*, 2006]. En effet, nous avons conçu un bioréacteur permettant l'étude de culture *in vitro* de tissus ligamentaires et tendineux de taille physiologique (4 à 5 cm de long) pouvant stimuler la matrice de support des cellules en étirement et en rotation simultanés. Cette stimulation mécanique se rapproche des stimulations que peuvent subir un grand nombre de ligaments et de tendons, comme les ligaments du genou ou les tendons de l'épaule. Nous

avons montré que la culture de cellules à l'aide de cette machine était comparable à la culture en incubateur standard à 37°C avec un apport régulé de CO_2 à 5%. De plus, elle permet la culture sous sollicitation mécanique de cycles de traction-torsion.

Ce dispositif a été conçu dans l'optique d'évoluer. D'ailleurs, des améliorations ont été proposées en cours d'étude pour contrôler de façon plus satisfaisante la culture cellulaire, mais aussi pour diminuer les coûts de fonctionnement lors des différentes études. Ces études devant durer plusieurs semaines (au moins un mois) pour obtenir une matrice extracellulaire, le coût de fonctionnement du dispositif expérimental est important à prendre en compte. Nous avons ainsi essayé de limiter le plus possible, la quantité de milieu de culture utilisé, et nous proposons de réduire la consommation de gaz pré-mélangé, ou pas, par la conception d'un petit incubateur portatif. Hormis le fait d'optimiser les consommations de dioxygène et de dioxyde de carbone, ce dispositif permettrait d'une part, de contrôler la pression partielle de dioxygène influant sur la prolifération cellulaire et la sécrétion protéique, d'autre part, ce dispositif permettrait de conserver les cellules à une température optimale durant la phase de montage et de démontage des chambres de culture en apportant en continu un milieu de culture chauffé à 37°C aux chambres en attente d'être traitées. Ceci permettrait de réduire le « stress » que constitue le changement de température en diminuant le plus possible la durée pendant laquelle ce paramètre n'est plus régulé.

Enfin, notre bioréacteur est un dispositif expérimental pouvant servir à étudier les effets des conditions de culture sur des tissus sains, ou encore les effets simultanés des facteurs de croissance et de la stimulation cyclique en traction-torsion. L'utilisation des facteurs de croissance par l'intermédiaire de ce dispositif nécessite, toutefois, le développement de matrices biodégradables permettant la libération progressive de ces molécules. En effet, la quantité de milieu de culture de chaque chambre étant relativement élevée, l'apport de facteurs de croissance *via* le milieu de culture n'est pas une solution envisageable.

Le deuxième axe de mon travail de thèse s'est porté sur l'étude expérimentale du comportement mécanique des tendons et ligaments et le développement d'un modèle, le plus complet possible, de ce comportement mécanique en choisissant, comme tissu, le tendon d'Achille de lapin blanc de Nouvelle-Zélande.

L'étude expérimentale présente le comportement de ces tissus en charge, en décharge, en relaxation, en fluage et en fatigue à une vitesse d'élongation constante de $0{,}02 s^{-1}$. Nous

avons observé les comportements déjà décrits dans la littérature, à savoir l'augmentation du module tangent d'élasticité lors d'une traction simple, la corrélation entre temps de relaxation et déformation et l'irréversibilité lors des cycles de charge et de décharge en contrôlant la déformation ou la contrainte. Nous avons également souligné l'évolution de l'état relaxé en charge mais aussi après une décharge. Cet état présente une certaine irréversibilité lors des essais de cycles de charge et de décharge qui n'a, à notre connaissance, jamais été présentée ou même pris en compte.

L'ensemble des informations recueillies sur ces tendons, nous a permis de tester un groupe de modèles représentatifs de la modélisation des tendons et des ligaments et de nous rendre compte du manque de description du comportement en décharge des modèles développés dans la littérature. Nous avons ainsi développé notre propre modèle fondé sur un formalisme thermodynamique des états relaxés permettant la description unifiée des différents essais mécaniques réalisés.

Le modèle ainsi développé a été utilisé pour décrire les essais de cycles successifs et de relaxation successifs en charge et en décharge. Ce travail a permis de déterminer un ensemble de paramètres mécaniques caractéristiques du comportement des tendons et des ligaments. En effet, bien que les mécanismes ne soient pas encore clairement identifiés, le modèle a mis en évidence que seul le recrutement de fibres de collagènes ne suffit pas à expliquer les propriétés mécaniques observées. De plus, la nécessité d'introduire deux volumes d'activation distincts selon le signe de $\left(\sigma - \sigma^{r}\right)$ montrent qu'au moins deux structures différentes sont tour à tour prépondérentes. Ainsi, en plus de la structure collagénique, au moins une deuxième structure semble intervenir de façon significative dans le comportement de ces tissus, remettant en lumière l'importance des protéoglycanes dans le transfert des efforts entre fibrilles de collagènes qui reste encore mal compris.

Afin de décrire l'ensemble des non-linéarités des propriétés mécaniques des tendons et des ligaments, un certain nombre de paramètres sont nécessaires. L'analyse de l'ensemble des paramètres lors de l'évaluation de tissus régénérés ou de substitution s'avère compliquée. Nous avons donc adapté ce modèle à un chargement que nous considérons représentatif du comportement des tendons, afin de diminuer le nombre de paramètres et ainsi faciliter l'étude comparative des différentes structures. Il est à noter que cette procédure peut être améliorée jusqu'à tester les tissus dans les conditions physiologiques de leur utilisation. Toutefois, des essais allant jusqu'aux sollicitations physiologiques ne sont, pour l'instant, pas nécessaire pour comparer les tissus régénérés ou ceux de substitution par rapport aux tissus sains.

Si, à l'heure actuelle, nous n'avons pas identifié une structure pouvant se substituer parfaitement aux tendons, nous préconisons l'utilisation de ce modèle pour développer un tissu de substitution convenable afin de converger vers des conditions physiologiques lors de la culture cellulaire. En effet, le comportement de la matrice de support est crucial pour la culture du néo-tissu puisqu'il transmet aux cellules les sollicitations mécaniques qui induisent un ensemble de réponses transductionnelles.

Le développement de ce modèle s'avère donc important dans le processus de sélection des matrices de support utilisables en ingénierie tissulaire et d'optimisation de leurs caractéristiques pour pouvoir se substituer aux tendons durant la régénération tissulaire.

Néanmoins, ce modèle est perfectible, en effet, nous faisons allusion notamment au manque d'informations quantitatives de l'effet de la vitesse d'élongation sur la réponse des tendons d'Achille. De plus, ce modèle ne permet pas de rendre compte correctement de l'effet d'adoucissement lors de cycles en fatigue. Une meilleure compréhension des phénomènes de relâchement de fibres est nécessaire pour améliorer le présent modèle. En effet, les phénomènes de rappel lorsque la contrainte est inférieure à la contrainte relaxée ne sont pas encore bien compris au niveau du module d'élasticité effectif, $E^{u,eff}$, et nécessitent de plus amples études.

Pour conclure, ce travail de recherches représente une première étape dans la rationalisation des études en ingénierie tissulaire en s'inscrivant dans la politique des 3R sur les expérimentations animales, à savoir : **remplacer, réduire et raffiner**. En effet, la construction du bioréacteur doit permettre, dans l'avenir, de tester les matrices de support en réalisant des études préliminaires, *in vitro,* à moyen terme (de 1 à 4 semaines voire plus). Ainsi, le nombre d'expériences animales pourra être **réduit** par une première élimination des matrices de support inadaptées ou peu adaptées et en testant les dosages des facteurs de croissance nécessaires à la régénération tissulaire (**remplacer**). D'autre part, le développement du modèle mécanique devra également permettre, dans l'avenir, de réduire les expériences animales en ne sélectionnant que les matrices de support dont le comportement mécanique se rapproche réellement de celui des tissus, mais aussi de **raffiner** en permettant la quantification de paramètres mécaniques pertinents à l'évaluation des tissus prélevés lors d'un unique chargement.

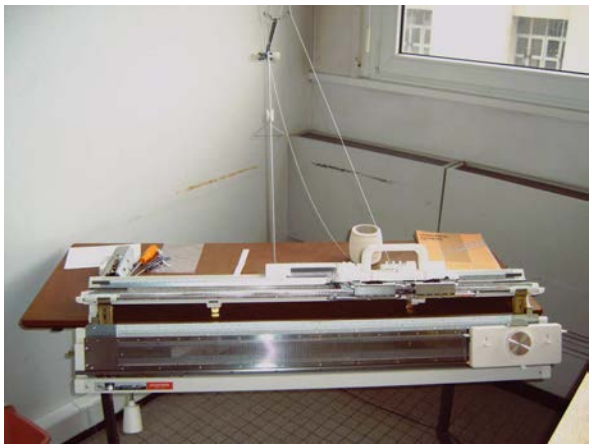
Sans se substituer à l'expérimentation animale, nos travaux de recherches nous ont permis de développer des moyens d'études complémentaires permettant à la fois

d'approfondir nos connaissances concernant les mécanismes de mécanotransduction, d'optimiser les concentrations des facteurs de croisssances nécessaires à la reconstruction tissulaire, de sélectionner les structures de substitution et d'évaluer la qualité mécanique des néo-tissus produits.

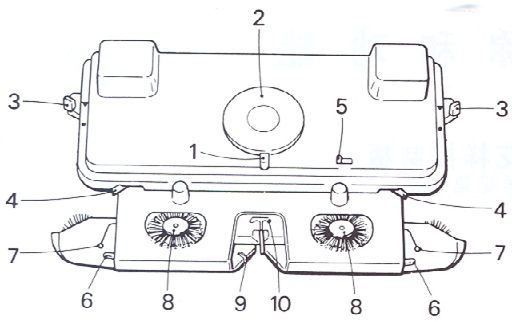
ANNEXES

Annexe 1 : Procédure de tricotage

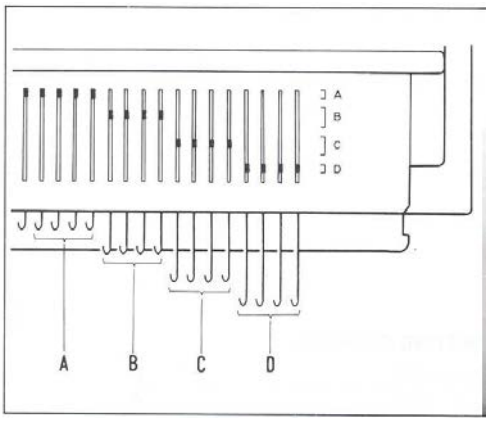
Après montage du fil sur la machine à tricoter (Silver-reed ZK 270, Suzhou, Chine), le chariot est positionné à droite et le fil est ressorti au niveau du levier (6) gauche après avoir été passé dans l'entrefer (10). La manette (2) est ensuite mise sur la position 0 (cette manette permet de changer la taille des mailles), les leviers (3) en position • et les leviers (6) en position basse (abaissement des brosses (8)).



A



B



C

Figure A.1. Machine à tricoter

A : vue d'ensemble ; B : schéma du chariot à tricoté ; C : positions des aiguilles à tricoter

Le compteur est remis à zéro et la quantité d'aiguilles à tricoter voulue est ressortie complètement (position D), donnant ainsi la largeur de la matrice souhaitée,. Une aiguille sur deux est partiellement rentrée (position B) et le fil est passé sur les aiguilles restantes en le tendant. Le chariot est ensuite passer à vitesse constante de droite à gauche en gardant le fil bien tendu et de gauche à droite tout en vérifiant à chaque passage qu'aucune maille ne

« saute ». Ce va-et-viens est renouvelé 2 fois. Si une ou plusieurs mailles « sautent », ces mailles sont tricotées à la main à l'aide d'une aiguille « manuelle ».

Puis, les leviers (3) sont mis en position ▲ et les leviers (6) en position haute (brosses (8) relevées). Un poids est ajouté à l'extrémité des mailles déjà tricotées afin de s'assurer que la structure reste toujours tendue. Le nombre d'allers-retours du chariot nécessaire à la longueur de structure souhaitée est alors effectué.

Lorsque cette longueur est atteinte, la structure est fermée par le haut en faisant ressortir toutes les aiguilles et en faisant passer chaque boucle les unes dans les autres à l'aide d'une aiguilles manuelle servant également à rattraper les mailles en début de procédure (Figure A.2.). Un double nœud plat est utilisé pour fermer la structure sur la dernière boucle. De même, un double nœud est réalisé au bas de la structure pour la fermer et ainsi s'assurer que la structure ne se détricotera pas.

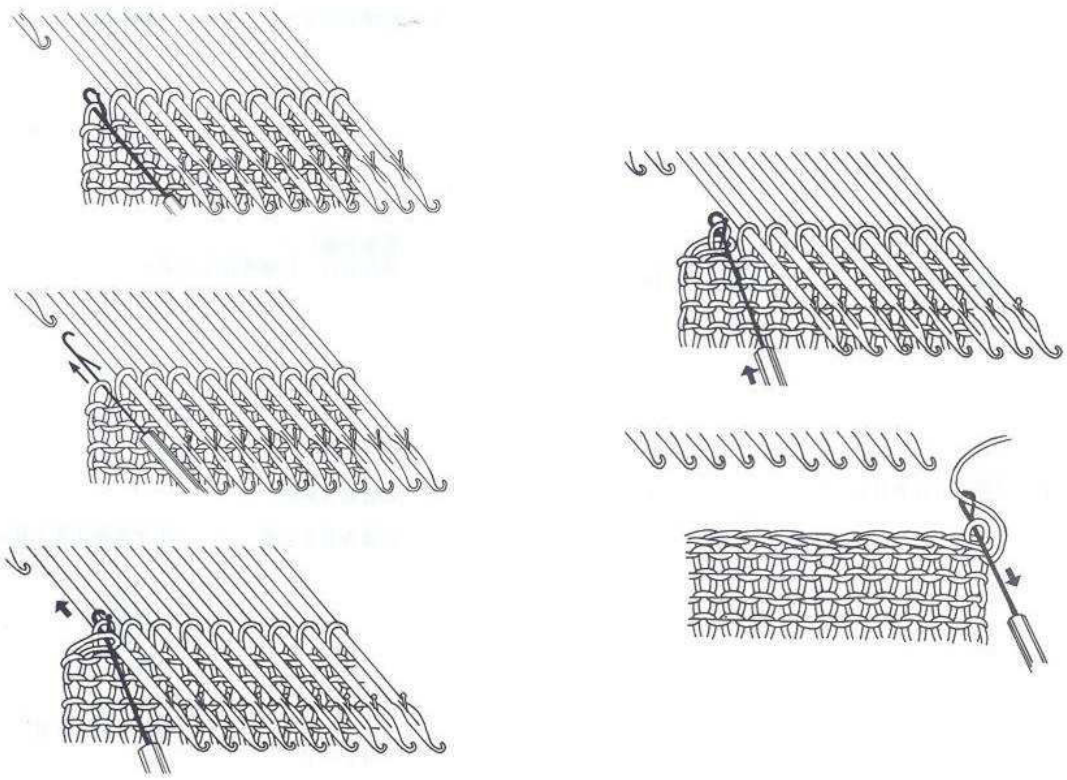


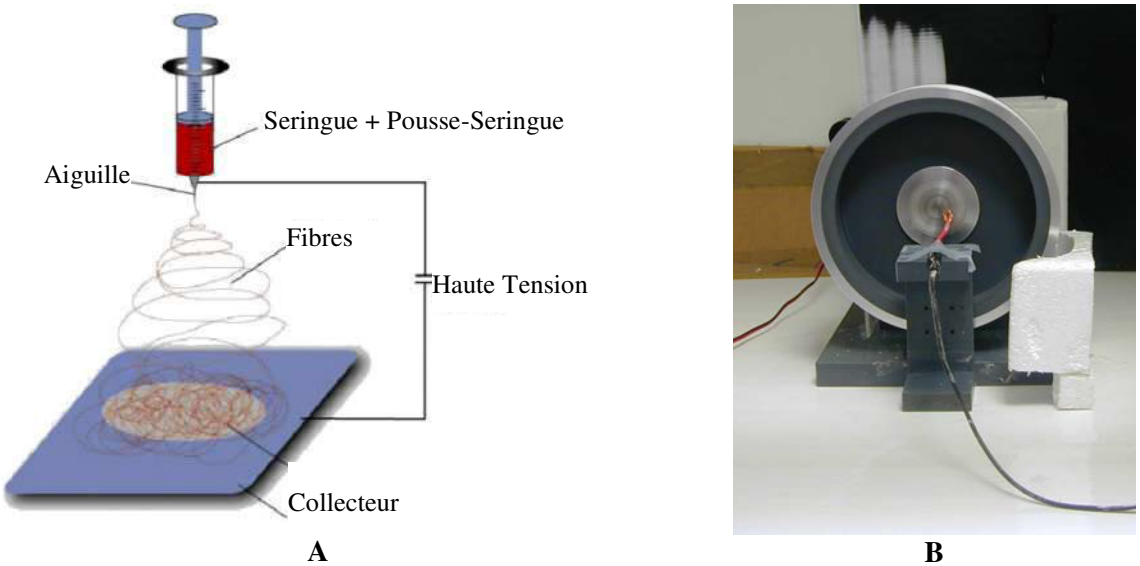
Figure A.2. Schéma explicatif de la fermeture du haut de la structure tricotée

Annexe 2 : Principe de l'electrospinning

L'electrospinning ou « électrofilage » est une technique de mise en forme, essentiellement utilisée pour fabriquer des fibres de diamètres micrométriques voire nanométriques, à l'aide d'une tuyère et d'un champ électrique à haute tension.

Le montage (Figure A.3.) consiste en un pousse-seringue, d'une seringue (en verre), d'une aiguille métallique, d'un collecteur également métallique et d'un générateur haute tension (quelques kV). Le collecteur étant relié à la masse et l'aiguille au potentiel de l'alimentation.

Il se crée alors un jet soumis à une instabilité projetant le polymère selon un cône (Figure A.3.). Le solvant s'évapore en partie durant le passage de l'aiguille au collecteur, formant ainsi une fibre de plus ou moins faible diamètre. L'instabilité génère des dépositions aléatoires des fibres de polymères. De nombreux facteurs influent sur le diamètre des fibres tels que le débit, le diamètre de l'aiguille, la tension appliquée entre l'aiguille et le collecteur, la distance entre l'aiguille et le collecteur, la conductivité de la solution de polymère, etc.



A **B**

Figure A.3. Principe de l'electrospinning et collecteur rotatif

A : Schéma de principe de l'electrospinning ; B : Collecteur rotatif pour aligner les fibres

Des études [LI et XIA, 2004; VAQUETTE, 2008] ont montré que les fibres peuvent être déposées dans une ou plusieurs directions privilégiées en changeant le collecteur (par exemple en prenant un collecteur multi-connexe, ou en utilisant un collecteur rotatif). Notre

laboratoire s'est doté [VAQUETTE, 2008] d'un dispositif d'electrospinning avec alignement des fibres par rotation du collecteur.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

ABRAMOWITCH S. D., WOO S. L.-Y., An Improved Method to Analyze the Stress Relaxation of Ligaments Following a Finite Ramp Time Based on the Quasi-Linear Viscoelastic Theory. *Journal of Biomechanical Engineering,* 2004, vol. 126**,** p. 92-97.

ALTMAN G. H., HORAN R. L., MARTIN I., FARHADI J., STARK P., VOLLOCH V., VUNJAK-NOVAKOVIC G., RICHMOND J. C., KAPLAN D. L., Cell differentiation by mechanical stress. *FASEB Journal,* 2002a, vol. 16**,** p. 270-272.

ALTMAN G. H., LU H. H., HORAN R. L., CALABRO T., RYDER D., KAPLAN D. L., STARK P., MARTIN I., RICHMOND J. C., VUNJAK-NOVAKOVIC G., Advanced Bioreactor with Controlled Application of Multi-Dimensional Strian For Tissue Engineering. *Journal of Biomechanical Engineering,* 2002b, vol. 124**,** p. 742-749.

AMIEL D., FRANK C., HARWOOD F., FRONEK J., AKESON W., Tendons and ligaments: a morphological and biochemical comparison. *Journal of Orthopaedic Research,* 1984, vol. 1**,** p. 257-265.

AMIEYE L., ARIA D., JEPSEN K., OLDBERG A., XU T.S., YOUNG M. F., Abnormal collagen fibrils in tendons of biglycan/fibromodulin-deficient mice lead to gait impairment ectopic ossification, and osteoarthritis. *FASEB Journal,* 2002, vol. 16**,** p. 673-680.

ARIEBY R., Caractérisation Mécanique et Modélisation Thermodynamique du Comportement Anisotrope du Polyéthylène à Haute Densité. Intégration des effets d'Endommagement. PhD. thesis, 2007, INPL, Nancy

BEHR M., GODIO Y., LLARI M., BRUNET, C., 2006. Modelling physiological features of human body behavior in car crash simulation, INRETS**:** 14.

BERNASCONI S., Traumatologie. http://www.staps.univ-avignon.fr/S5/UE4/ Entrainement/Traumatologie/L3ES_Traumatologie.pdf. (2007)

BERRY C. C., SHELTON J. C., BADER D. L., LEE D. A., Influence of External Uniaxial Cyclic Strain on Oriented Fibroblast-Seeded Collagen Gels. *Tissue Engineering,* 2003, vol. 9**,** p. 613-624.

BERTUCCELLI G., MACCAGNAN M.A., La réforme de l'assurance maladie "Ce qui change pour vous". *Vitalité Assurée,* 2005, vol.**,** p. 1-12.

BI Y.M., EHIRCHIOU D., KILTS T. M., INKSON C. A., EMBREE M. C., SONOYAMA W., LI L., LEET A. I., SEO B.M., ZHANG L., SHI S.T., YOUNG M. F., Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nature Medicine,* 2007, vol. 13**,** p. 1219-1227.

BILODEAU K., Conception et validation d'un bioréacteur spécifique à la régénération du tissu artériel sous contraintes mécaniques. PhD. thesis, 2004, Université de Laval, Laval

BIRK D. E., Type V collagen: heterotypic type I/V collagen interactions in the regulation of fibril assembly. *Micron,* 2001, vol. 32**,** p. 223-237.

BIRK D. E., FITCH J. M., BABIARZ J. P., DOANE K. J., LINSENMAYER T. F., Collagen fibrillogenesis in vitro: Interaction of types I and V collagen regulates fibril diameter. *Journal of Cell Science,* 1990, vol. 95**,** p. 649-657.

BOGUMILL G. P., Functional anatomy of the flexor tendon system of the hand. *Hand Surgery,* 2002, vol. 7**,** p. 33-46.

BOLAND E. D., MATTHEWS J.., PAWLOWSKI K. J., SIMPSON D. G., WNEK G. E., BOWLIN G. L., Electrospinning collagen and elastin: preliminary vascular tissue engineering. *Frontiers in Bioscience,* 2004, vol. 9**,** p. 1422-1432.

BRUNE T., BOREL A., GILBERT T. W., FRANSCESCHI J.P., BADYLAK S.F., SOMMER P., *In vitro* comparison of human fibroblaste from intact and ruptured ACL for use in Tissue Engineering. *European Cells and Materials,* 2007, vol. 14**,** p. 78-91.

CANCEDDA R., DOZIN B., GIANNONI P., QUARTO R., Tissue engineering and cell therapy of cartilage and bone. *Matrix Biology,* 2003, vol. 22**,** p. 81-91.

CAPLAN A. I., BRUDER S. P., Mesenchymal stem cells: building blocks for molecular medicine in the 21st century. *TRENDS in Molecular Medicine,* 2001, vol. 7**,** p. 259-264.

CHEN X.G., GURKAN U. A., DEHEN C. J., TATE M. P., HILLHOUSE H. W., SIMPSON G. J., AKKUS O., An electrochemical fabrication process for the assembly of anisotropically oriented collagen bundles. *Biomaterials,* 2008, vol. 29**,** p. 3278-3288.

CHEN Y., DESAUTEL M., ANDERSON A., BADLANI G., KUSHNER L., Collagen synthesis is not altered in women with stress urinary incontinance. *Neurourology and Urodynamics,* 2004, vol. 23**,** p. 367-373.

CIARLETTA P., DARIO P., MICERA S., Pseudo-hyperelastic model of tendon hysteresis from adaptative recruitment of collagen type I fibrils. *Biomaterials,* 2008, vol. 29**,** p. 764-770.

CIARLETTA P., MICERA S., ACCOTO D., DARIO P., A novel microstructural approach in tendon viscoelastic modelling at the fibrillar level. *Journal of Biomecahnics,* 2005, vol. 39**,** p. 2034-2042.

COLEMAN B. D., NOLL W., Foundations of linear viscoelasticity. *Review of Modern Physics,* 1961, vol. 3**,** p. 239-249.

CUNAT C., Approche statistique des propriétés thermodynamiques des états liquides et vitreux - Relaxation des liquides et transition vitreuse - Influence des associations chimiques. PhD. thesis, 1985, Nancy I, Nancy

CUNAT C., Thermodynamic treatment of relaxation in frozen-in systems - Universality of the fluctuation distribution law for relaxation time. *Z. Phys. Chem. Neue Folge,* 1988, vol. 157**,** p. 419-423.

CUNAT C., Lois constitutives de matériaux complexes stables ou vieillissants. Apports de la thermodynamique de la relaxation. *Revue Générale de Thermique,* 1996, vol. 35**,** p. 680-685.

DANIELSON K. G., BARIBAULT H., HOLMES D. F., GRAHAM H., KADLER K. E., IOZZO R. V., Targeted Disruption of Decorin Leads to Abnormal Collagen Fibril Morphology and Skin Fragility. *The Journal of Cell Biology,* 1997, vol. 136**,** p. 729-743.

DANTO M. I., WOO S. L.Y., The mechanical properties of skeletally mature rabbit anterior cruciate ligament and patellar tendon over a range of strain rates. *Journal of Orthopaedic Research,* 1993, vol. 11**,** p. 58-67.

DE DONDER T., Thermodynamic theory of affinity: A book of principle. éd., Oxford: Oxford university press, 1936, p.

DE VITA R., SLAUGHTER W. S., A structural constitutive model for the strain rate-dependent behavior of anterior cruciate ligaments. *International Journal of Solids and Structures,* 2006, vol. 43**,** p. 1561-1570.

DECRAEMER W. F., MAES M. A., VANHUYSE V. J., An elastic stress-strain relation for soft biological tissues based on a structural model. *Journal of Biomechanics,* 1980, vol. 13**,** p. 463-468.

DEFRATE L. E., LI G., The prediction of stress-relaxation of ligaments and tendons using the quasi-linear viscoelastic model. *Biomechanics and modeling in mechanobiology,* 2007, vol. 6**,** p. 245-251.

DENKER H.-W., Embryonic Stem Cells: An Exciting Field for Basic Research and Tissue Engineering, but also an Ethical Dilemma? *Cells Tissues Organs,* 1999, vol. 165**,** p. 246-249.

DIAMANT J., KELLER A., BAER E., LITT M., ARRIDGE R. G. C., Collagen; ultrastructure and its relation to mechanical properties as a function of ageing. *Proceedings of the Royal Society of London. series B,* 1972, vol. 180**,** p. 293-315.

DJIAN P., 2004. Quelle plastie de LCA pour quels sportifs? Le médecin face aux indications chirurgicales et arthroscopiqes au membre inférieur, Paris.

DJIAN P., BELLIER G., CHRISTEL P., Aspects biologiques de la reconstruction du ligament croisé antérieur par une greffe tendineuse autologue. www.sofarthro.com. (1999)

DORY Y., Les protéines fibreuses. http://pages.usherbrooke.ca/ydory/pdf/BCM_300_04.PDF. (2006)

DROZDOV A. D., A model of adaptive links in finite viscoelasticity. *Mechanics Research Communications,* 1997, vol. 24**,** p. 161-167.

DRUKKER M., KATCHMAN H., KATZ G., FRIEDMAN S. E.-T., SHEZEN E., HORNSTEIN E., MANDELBOIM O., REISNER Y., BENVENISTY N., Human Embryonic Stem Cells and Their Differentiated Derivatives Are Less Susceptible to Immune Rejection Than Adult Cells. *Stem Cells,* 2006, vol. 24**,** p. 221-229.

DUTHON D. B., BAREA C., ABRASSART S., FASEL J. H., FRITSCHY D., MÉNÉTREY J., Anatomy of the anterior cruciate ligament. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy,* 2006, vol. 14**,** p. 204-213.

EL ALAM H., RAHOUADJ R., HABOUSSI M., CUNAT C., 2002. Extension du formalisme thermodynamique DNLR aux transformations finies. Premier congrès interdisciplinaire sur les matériaux en France, Tours.

EYRING H., HENDERSON D., STOVER B. J., EYRING E. M., Statistical mechanics and dynamics. 2d éd., New-York: A Wiley-Interscience publication, 1982, p. 785.

FAN H.B., LIU H.F., WONG E. J.W., TOH S. L., GOH J. C.H., In vivo study of anterior cruciate ligament regeneration using mesenchymal stem cells and silk scaffold. *Biomaterials,* 2008, vol. 29**,** p. 3324-3337.

FENNO L. E, PTASZEK L. M., COWAN C. A., Human embryonic stem cells: emerging technologies and practical applications. *Current opinion in Genetics & Development,* 2008, vol. 18**,** p. 1-6.

FERMOR B., URBAN J., MURRAY D., POCOCK A., LIM E., FRANCIS M., GAGE J., Proliferation and collagen synthesis of human anterior cruciate ligament cells in vitro: Effects of Ascorbate-2-Phosphate, Dexamethasone and Oxygen tension. *Cell Biology International,* 1998, vol. 22**,** p. 635-640.

FESSEL G., MÜLLER R., SNEDEKER J. G., 2008. Decorin mediated collagen fibril load sharing in tendon; protein level models and experiments. 16th Congress of the European Society of Biomechanics, Lucerne, Switzerland, Journal of Biomechanics.

FICHARD A., CHAHUT-DELALANDE H., RUGGIERO F., Le syndrome d'Ehlers-Danlos: l'architecture matricielle en question. *Médecine Sciences,* 2003, vol. 19**,** p. 443-451.

FRANCESCHI J.-P., POTEL J.-F., Réparation arthroscopique du ligament croisé antérieur: comparaison tendon rotulien versus tendon de la patte d'oie. *Revue de Chirurgie Orthopédique,* 2003, vol. 89**,** p. 66-69.

FRATZL P., MISOF K., ZIZAK I., RAPP G., AMENITSCH H., BERNSTORFF S., Fibrillar Structure and Mechanical Properties of Collagen. *Journal of Structural Biology,* 1997, vol. 122**,** p. 119-122.

FREEMAN J. W., WOODS M. D., LAURENCIN C. T., Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid-twist scaffold design. *Journal of Biomechanics,* 2007, vol. 40**,** p. 2029-2036.

FRISEN M., MAGI M., SONNERUP L., VIIDIK A., Rheological analysis of soft collagenous tissue. Part I: Theoretical considerations. *Journal of Biomechanics,* 1968, vol. 2**,** p. 13-20.

FUNG Y.C., Biomechanics: mechanical properties of living tissues. 2nd éd., New-York: Springer-Verlag, 1993, p. 568.

FUNG Y.C., FRONEK K., PATITUCCI P., Pseudoelasticity of arteries and the choice of its mathematical expression. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology,* 1979, vol. 237**,** p. H620-H631.

GARVIN J., QI J., MALONEY M., BANES A. J., Novel System for Engineering Bioartificial Tendons and Application of Mechanical Load. *Tissue Engineering,* 2003, vol. 9**,** p. 967-979.

GE Z., GOH J. C., LEE E. H., Selection of cell source for ligament tissue engineering. *Cell Transplant,* 2005, vol. 14**,** p. 573-583.

GE Z., YANG F., GOH J. C.H., RAMAKRISHNA S., LEE E. H., Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A,* 2006, vol. 77A**,** p. 639-652.

GENTLEMAN E., LIVESAY G. A., DEE K. C., NAUMAN E. A., Development of Ligament-Like Structural Organization and Properties in Cell-Seeded Collagen Scaffolds in vitro. *Annals of Biomedical Engineering,* 2006, vol. 34**,** p. 726-736.

GERMAIN L., BERTHOD F., MOULIN V., GOULET F., AUGER F.A., Principles of living organs reconstruction by tissue engineering. *In: Tissue Engineering and Novel Delivery Systems*. New-York 2004, p. 197-228.

GISSELFÄLT K., EDBERG B., FLODIN P., Synthesis and properties of degradable poly(urethane urea)s to be used for ligament reconstructions. *Biomacromolecules,* 2002, vol. 3**,** p. 951-958.

GLOUSMAN R., SHIELDS C., KERLAN R., JOBE F., LOMBARDO S., YOCIM L., TIBONE J., GAMBARDELLA R., Gore-Tex prosthetic ligament in anterior cruciate defficient knees. *American Journal of Sports and Medecine,* 1998, vol. 16**,** p. 321-326.

GUGGENHEIM E.A., Statistical thermodynamics: a version of statistical mechanics for students of physics and chemistry. éd., Cambridge: Cambridge: the university press, 1939, p.

HAGENMÜLLER H., MERKLE H. P., MEINEL L., MÜLLER R., 2008. Bone tissue engineering: effect of compression on growth patterns revealed by µCT monitoring. 16th Congress of the European Society of Biomechanics, Journal of Biomechanics.

HASHEMI J., CHANDRASHEKAR N., COWDEN C., SLAUTERBECK J., An alternative method of anthropometry of anterior cruciate ligament through 3-D digital image reconstruction. *Journal of Biomecahnics,* 2005, vol. 38**,** p. 551-555.

HELLER M., PROST-SQUARCIONI C., FRAITAG S., Les éléments constitutifs du derme et de l'hypoderme.

HORAN R. L., COLLETTE A. L., LEE C., ANTLE K., CHEN J.S., ALTMAN G. H., Yarn design for functional tissue engineering. *Journal of Biomecahnics,* 2006, vol. 39**,** p. 2232-2240.

HURSCHLER C., LOIT-RAMAGE B., VANDERBY R. JR., A structurally based stress-stretch relationship for tendon and ligament. *Journal of Biomechanical Engineering,* 1997, vol. 119**,** p. 392-399.

HURSCLER C., LOIT-RAMAGE B., VANDERBY R. JR., A structurally based stress-stretch relationship for tendon and ligament. *Journal of Biomechanical Engineering,* 1997, vol. 119**,** p. 392-399.

HUTMACHER D. W., Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials,* 2000, vol. 21**,** p. 2529-2543.

JOAHNSSON C. B., SVENSSON M., WALLSTEDT L., JANSON A. M., FRISEN J., Neural stem cells in the adult human brain. *Experimental Cell Research,* 1999, vol. 253**,** p. 733-736.

JOHNSON G.A., LIVESAY G.A., WOO S. L.Y., RAJAGOPAL K.R., A single integral finite strain viscoelastic model of ligaments and tendons. *Journal of Biomechanical Engineering,* 1996, vol. 118**,** p. 221-226.

JONES M., HOLT C., FRANYUTI D., 2008. Developing a methodology for the analysis of infant spine kinematics for the investigation of the shaken baby syndrome. 16th Congress of the European Society of Biomachanics, Lucerne, Switzerland, Journal of Biomechanics.

KADLER K. E., HOLMES D. F., TROTTER J. A., CHAPMAN J. A., Collagen fibril formation. *Biochemical Journal,* 1996, vol. 316**,** p. 1-11.

KAHN C. J.F., VAQUETTE C., RAHOUADJ R., WANG X., A novel bioreactor of ligament and tendon for Tissue Engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering,* 2008, vol. 18(Supplement 1).

KENNEDY R. M., GIBSON T., DALY C. H., Bioengineering studies of the human skin; the effects of unidirectional tension. *In: Structure and Function of Connective and Skeletal Tissue*. St. Andrews 1964, p. 388-395.

KIM S. G., AKAIJE T., SASAGAW T., ATOMI Y., KUROSAWA H., Gene expression of type I and type III collagen by mechanical stretch in anterior cruciate ligament cells. *Cell Struture and Function,* 2002, vol. 27**,** p. 139-144.

KIM S. J., LEE W. I., HEO H., SHIN O., KWON Y. K., LEE H., Stable gene expression by self-complementary adeno-associated viruses in human MSCs. *Biochememical and biophysical research,* 2007, vol. 360**,** p. 573-579.

KOH C. J., ATALA A., Tissue Engineering, Stem Cells, and Cloning: Opportunities for Regenerative Medecine. *Journal of the American Society of Nephrology,* 2004, vol. 15**,** p. 1113-1125.

LAKES R. S., VANDERBY R. JR., Interrelation of creep and relaxation: a modeling approach for ligaments. *Journal of Biomechanical Engineering,* 1999, vol. 121**,** p. 612-615.

LANGELIER E., RANCOURT D., BOUCHARD S., LORD C., STEVENS P.-P., GERMAIN L., AUGER F. A., Cyclic Traction Machine for Long-Term Culture of Fibroblast-Populated Collagen Gels. *Annals of Biomedical Engineering,* 1999, vol. 27**,** p. 67-72.

LANGER R., Biomaterials and biomedical engineering. *Chemical Engineering Science,* 1995, vol. 50**,** p. 4109-4121.

LANGER R., VACANTI J. P., Tissue Engineering. *Science,* 1993, vol. 260**,** p. 920-926.

LAURENCIN C. T., FREEMAN J. W., Ligament tissue engineering: An evolutionary materials science approach. *Biomaterials,* 2005, vol. 26**,** p. 7530-7536.

LEE C. H., SHIN H. J., CHO I. H., KANG Y.M., KIM I. A., PARK K.D., SHIN J.W., Nanofiber alignment and direction of mechanical strain affect the ECM production of human ACL fibroblast. *Biomaterials,* 2005, vol. 26**,** p. 1261-1270.

LEMAHIEU J.C., DECOSTER A., Les interférons. http://anne.decoster.free.fr. (2004)

LIANG R., WOO S. L.Y., TAKAKURA Y., MOON D. K., JIA F.Y., ABRAMOWITCH S. D., Long-Term Effects of Porcine Small Intestine Submucosa on the Healing of Medical Collateral Ligament: A Functional Tissue Engineering Study. *Journal of Orthopaedic Research,* 2006, vol.**,** p. 811-819.

LIAO H.Y., BELKOFF S. M., A failure model for ligaments. *Journal of Biomechanics,* 1999, vol. 32**,** p. 183-188.

LICHTENBERG A., DUMLU G., WALLES T., MARINGKA M., RINGES-LICHTENBERG S., RUHPARWAR A., MERTSCHING H., HAVERICH A., A multifunctional bioreactor for three-dimensional cell (co)-culture. *Biomaterials,* 2005, vol. 26**,** p. 555-562.

LIMBERT G., MIDDLETON J., A transversely isotropic viscohyperelastic material Application to the modeling of biological soft connective tissues. *International Journal of Solids and Structures,* 2004, vol. 41**,** p. 4237-4260.

LIN T.W., CARDENAS L., SOSLOWSKY L.J., Biomechanics of tendon injury and repair. *Journal of Biomechanics,* 2004, vol. 37**,** p. 865-877.

LIU H.F., FAN H.B., TOH S.L., GOH J. C.H., A comparison of rabbit mesenchymal stem cells and anterior cruciate liagament fibroblasts responses on combined silk scaffolds. *Biomaterials,* 2008a, vol. 29**,** p. 1443-1453.

LIU Y., RAMANATH H.S., WANG D.A., Tendon tissue engineering using scaffold enhancing strategies. *TRENDS in Biotechnology,* 2008b, vol. 26**,** p. 201-209.

MA P. X., Biomimetic materials for tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews,* 2008, vol. 60**,** p. 184-198.

MAGNENET V., RAHOUADJ R., BACHER P., CUNAT C., Inelastic constitutive relations for foamed materials: A statistical approach and its application to open-cell melamine. *Mechanics of Materials,* 2008, vol. Article in Press.

MARTIN I., WENDT D., HEBERER M., The role of bioreactors in tissue engineering. *TRENDS in Biotechnology,* 2004, vol. 22**,** p. 80-86.

MARTIN Y., VERMETTE P., Bioreactors for tissue mass culture: Design,characterization, and recent advances. *Biomaterials,* 2005, vol. 26**,** p. 7481-7503.

MINUTH W. W., SITTINGER M., KLOTH S., Tissue engineering: generation of differentiated artificial tissues for biomedical applications. *Cell Tissue Research,* 1998, vol. 291**,** p. 1-11.

MJAHED H., PORCEL C., SENGER B., CHASSEPOT A., NETTER P., GILLET P., DECHER G., VOEGEL J.C., SCHAAF P., BENKIRANE-JESSEL N., BOULMEDAIS F., Micro-stratified architectures based on successive stacking of alginate gel layers and poly(L-lysine)-hyaluronic acid multilayer films aimed at tissue engineering. *Soft Matter,* 2008, vol. 4, p. 1422-1429.

MOLÉ D., ROCHE O., BOUSSATON M. , POTEL J.F., 1996. Ligaments synthétiques et renforts, Problèmes spécifiques, Ethiopathogénie et fréquence des échecs. Conférences d'enseignement de la Société Française d'Arthroscopie.

MOREAU J. E., BRAMONO D. S., HORAN R. L., KAPLAN D. L., ALTMAN G. H., Sequential Biochemical and Mechanical Stimulation in the development of Tissue-Engineering Ligaments. *Tissue Engineering: Part A,* 2008, vol. 14**,** p. 1161-1172.

MOREAU J. E., CHEN J.S., BRAMONO D. S., VOLLOCH V., CHERNOFF H., VUNJAK-NOVAKOVIC G., RICHMOND J. C., KAPLAN D. L., ALTMAN G. H., Growth factor induced fibroblast differentiation from human bone marrow stromal cells in vitro. *Journal of Orthopaedic Research,* 2005, vol. 23**,** p. 164-174.

MORGAN, F. R., The mechanical properties of collagen fibres: Stress-strain curves. *Journal of the Society of Leather Trades Chemists,* 1960, vol. 44**,** p. 171-182.

MRABET K., RAHOUADJ R., CUNAT C., An irreversible thermodynamic model for semicrystalline polymers submitted to multisequence loading at large strain. *Polymer Engineering and Science,* 2004, vol. 45**,** p. 42-51.

NAGASAWA K., NOGUCHI M., IKOMA K., KUBO T., Static and dynamic biomechanical properties of the regenerating rabbit Achilles tendon. *Clinical Biomechanics,* 2008, vol. 23**,** p. 832-838.

NELISSEN R. G., HOGENDOORN P. C., Retain or sacrifice the posterior cruciate ligament in total knee arthroplasty? A histological study of the cruciate ligament in osteoarthritic and rheumatoid disease. *Journal of Clinical Pathology,* 2001, vol. 54**,** p. 381-384.

NEYRET P., 2002. Entorses récentes du genou chez l'adulte. Conférences d'Enseignement de la Société Française d'Arthroscopie.

ODDOU C., PIERRE, J., Biomechanics aspects in tissue engineering. *Clinical hemorheology and microcirculation*, 2005, vol. 33, p. 189-195.

OLSON E.J., KANG J.D., FU F.H., GEORGESCU H.I., MASON G.C., EVANS C.H., The biochemical and histological effects of artificial ligament wear particles: In vitro and in vivo studies. *American Journal of Sports and Medecine,* 1988, vol. 16**,** p. 558-570.

OZA A., LAKES R. S., VANDERBY R. JR., 2004. Prediction of relaxation from creep in ligaments. Annual Meeting of the American Society of Biomechanics, Portland, OR.

PARIER J. MD, Les tendinites du genou. http://www.genou.com/articles/JP-Tendinites.htm.

PARIER J. MD, LUCAS D. MD, Le syndrome de l'essuie glace ou de la bandelette iliotibiale. http://www.gnou.com/tfl/tfl.htm. (2004)

PAULOS L.E., ROSENBERG T.D., GREWE S.R., TEARSE D.S., BECK C.L., The Gore-Tex anterior crucite ligament prosthesis: A long term followup. *American Journal of Sports and Medecine,* 1992, vol. 20**,** p. 246-252.

PEÑA E., CALVO B., MARTINEZ M.A., DOBLARÉ M., An anisotropic visco-hyperelastic model for ligaments at finite strains. Formulation and computational aspects. *International Journal of Solids and Structures,* 2007, vol. 44**,** p. 760-778.

PEÑA E., PEÑA J. A., DOBLARÉ M., On modelling nonlinear viscoelastic effects in ligaments. *Journal of Biomechanics,* 2008, vol. 41**,** p. 2659-2666.

PETRIGLIANO F. A., McALLISTER D. R., WU B. M., Tissue Engineering for Anterior Cruciate Ligament Reconstruction: A Review of Current Strategies. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic and Related Surgery,* 2006, vol. 22**,** p. 441-451.

PIOLETTI D. P., RAKOTOMANANA L. R., Non-linear viscoelastic laws for soft biological tissues. *European Journal of Mechanics A-Solids,* 2000, vol. 19**,** p. 749-759.

PIOLETTI D. P., RAKOTOMANANA L. R., BENVENUTI J.-F., LEYVRAZ P.-F., Viscoelastic constitutive law in large deformations: application to human knee ligaments and tendons. *Journal of Biomechanics,* 1998, vol. 31**,** p. 753-757.

PIOLETTI D. P., Viscoelastic properties of soft tissues: application to knee ligaments and tendons. PhD. thesis, 1997, Ecole Polytechnique Fédérale de Lausanne, Lausanne

PITTENGER M. F., MACKAY A. M., BECK S. C., JAISWAL R. K., DOUGLAS R., MOSCA J. D., MOORMAN M. A., SIMONETTI D. W., CRAIG S., MARSHAK D. R., Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science,* 1999, vol. 284**,** p. 143-147.

PÖRTNER R., NAGEL-HEYER S., GOEPFERT C., ADAMETZ P., MEENEN N. M., Bioreactor Design for Tissue Engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering,* 2005, vol. 100**,** p. 235-245.

PRIGOGINE I., Introduction à la Thermodynamique des Processus Irréversibles. éd., Paris: Dunod, 1968, p.

PROVENZANO P. P., LAKES R. S., CORR D. T., VANDERBY R. JR., Application of nonlinear viscoelastic models to describe ligament behavior. *Biomechan Model Mechanobiol,* 2002, vol.**,** p. 45-57.

PROVENZANO P., LAKES R., KEENAN T., VANDERBY R. JR., Nonlinear Ligament Viscoelasticity. *Annals of Biomedical Engineering,* 2001, vol. 29**,** p. 908-914.

PROVENZANO P. P., VANDERBY R. JR., Collagen fibril morphology and organization: Implications for force transmission in ligament and tendon. *Matrix Biology,* 2006, vol. 25**,** p. 71-84.

QUESNEY S., MARC A., GERDIL C., GIMENEZ C., MARVEL J., RICHARD Y., MEIGNIER B., Kinetics and metabolic specificities of Vero cells in bioreactor cultures with serum-free medium. *Cytotechnology,* 2003, vol. 42, p.1-11.

RODRIGUEZ J. F., CACHO F., BEA J. A., DOBLARÉ M., A stochastic-structurally based three dimensional finite-strain damage model for fibrous soft tissue. *Journal of the Mechanics and Physics of Solids,* 2006, vol. 54**,** p. 864-886.

SAHOO S., OUYANG H., GOH J. C.H., TAY T.E., TOH S.L., Characterization of a Novel Polymeric Scaffold for Potential Application in Tendon/Ligament Tissue Engineering. *Tissue Engineering,* 2006, vol. 12**,** p. 91-99.

SARVER J. J., ROBINSON P. S., ELLIOTT D. M., Methods for Qusi-Linear Viscoelastic Modeling of Soft Tissue: Application to Incremental Stress-Relaxation Experiments. *Journal of Biomechanical Engineering,* 2003, vol. 125**,** p. 754-758.

SASAKI N., ODAJIMA S., Stress-strain curve and Young's modulus of a collagen molecule as determined by the X-ray diffraction technique. *Journal of Biomecahnics,* 1996, vol. 29**,** p. 655-658.

SAVALLI L., HERNANDEZ-SENDIN M. I., PUIG P. L., TROUVÉ P. T., Douleurs après ligamentoplastie du ligament croisé antérieur: démembrement et prise en charge. *Annales de réadaptation et de médecine physique,* 2004, vol. 47**,** p. 299-308.

SHIEH S.J., VACANTI J. P., State-of-the-art tissue engineering: From tissue engineering to organ building. *Surgery,* 2005, vol. 137**,** p. 1-7.

SILVER F. H., FREEMAN J. W., SEEHRA G. P., Collagen self-assembly and the development of tendon mechanical properties. *Journal of Biomecahnics,* 2003, vol. 36**,** p. 1529-1553.

SKUTEK M., VAN GRIENSVEN M., ZEICHEN J., BRAUER N., BOSCH U., Cyclic mechanical stretching of human patellar tendon fibroblasts: activation of JNK and modulation of apoptosis. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy,* 2003, vol. 11**,** p. 122-129.

SONG Y., DEBSKI R. E., MUSAHL V., THOMAS M., WOO S. L.Y., A three-dimensional finite element model of the human anterior cruciate ligament: a computational analysis with experimental validation. *Journal of Biomecahnics,* 2004, vol. 37**,** p. 383-390.

SUBIT D., Modelisation de la liaison os-ligament dans l'articulation du genou. PhD. thesis, 2004, Université de la Méditerranée (Aix-Marseille II), Aix-Marseille

SWITZER B. R., SUMMER G. K., Collagen Synthesis in Human Skin Fibroblasts: Effects of Ascorbate, α-Ketoglutarate and Ferrous Ion on Proline Hydroxylation. *Journal of Nutrition,* 2008, vol. 102**,** p. 721-728.

TALEI FRANZESI G., Design of novel anterior cruciate ligament prosthesis. PhD. thesis, 2006, Massachusetts Institute of Technology,

THE T. K.H., MOE K., TOH S.L., GOH J. C.H., 2006. Advanced Bioreactor System for Tendon/Ligament Regeneration. 2nd International Symposium on Biomedical Engineering, Bangkok.

TISZA L., Generalized thermodynamics. 1er ed. éd., Cambridge (MA): MIT press, 1977, p. 384.

TOBITA M., CAGRI UYSAL A., OGAWA R., HYAKUSOKU H., MIZUNO H., Periodontal Tissue Regeneration with Adipose-Derived Stem Cells. *Tissue Engineering: Part A,* 2008, vol. 14**,** p. 945-953.

VALLÉE M., CÔTÉ J.F., FRADETTE J., Adipose-tissue engineering: Taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells. *Pathologie Biologie,* 2008, vol. (in press).

VAN EIJK F., RIESLE J., WILLEMS W. J., VAN BLITTERSWIJK C. A., VERBOUT A. J., DHERT W. J.A., Tissue Engineering of ligaments: A comparison of bone stromal cells, anterior cruciate ligament, and skin fibroblasts as cell source. *Tissue Engineering,* 2004, vol. 10.

VAQUETTE C., Elaboration et caractérisation de structures tridimensionnelles pour l'ingénierie tissulaire. PhD. thesis, 2008, Nancy-Université-INPL, Vandoeuvre-lès-Nancy

VEPARI C., KAPLAN D. L., Silk as a biomaterial. *Progress in Polymer Science,* 2007, vol. 32**,** p. 991-1007.

VERONDA D. R., WESTMANN R. A., Mechanical characterization of skin-finite deformation. *Journal of Biomechanics,* 1970, vol. 3**,** p. 111-124.

VESENTINI S., FITIÉ C. F.C, MONTEVECCHI F. M., REDAELLI A., Molecular assessment of the elastic properties of collagen-like homotrimer sequences. *Biomechanical Model of Mechanobiology,* 2005, vol. 3**,** p. 224-234.

VIIDIK A., A rheological model for uncalcified parallel-fibred collagenous tissue. *Journal of Biomechanics,* 1968, vol. 1**,** p. 3-11.

VIOLA J., LAL B., GRAD O., 2003. The emmergence of Tissue Engineering as a Research Field, National Science Foundation.

VUNJAK-NOVAKOVIC G., ALTMAN G. H., HORAN R. L., KAPLAN D. L., Tissue Engineering of ligaments. *Annual Review of Biomedical Engineering,* 2004, vol. 6**,** p. 131-156.

WANG J. H.C., Mechanobiology of tendon. *Journal of Biomecahnics,* 2006, vol. 39**,** p. 1563-1582.

WANG J. H.C., THAMPATTY B. P., LIN J.S., IM H.J., Mechanoregulation of gene expression in fibroblasts. *Gene,* 2007, vol. 391**,** p. 1-15.

WANG J. H.C., YANG G.G., LI Z.Z., SHEN W., Fibroblast responses to cyclic mechanical stretching depend on cell orientation to the stretching direction. *Journal of Biomecahnics,* 2004, vol. 37**,** p. 573-576.

WANG Y., DE ISLA N., HUSELSTEIN C., WANG B., NETTER P., STOLTZ J.F., MULLER S., Effect of alginate culture and mechanical stimulation on cartilaginous matrix synthesis of rat dedifferentiated chondrocytes. *Bio-Medical Materials and Engineering,* 2008, vol. 18(Supplement 1), p. 47-54.

WEBER I. T., HARRISON R. W., IOZZO R. V., Model structure of decorin and implications of collagen fibrillogenesis. *The Journal of Biological Chemistry,* 1996, vol. 271**,** p. 31767-31770.

WEISS J. A., GARDINER J. C., Computational Modeling of Ligament Mechanics. *Biomedical Engineering,* 2001, vol. 29**,** p. 1-70.

WOO S. L.Y., GOMEZ M.A., AKESON W.H., The time and history-dependent viscoelastic properties of the canine medial collateral ligaments. *Journal of Biomechanical Engineering,* 1981, vol. 103**,** p. 293-298.

WOO S. L.Y., ABRAMOWITCH S. D., KILGER R., LIANG R., Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair. *Journal of Biomecahnics,* 2006, vol. 39**,** p. 1-20.

WREN T. A.L., LINDSEY D. P., BEAUPRÉ G. S., CARTER D. R., Effects of Creep and Cyclic Loading on the Mechanical Properties and Failure of Human Achilles Tendons. *Annals of Biomedical Engineering,* 2003, vol. 31**,** p. 710-717.

WRIGHT D. M., DUANCE V. C., WESS T. J., KIELTY C. M., PURSLOW P. P., The supromolecular organisation of fibrillin-rich microfibrils determines the mechanical properties of bovine zonular filaments. *The Journal of Experimental Biology,* 1999, vol. 202**,** p. 3011-3020.

YAMAMOTO M., CUI L., JOHKURA K., ASANUMA K., OKOUCHI Y., OGIWARA N., SASAKI K., Branching ducts similar to mesonephric ducts or uretic buds in teratomas originating from mouse embryonic stem cells. *American Journal of Physiology-Renal Physology,* 2006, vol. 290**,** p. 52-60.

YANG G.G., CRAWFORD R. C., WANG J. H.C., Proliferation and collagen production of human patellar tendon fibroblasts in response to cyclic uniaxial stretching in serum-free conditions. *Journal of Biomechanics,* 2004, vol. 37**,** p. 1543-1550.

YIN L., ELIOTT D. M., A biphasic and transversely isotropic mechanical model for tendon: application to mouse tail fascicles in uniaxial tension. *Journal of Biomechanics,* 2004, vol. 37**,** p. 907-916.

YIN L., ELLIOTT D. M., A biphasic and transversely isotropic mechanical model for tendon: application to mouse tail fascicles in uniaxial tension. *Journal of Biomechanics,* 2004, vol. 37**,** p. 907-916.

ZANTOP T., PETERSON W., SEKIYA J. K., MUSHAL V., FU F. H., Anterior cruciate ligament anatomy and function relating to anatomical reconstruction. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy,* 2006, vol. 14**,** p. 982-992.

ZHANG G., YOUNG B.B., EZURA Y., FAVATA M., SOSLOWSKY L.J., CHAKRAVARTI S., BIRK D. E., Development of tendon structure and function: Regulation of collagen fibrillogenesis. *Journal of Musculoskeletal and Nauronal Interactions,* 2005, vol. 5**,** p. 5-21.

ZHANG L., Utilisation de Cellules Souches Mésenchymateuses Médullaire en Bioingénierie Tissulaire du Ligament. PhD. thesis, 2008, INPL, Vandoeuvre-lès-Nancy

ZHANG L., KAHN C. J.F., CHEN H.Q., TRAN N., WANG X., The effect of uniaxial stretching on rat bone mesenchymal stem cell: orientation and expressions of collagen types I & III and tenascin-C. *Cell Biology International,* 2008a, vol. 32**,** p. 344-352.

ZHANG L., TRAN N., CHEN H.Q., KAHN C. J.F., MARCHAL S., GROUBATCH, F., WANG X., Time-related changes in expression of collagen types I and III and of tenascin-C in rat bone mesenchymal stem cells under co-culture with ligament fibroblasts or uniaxial stretching. *Tissue and Cell Research.,* 2008b, vol. 332**,** p. 101-109.

INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE
DE LORRAINE

AUTORISATION DE SOUTENANCE DE THESE
DU DOCTORAT DE L'INSTITUT NATIONAL
POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

o0o

VU LES RAPPORTS ETABLIS PAR :
Madame Nadia BENKIRANE-JESSEL, Chargée de Recherche, INSERM, Faculté de Médecine, Strasbourg

Monsieur Christian ODDOU, Professeur, Université de Paris 7, 12, 13 Créteil

Le Président de l'Institut National Polytechnique de Lorraine, autorise :

Monsieur KAHN Cyril

NANCY BRABOIS
2, AVENUE DE LA
FORET-DE-HAYE
BOITE POSTALE 3
F - 54501
VANDŒUVRE CEDEX

à soutenir devant un jury de l'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE, une thèse intitulée :

"Ingénierie Tissulaire des Ligaments Conception d'un Bioréacteur et Etude des Propriétés Mécaniques"

en vue de l'obtention du titre de :

DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE DE LORRAINE

Spécialité : « **Mécanique et Energétique** »

Fait à Vandoeuvre, le 19 janvier 2009
Le Président de l'I.N.P.L.,
F. LAURENT



TEL. 33/03.83.59.59.59
FAX. 33/03.83.59.59.55

Ingénierie Tissulaire des Ligaments
Conception d'un Bioréacteur et Etude des Propriétés Mécaniques

Résumé
L'ingénierie tissulaire vise à l'élaboration de prothèses biologiques par la régénération ou la culture, *in vitro* ou *in viv*o, de tissus ou d'organes. Dans la stratégie de culture *in vitro*, le développement de nouveaux outils, tels que des bioréacteurs, permettant la culture de cellules ou de tissus sous sollicitations mécaniques spécifiques au tissu est primordial. De plus, l'avancée de cette discipline dans la régénération des tissus nécessite de développer, dès à présent, des méthodes d'évaluation mécanique satisfaisantes permettant de comparer ces néo-tissus aux tissus sains selon des critères de sollicitations physiologiques. En effet, pour parvenir à une bonne évaluation de ces matériaux, il est nécessaire de pouvoir les tester sur des chargements représentatifs des sollicitations physiologiques auxquelles ils sont soumis.
Nous avons ainsi, dans un premier temps, conçu et développé un bioréacteur de ligaments permettant la culture de cellules stimulées mécaniquement par des sollicitations cycliques de traction-torsion. Ce bioréacteur a été dimensionné afin de pouvoir obtenir des bio-prothèses de taille comparable aux ligaments et tendons à remplacer (4 à 5 cm de long).
Nous avons, dans un deuxième temps, développé un modèle du comportement mécanique global de ces tissus à partir du formalisme thermodynamique développé au sein de notre laboratoire et des observations faites sur des tendons d'Achille de lapin. Ce modèle a pour but d'approfondir la compréhension des structures intervenant de façon prépondérante dans la qualité mécanique de ces tissus ainsi que l'évaluation et l'optimisation des matrices de support et des néo-tissus devant s'y substituer.

Ingénierie Tissulaire, tendon, ligament, bioréacteur, modèle mécanique, chargement cyclique, relaxation, matrice de support, culture *in vitro*

Tissue Engineering of Ligaments
Bioreactor Design and Study of the Mechanical Properties

Abstract
Tissue Engineering aims to fabricate bio-prostheses by regenerating or culture, *in vivo* or *in vitro*, tissues or organs. In the *in vitro* strategy, developing new tools such as bioréactors which allow the culture of cells or tissues under their specific mechanical solicitations is a huge point. Moreover, the last advances of this discipline in regeneration of tissues require new mechanical model allowing their evaluation and comparison to native tissue under physiological loading. Indeed, in order to obtain a good evaluation of their mechanical quality, it is important to be able to applied mechanical solicitations linked to physiological ones.
As a first step, a bioreactor of ligament allowing the culture of cells under mechanical solicitations of cyclic traction-torsion was designed and developed. This bioreactor was sized to potentially obtain a bio-prosthesis comparable to native tissue in term of size (4 to 5 cm long).
In a second time, a mechanical model was elaborated based on a thermodynamic formalism developed in our laboratory and the observation made on rabbit Achilles tendons. The goals of this model are to improve our knowledge on the mayor structures involved into the mechanical quality of theses tissues and to evaluate and optimise the scaffolds and neo-tissues of substitution.

Tissue Engineering, tendon, ligament, bioreactor, mechanical model, cyclic loading, relaxation, scaffold, *in vitro* culture