

Université de Montréal

**CARACTÉRISATION ET ÉVALUATION *IN VITRO* DE LA  
SECTION OSSEUSE DE TREILLIS 3D POLYMÉRIQUES  
OSTÉOCHONDRAUX POUR LE REMPLACEMENT DE  
CARTILAGE ARTICULAIRE PAR GÉNIE TISSULAIRE**

par

Caroline Auclair-Daigle

Institut de Génie Biomédical  
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures en vue de  
l'obtention du grade de Maître ès sciences appliquées (M.Sc.A.) en Génie  
Biomédical

Juillet 2005

© Caroline Auclair-Daigle, 2005.



W

4

U58

2005

V. 147

**Direction des bibliothèques**

**AVIS**

L'auteur a autorisé l'Université de Montréal à reproduire et diffuser, en totalité ou en partie, par quelque moyen que ce soit et sur quelque support que ce soit, et exclusivement à des fins non lucratives d'enseignement et de recherche, des copies de ce mémoire ou de cette thèse.

L'auteur et les coauteurs le cas échéant conservent la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent ce document. Ni la thèse ou le mémoire, ni des extraits substantiels de ce document, ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans l'autorisation de l'auteur.

Afin de se conformer à la Loi <sup>1</sup> canadienne sur la protection des renseignements personnels, quelques formulaires secondaires, coordonnées ou signatures intégrées au texte ont pu être enlevés de ce document. Bien que cela ait pu affecter la pagination, il n'y a aucun contenu manquant.

**NOTICE**

The author of this thesis or dissertation has granted a nonexclusive license allowing Université de Montréal to reproduce and publish the document, in part or in whole, and in any format, solely for noncommercial educational and research purposes.

The author and co-authors if applicable retain copyright ownership and moral rights in this document. Neither the whole thesis or dissertation, nor substantial extracts from it, may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms, contact information or signatures may have been removed from the document. While this may affect the document page count, it does not represent any loss of content from the document.

Université de Montréal  
Faculté des Études Supérieures

Ce mémoire, intitulé :

**CARACTÉRISATION ET ÉVALUATION *IN VITRO* DE LA  
SECTION OSSEUSE DE TREILLIS 3D POLYMÉRIQUES  
OSTÉOCHONDRAUX POUR LE REMPLACEMENT DE  
CARTILAGE ARTICULAIRE PAR GÉNIE TISSULAIRE**

présenté par :

Caroline Auclair-Daigle

a été dûment évalué et accepté par un jury composé de :

M. Robert-A. LeBlanc, Ph.D.  
Président-rapporteur

M. Julio Fernandes, M.D., M.Sc.  
Directeur de recherche

M. Daniel Lajeunesse, Ph.D.  
Co-directeur de recherche

M. Mohamed Benderdour, Ph.D.  
Membre

## RÉSUMÉ

La conception de treillis 3D ostéocondraux représente un défi important. La porosité requise pour la colonisation cellulaire diminue la rigidité des treillis. L'objectif est d'améliorer les performances mécaniques de la composante osseuse des structures polymériques tout en favorisant une croissance cellulaire optimale.

Des treillis de PLA (poly-lactide) et de PCL (poly-caprolactone) ont été fabriqués par les techniques de « 3D-bioplotting » et « porogen-leaching », respectivement. Le modèle biphasique est utilisé afin de modéliser le comportement lors d'un chargement en compression. Un logiciel de modélisation est utilisé afin de prédire la distribution des contraintes mécaniques. Des tests de cytotoxicité, de décompte de protéine et d'histologie ont été effectués. Les analyses ont été conduites à 24h, 1-, 2-semaines d'incubation en milieu de culture pour le PCL, et additionnellement jusqu'à 4- et 8 semaines pour les treillis de PLA.

Les différences de propriétés entre le treillis et le tissu pourraient affecter la croissance cellulaire et par conséquent l'efficacité de cette technique pour le remplacement du cartilage/os. La comparaison des résultats de simulation en compression démontre que les contraintes mécaniques dans les treillis en PCL et dans le cartilage sont similaires. Les données obtenues *in vitro* prouvent la non-toxicité du PCL et du PLA. Le décompte de protéines démontre une augmentation de la quantité de protéines en fonction de la durée d'incubation, allant de pair avec l'élévation du ratio de la viabilité cellulaire. Les coupes histologiques des treillis de PCL montrent une migration cellulaire importante à l'intérieur de la microstructure poreuse.

Des périodes d'incubation plus longues permettraient un meilleur suivi du développement de la colonisation cellulaire, tout en permettant de valider les prédictions émises par les logiciels de modélisation numérique. Un outil de modélisation plus raffiné et plus ciblé permettrait d'optimiser les caractéristiques du treillis. Des études *in vitro* menées sur un nombre d'échantillons plus élevé permettront une investigation plus exhaustive et plus concluante.

**Mots-clés :** Génie Tissulaire, cartilage articulaire, ostéocondral, os, « bioplotter »

## ABSTRACT

The design of hybrid cartilage-bone scaffolds is challenging since the high level of porosity required for tissue ingrowth reduces the stiffness of scaffold. This work aims to improve the mechanical performance of these constructs while providing the optimal porosity.

PLA (poly-lactide) and PCL (poly-ε caprolactone) scaffolds were fabricated by 3D-bioplotting and porogen-leaching techniques, respectively. The biphasic theory was used to model the performance of scaffolds under compressive loads. A modelling software was used to predict the stress distribution in the constructs surrounded by native tissues. Cell culture analyses were conducted in order to evaluate the cytotoxicity and protein count of the scaffolds. Histological examination allowed for observations at the scaffold microstructure level as well as for the cell migration within. Analyses were performed at 24h, 1- and 2-weeks post-incubation for the PCL scaffolds, and additionally after 4- and 8-weeks for the PLA samples.

The property mismatch between the scaffold and native tissues has the potential of reducing the level of tissue ingrowth, and as a consequence affecting the efficiency of this technique for cartilage/bone replacement. The comparison of simulation results under compressive loads demonstrated that the stress field inside PCL scaffolds and that of cartilage are similar. In vitro assays data proved PCL and PLA scaffolds to be non toxic. Protein count values showed an elevation in protein amount according to incubation time, in parallel with the elevation of cell viability. Histological slides showed the presence of migrated cells within the scaffolds' micro porous structure. Higher incubation time would allow for a better understanding of the cell colonisation throughout the pores, as well as for the validation of the predictions generated by the performance modelling softwares.

A modelling tool would allow optimising the performance of scaffolds. In vitro studies performed on higher sample number and incubation time would allow for a more elaborate and conclusive investigation.

**Key Words :** Tissue engineering, articular cartilage, osteochondral, bone, bioplotter

# TABLE DES MATIÈRES

<b>RÉSUMÉ</b> .....	<b>IV</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>V</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b> .....	<b>VI</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b> .....	<b>VIII</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b> .....	<b>IX</b>
<b>LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS</b> .....	<b>XI</b>
<b>DÉDICACE</b> .....	<b>13</b>
<b>REMERCIEMENTS</b> .....	<b>14</b>
<b>CHAPITRE 1 : INTRODUCTION</b> .....	<b>15</b>
1.1.    GÉNIE TISSULAIRE .....	15
1.2.    PERTINENCE ET IMPACT ÉCONOMIQUE AU NIVEAU DE LA SOCIÉTÉ NORD-AMÉRICAINNE .....	17
1.3.    TENDANCES ET APPROCHES POUR LE REMPLACEMENT DE CARTILAGE ARTICULAIRE .....	19
<b>CHAPITRE 2 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE</b> .....	<b>24</b>
2.1.    LE CARTILAGE .....	24
2.2.    LES CARTILAGES DU SYSTÈME OSTÉO-ARTICULAIRE.....	25
2.3.    LE CARTILAGE ARTICULAIRE.....	27
2.4.    L'OS SOUS-CHONDRAL .....	30
2.5.    DÉGÉNÉRESCENCE DU CARTILAGE ARTICULAIRE.....	34
2.6.    LA RÉPONSE BIOMÉCANIQUE DU CARTILAGE.....	37
2.7.    OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES : .....	38
<b>CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE</b> .....	<b>40</b>
3.1.    MATÉRIEL .....	40
3.2.    FABRICATION DES TREILLIS.....	40
3.2.1. <i>Technique par [Porogen-Leaching] pour les treillis en PCL</i> .....	40
3.2.2. <i>Technique par Bioplotter en 3-dimensions pour les treillis en PLA</i> .....	42
3.3.    CONCEPTION DES TREILLIS ET SIMULATION DE LA RÉPONSE BIOMÉCANIQUE .....	44
3.4.    ÉVALUATION BIOLOGIQUE .....	46

3.4.1.	<i>Étude In Vitro</i> .....	46
3.4.1.1.	Analyses Biochimiques .....	48
3.4.1.1.1.	Cytotoxicité.....	48
3.4.1.1.2.	Décompte De Protéines.....	49
3.4.1.2.	Observation Histologique.....	50
3.4.1.3.	Test Biomécanique.....	51
3.4.1.4.	Analyse Statistique.....	52
<b>CHAPITRE 4 : ARTICLE SCIENTIFIQUE.....</b>		<b>54</b>
<b>CHAPITRE 5 : SYNTHÈSE SUBSTANTIELLE.....</b>		<b>94</b>
5.1.	CONCEPTION DES TREILLIS ET OPTIMISATION TOPOLOGIQUE .....	95
5.2.	SIMULATIONS PAR ANALYSE D'ÉLÉMENTS FINIS.....	97
5.3.	CARACTÉRISATION MÉCANIQUE .....	98
5.4.	ÉTUDE <i>IN VITRO</i> .....	99
5.4.1.	<i>Analyses Biochimiques</i> .....	99
5.4.1.1.	Cytotoxicité.....	99
5.4.1.2.	Décompte de protéines .....	100
5.4.2.	<i>Examination Histologique</i> .....	101
<b>CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS.....</b>		<b>103</b>
<b>RÉFÉRENCES .....</b>		<b>105</b>
<b>REFERENCES ÉLECTRONIQUES.....</b>		<b>109</b>



## **LISTE DES TABLEAUX**

Tableau 1 : Mesures de Densité et de Porosité (PCL).....41

Tableau 2 : Mesures de Densité et de Porosité (PLA) .....43

## LISTE DES FIGURES

- Figure 1 : Schéma représentatif de la vaste étendue du potentiel du génie tissulaire, où la régénération de tissus aussi variés que le corps en dispose s'avère maintenant réalisable et en pleine expansion<sup>2</sup> ..... 16
- Figure 2 : Schéma définissant les deux grandes approches propres au génie tissulaire, soit la composante *In vitro* (I), ainsi que celle *In vivo* (II)<sup>5</sup> ..... 18
- Figure 3 : Approche récapitulative par génie tissulaire pour le développement de treillis tridimensionnels pour le remplacement de tissus lésé du corps humain<sup>7</sup> ... 19
- Figure 4 : Approche pour le développement de treillis faisant appel à un bioréacteur afin de stimuler et de contrôler les caractéristiques du treillis<sup>10</sup> ..... 21
- Figure 5: Cartilage situé au niveau d'un joint, recouvrant les deux surfaces de têtes osseuses distinctes et opposées<sup>11</sup> ..... 24
- Figure 6 : Schéma représentatif de l'inflammation caractéristique des pathologies d'ordre arthritique, où le cartilage articulaire situé au niveau des joints se dégrade jusqu'au point de dégénération<sup>13</sup> ..... 26
- Figure 7 : Schéma représentant la présence du cartilage articulaire au niveau d'une articulation mobile<sup>14</sup> ..... 27
- Figure 8 : Schéma et coupe histologique (droite) représentant le cartilage articulaire (en jaune) ainsi que les différentes composantes environnantes<sup>15</sup> ..... 27
- Figure 9 : Schéma récapitulatif de la composition du cartilage articulaire, indiquant les cellules cartilagineuses (chondrocytes) comprises à l'intérieur d'une structure tri-dimensionnelle organisée, composée de fibres de collagène et de volumineuses molécules nommées protéoglycanes<sup>16</sup> ..... 28
- Figure 10 : Schéma représentatif du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral<sup>17</sup> . 30

Figure 11 : Schéma et radiographie à rayons-X d'un genou normal <sup>18</sup> .....	34
Figure 12 : Schéma (gauche) et radiographies d'un genou avec pincement incomplet (milieu) et complet (droite) du cartilage articulaire <sup>19</sup> .....	34
Figure 13 : Radiographies de genou arthritique montrant la perte d'espace entre les têtes osseuses fémorale et tibiale. Plan frontal (gauche) et de côté (droite) <sup>20</sup> ...	35
Figure 14 : Schéma démontrant le procédé de fabrication par Bioplotter 3D <sup>21</sup> .....	42
Figure 15 : (a) Bioplotter 3D utilisé pour la fabrication des treillis de PLA; (b) & (c) patrons utilisés avec le bioplotter 3D; (d) échantillons de treillis <sup>22</sup> .....	43
Figure 16 : Modélisation numérique du cartilage articulaire <sup>23</sup> .....	44
Figure 17 : Schéma représentant un modèle de biorhéomètre <sup>24</sup> .....	51

## LISTE DES SYMBOLES ET ABRÉVIATIONS

BCA : « Bicinchoninic Acid »

BSA : « Bovine Serum Albumine »

°C : degrés Celcius

cm : centimètre

cm<sup>2</sup> : centimètre carré

CRCHUM : Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

g : gramme

h : heure

L : litre

MEC : matrice extracellulaire

MEM : modified eagle medium

min : minute

mm : millimètre

mm/s : millimètre par seconde

MTT : (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)2,5-diphenyl tetrazolium bromide)

NaCl : chlorure de sodium

nm : nanomètre

OD : « optical density »

PCL : Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)

PEO : Oxyde de polyéthylène

PLA : Poly-Lactide

RMI : résonance magnétique par imagerie

s : seconde

$s^{-1}$  : 1 / seconde

$\mu\text{g}$  : microgramme

$\mu\text{L}$  : microlitre

$\mu\text{m}$  : micromètre

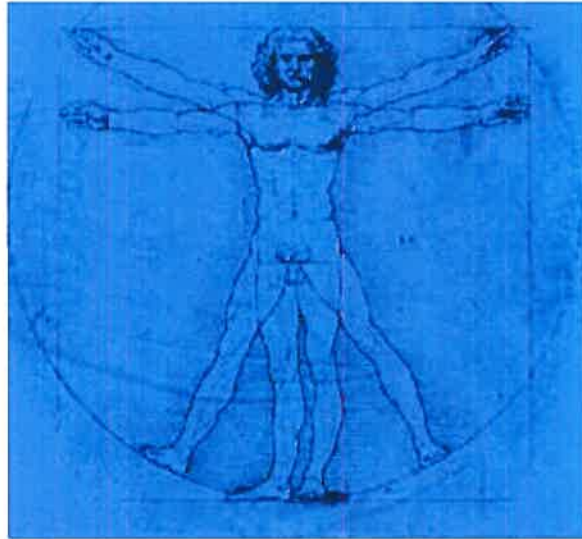
$V_f$  : fraction volumique

vol. : volume

% : pourcentage

3D : trois dimensions (tridimensionnel)

## DÉDICACE



À toi Charles,  
pour toutes les attentions, le temps et  
l'amour que tu m'accordes.

## REMERCIEMENTS

Avant tout, je souhaite démontrer ma gratitude envers le Dr. Robert-Aimé LeBlanc, qui a su prendre le temps de m'écouter et de m'orienter vers ce projet.

Puis, je tiens à remercier tout spécialement le Dr. Julio Fernandes de m'avoir accueillie au sein de son équipe de recherche, et de m'avoir conseillée et supportée tout au long de ce projet. Sa constante confiance en moi et en mes capacités m'a été particulièrement profitable au cours de cette dernière année.

Je me dois de mentionner et d'honorer le support constant de la part de Qin Shi, pour toutes ces heures passées à mes côtés au Laboratoire de recherche en orthopédie de l'Hôpital-du-Sacré-Cœur-de-Montréal.

Je désire également souligner l'étendue de ce que je ressens pour Charles, par sa présence et son encouragement perpétuel.

Finalement, je suis essentiellement reconnaissante envers mes parents, qui me permettent de poursuivre mes études et mes ambitions dans les meilleures conditions qui soient.

# CHAPITRE 1 : INTRODUCTION

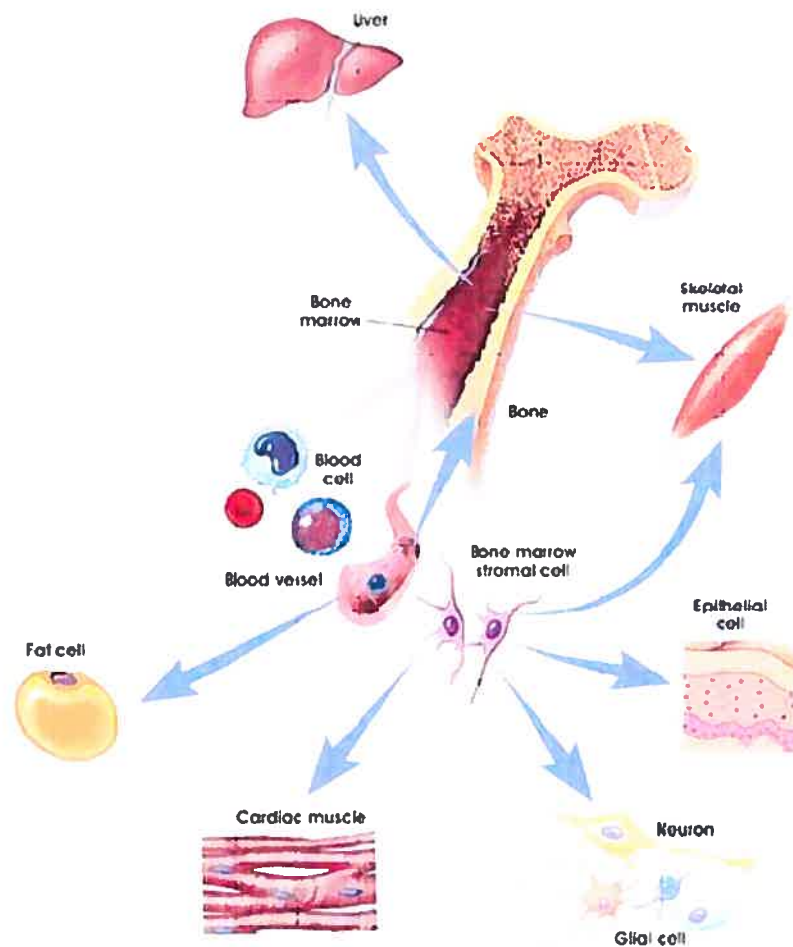
## 1.1. GÉNIE TISSULAIRE

Ce qui a longtemps été considéré comme étant des espoirs futurs de grande enlèvement et d'ampleur inégalée s'avère désormais être réalisable : remplacer les tissus endommagés suite à des lésions, blessures ou pathologies faisant appel à la vaste étendue d'expertises réunies sous l'appellation du génie tissulaire. Jusqu'à présent, les réactions de rejet suite aux chirurgies de greffes actuelles représentent le problème majeur lors de l'utilisation de tissus ou d'organes. Or, depuis la fin des années 80, les scientifiques du génie tissulaire se penchent sur la fabrication de tissus humains à partir de cellules du patient lui-même [Figure 1]. Alors qu'il est déjà possible de cultiver des tissus, il faudra encore beaucoup de temps avant de pouvoir reproduire des organes complexes<sup>1</sup>.

Cette science apporte une solution originale aux problèmes liés aux transplantations d'organes. Les besoins en greffons de toutes sortes devraient croître dans un proche avenir en raison du vieillissement de la population. Il s'agit d'un domaine de recherche extrêmement multidisciplinaire puisqu'il met en commun les connaissances de pointe dans des champs aussi variés que le génie biomédical, la biologie cellulaire, la biologie moléculaire, la génétique, l'immunologie, la



microbiologie et la médecine et la chirurgie. En fait, le génie tissulaire devrait permettre de transformer en réalité ce qui était jusqu'à présent une illusion, la possibilité pour les êtres humains de disposer de dispositifs de rechange adaptés pour leur corps, au travers de cellules autologues transformées génétiquement, ou de tissus et d'organes reconstruits *in vitro*.



**Figure 1 : Schéma représentatif de la vaste étendue du potentiel du génie tissulaire, où la régénération de tissus aussi variés que le corps en dispose s'avère maintenant réalisable et en pleine expansion<sup>2</sup>**

La révolution du génie tissulaire s'annonce prometteuse à ce début du XXI<sup>e</sup> siècle car elle ouvre un nouveau chapitre dans les approches biomédicales contribuant à la diminution des souffrances humaines. De nombreux espoirs ont été soulevés par le génie tissulaire, mais ne sauraient être jaugés avec justesse tant qu'une vision claire de ce domaine n'aura pas été présentée à la communauté scientifique et au grand public [Auger].

## **1.2. PERTINENCE ET IMPACT ÉCONOMIQUE AU NIVEAU DE LA SOCIÉTÉ NORD-AMÉRICAINNE**

Ainsi, aux États-Unis, on estime que huit millions d'opérations sont effectuées annuellement pour traiter des déficits d'organes ou tissulaires. En raison de ces actes chirurgicaux, les patients sont hospitalisés de 40 à 90 millions de jours par année. Les coûts de tels traitements ainsi que de la perte de productivité chez ces patients sont estimés à plus de 400 milliards de dollars par année. De plus, le nombre de transplantations s'avère être très limité aux États-Unis par la quantité restreinte de donneurs potentiels. Cet écart marqué entre patients et donneurs augmente chaque année, entraînant conséquemment un nombre croissant de patients décédant sur les listes d'attente. Il est à noter que le Canada représente environ 10% des chiffres précités<sup>3</sup>.

Les besoins de greffes de toutes sortes sont alarmants. Aux États-Unis seulement, 35 millions de patients avaient besoin d'une greffe en 2000, engendrant des coûts non négligeables s'élevant à plus de 335 milliards de dollars. Les complications majeures liées aux avec les greffes sont principalement dues au

d'approvisionnement, à l'infection et au phénomène de rejet de l'organisme. Alors qu'une manifestation de rejet de la part des xéno greffes – greffes entre espèces distinctes – s'avère être pratiquement inévitable, la solution à de tels obstacles pourrait se retrouver dans la régénération tissulaire<sup>4</sup>.

Ainsi, la régénération tissulaire comporte deux applications bien différentes : l'application *In Vitro* (création tridimensionnelle de tissus humains en laboratoire) et l'application *In Vivo* (greffes de tissus prélevés sur un autre être vivant) [Figure 2].

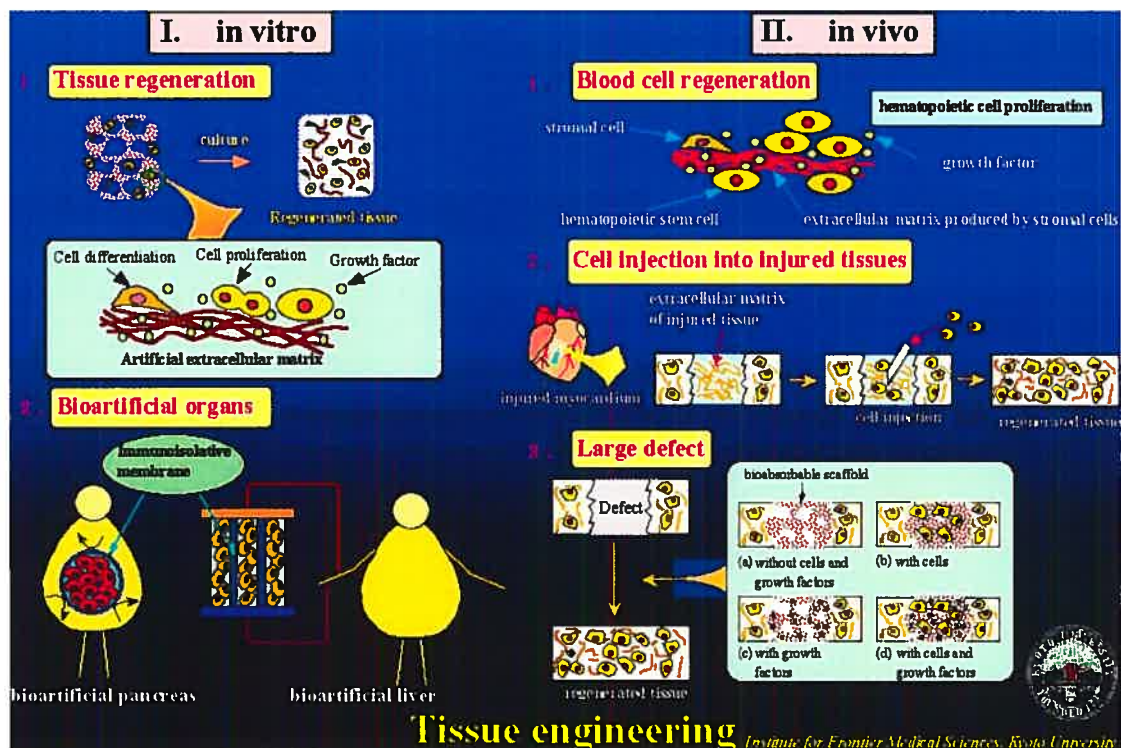


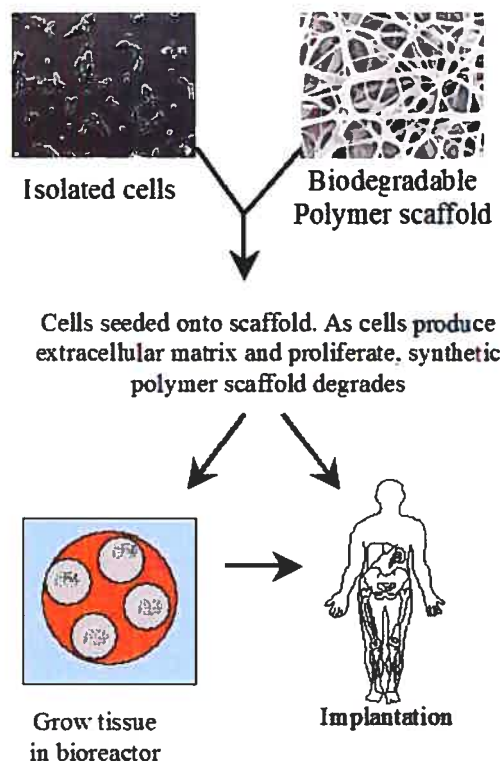
Figure 2 : Schéma définissant les deux grandes approches propres au génie tissulaire, soit la composante *In vitro* (I), ainsi que celle *In vivo* (II)<sup>5</sup>

La fabrication de tissus biologiques artificiels, tels que la peau, les vaisseaux, le cartilage, l'os, les tendons ainsi que le muscle cardiaque suscite de grands espoirs pour les prochaines décennies. La Biomedical Engineering Society prévoit un chiffre d'affaires annuel de l'ordre 80 milliards \$US pour la première décennie 2000<sup>6</sup>.

### 1.3. TENDANCES ET APPROCHES POUR LE REMPLACEMENT DE CARTILAGE ARTICULAIRE

Dans le domaine de la régénération tissulaire, pour chaque tissu existe un grand nombre de méthodes potentielles de remplacement, munies de nombreuses variantes. Il a ainsi été remarqué que la quantité de tissu fournie par les cultures *in vitro* est significativement plus importante pour des supports polymériques tridimensionnels ouverts que pour des cultures monocouches [Sherwood]. Un schéma représentant l'approche utilisée pour leur développement est présenté à la

**Figure 3.**

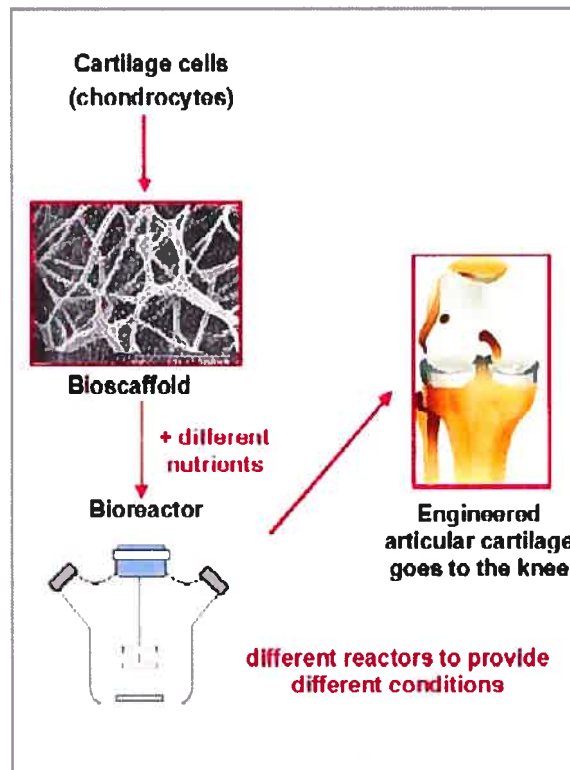


**Figure 3 : Approche récapitulative par génie tissulaire pour le développement de treillis tridimensionnels pour le remplacement de tissus lésé du corps humain<sup>7</sup>**

De plus, dans le cas du cartilage articulaire, les cellules de base (chondrocytes pour la section même du cartilage et ostéoblastes pour la portion de l'os sous-chondral) ont une différenciation sensible aux contraintes mécaniques. En effet, bien que les recherches en soient encore aux tâtonnements, il semblerait que la qualité mécanique du cartilage obtenu varie en fonction de l'intensité, de l'amplitude et de la fréquence de sollicitations mécaniques. Ces variations sont en fait toutes naturelles puisqu'une immobilisation prolongée (absence de sollicitations mécaniques d'intensité physiologique) fragilise le cartilage et l'os et s'accompagne d'une diminution de leur masse. Une raison pouvant expliquer cet aspect pourrait être que les déformations induites modifient des organelles qui interviennent dans le processus de reproduction (appareil de Golgi) et en conséquence leur activité mitotique. Une autre possibilité serait que les sollicitations mécaniques induisent le transport du fluide électrolytique synovial riche en facteurs de croissance. Au contraire, l'absence de sollicitations mécaniques diminuerait l'intensité de ce transport et priverait donc les chondrocytes et ostéoblastes de facteurs de croissance. Le cartilage est constitué d'un milieu poreux hautement déformable, sujet à gonflement car contenant des charges négatives fixes, imbibé par un fluide électrolytique qui transporte également des macromolécules: il représente en soi un vrai défi<sup>8</sup> !

Le problème de cultures *in vitro* comporte donc de multiples facettes: génétique dans le choix des cellules initiales (cellules mésenchymales ou différenciées), biochimique (choix du support polymérique, composition du milieu, contrôle en oxygène), et mécaniques (amplitude et fréquence des sollicitations mécaniques, transport des divers composants). À quoi s'ajoutent des considérations

pratiques telles que l'optimisation de la taille et de la forme des pièces obtenues: la taille et la forme doivent en effet permettre la circulation du milieu physiologique en tout point lors de la croissance: deux défis supplémentaires pour la modélisation et la simulation numérique puisqu'il s'agit d'un problème avec contraintes résiduelles et à frontières libres. La possibilité d'utilisation de bioréacteurs capables de contrôler l'état mécanique des contraintes et déformations des cultures s'avère être une option intéressante à considérer [Figure 4]. Ainsi, une fois qu'un cartilage reproduisant les caractéristiques souhaitées a été développé, encore faut-il le substituer au tissu endommagé et assurer une bonne adhésion avec le milieu biologique sain<sup>9</sup>.



**Figure 4 : Approche pour le développement de treillis faisant appel à un bioréacteur afin de stimuler et de contrôler les caractéristiques du treillis<sup>10</sup>**

Ainsi, la section suivante [**Chapitre 2**] de ce mémoire présente les concepts ainsi que la théorie nécessaires à la compréhension, l'élaboration et la production de ce projet portant sur la caractérisation et l'évaluation *in vitro* de la section osseuse de treillis tridimensionnels polymériques ostéochondraux pour le remplacement du cartilage articulaire.

Le **Chapitre 3** expose le protocole expérimental utilisé pour évaluer *in vitro* les composantes biochimiques, biomécaniques et histologiques des treillis polymériques tridimensionnels (3D).

L'article scientifique est ensuite présenté à titre de **Chapitre 4**. Ma contribution aux travaux de recherche menant à la rédaction de l'article s'est avérée prépondérante : j'ai été la personne-ressource au laboratoire de recherche en orthopédie de l'Hôpital-du-Sacré-Cœur-de-Montréal à des fins d'interaction avec les partenaires du projet établis à l'Institut de Matériaux Industriels / Conseil National de Recherche du Canada. Mon rôle a été d'assurer le développement rapide de treillis tridimensionnels polymériques, la planification et l'analyse de leurs essais mécaniques ainsi que le suivi de la simulation avec les co-auteurs de l'IMI/CNRC. De plus, l'ensemble des préparations et tests effectués en milieu de culture au laboratoire de recherche en orthopédie de l'HSCM a relevé de mes fonctions. Ma contribution s'étale aussi sur le suivi d'études *in vitro* en cultures cellulaires ostéoblastiques, l'analyse de la cytotoxicité par le test MTT, de décompte de protéines et d'examen histologiques par microscopie optique.

J'ai été tenu responsable de l'étendue de la rédaction de l'article scientifique, toutes composantes réunies. J'ai participé de façon active aux travaux expérimentaux, tant au niveau biologique qu'en évaluation biomécanique. J'ai mis sur pied les protocoles expérimentaux et assuré leurs implantations de façon appropriée. J'ai ainsi eu un rôle de premier plan dans ces travaux et l'article scientifique présenté dans le cadre de ce mémoire reflète cette réalité.

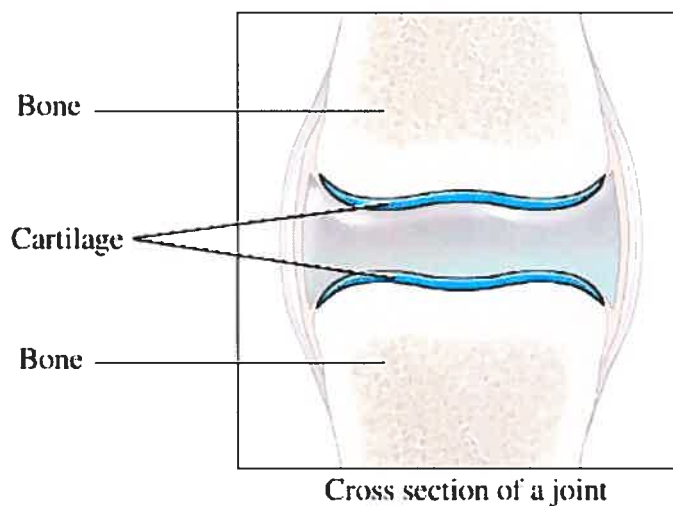
Suite à ce chapitre comportant l'article, une section est dédiée à la synthèse substantielle des résultats obtenus lors de l'ensemble des tests et analyses expérimentales [**Chapitre 5**].

Finalement, à titre de **Chapitre 6**, une discussion générale des résultats relève les points majeurs et éléments-clés ciblés, une conclusion récapitulative est dévoilée, accompagnée de perspectives à considérer quant aux aspirations futures du projet présenté dans ce mémoire.



## CHAPITRE 2 : RECENSION DE LA LITTÉRATURE (ÉTAT DES CONNAISSANCES)

### 2.1. LE CARTILAGE



**Figure 5: Cartilage situé au niveau d'un joint<sup>11</sup>**

Un fait unique par rapport à tous les autres tissus de l'organisme, le tissu cartilagineux [Figure 5] est totalement dépourvu de vaisseaux sanguins et lymphatiques ainsi que de nerfs. La plupart des cartilages sont nourris par diffusion à travers la matrice, à partir des capillaires de la couche interne du *périchondre*. Tous les cartilages de l'organisme adulte, à l'**exception des cartilages articulaires**, sont recouverts de périchondre, tissu conjonctif formé de fibroblastes et d'un réseau dense de fibres de collagène. Contrairement au cartilage, le périchondre est un tissu vascularisé qui joue un rôle dans la nutrition, la croissance et la réparation du cartilage. Les cellules mésenchymateuses de la couche interne du périchondre

peuvent se transformer en chondrocytes qui produisent la matrice. Cette *croissance appositionnelle* (ou péri-chondrale) s'oppose à la *croissance interstitielle* (rare chez l'adulte) qui se fait par mitoses des chondrocytes. Si les mitoses se font suivant une seule direction, on aboutit à un groupe de chondrocytes disposés en ligne (groupe isogénique axial) ; si les mitoses se succèdent dans des directions diverses, on aboutit à un groupe de chondrocytes disposés circulairement (groupe isogénique coronaire)<sup>12</sup>. Ce projet vise spécifiquement la création de dispositif servant à remplacer la **section osseuse d'une unité ostéochondrale pour le remplacement du cartilage articulaire**, ainsi l'attention sera désormais accordée plus précisément à ce type de tissus cartilagineux.

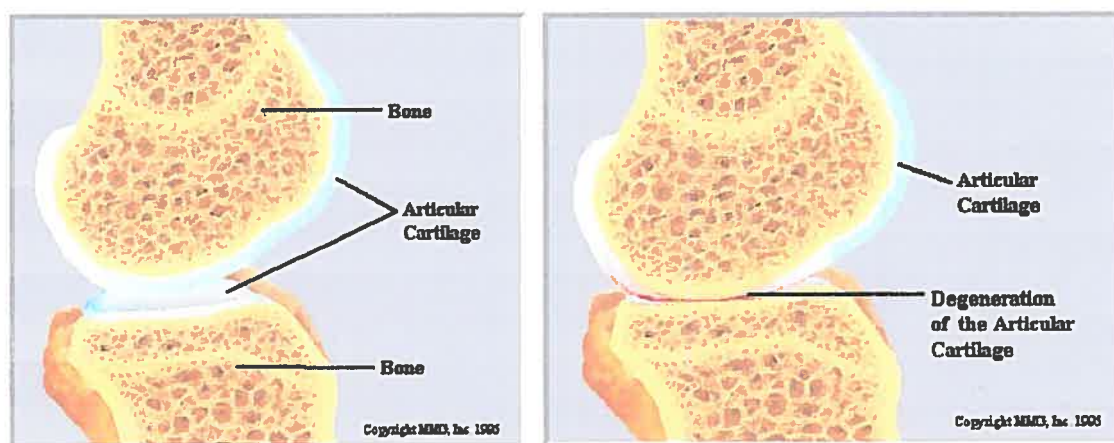
## 2.2. LES CARTILAGES DU SYSTÈME OSTÉO-ARTICULAIRE

Ainsi, sous la dénomination apparemment uniforme de « cartilage », on distingue des cartilages très différents sur le plan topographique, moléculaire et fonctionnel. Ceux-ci se définissent et se spécifient selon la nomenclature présentée ci-dessous :

- Des cartilages *hyalins* font partie des pièces osseuses :
  - modèles cartilagineux des ébauches osseuses du squelette foetal
  - cartilages de conjugaison
  - cartilages articulaires
  - cartilages costaux (niveau d'insertion des côtes sur le sternum)
- Des cartilages *fibreux* sont situés au voisinage de pièces osseuses :
  - disques intervertébraux
  - symphyse pubienne
  - ménisques du genou
  - insertion du tendon d'Achille

Il est à souligner que les cartilages articulaires présentent un intérêt médical particulièrement prépondérant, considérant l'immense étendue des diverses pathologies, lésions et blessures y étant reliées.

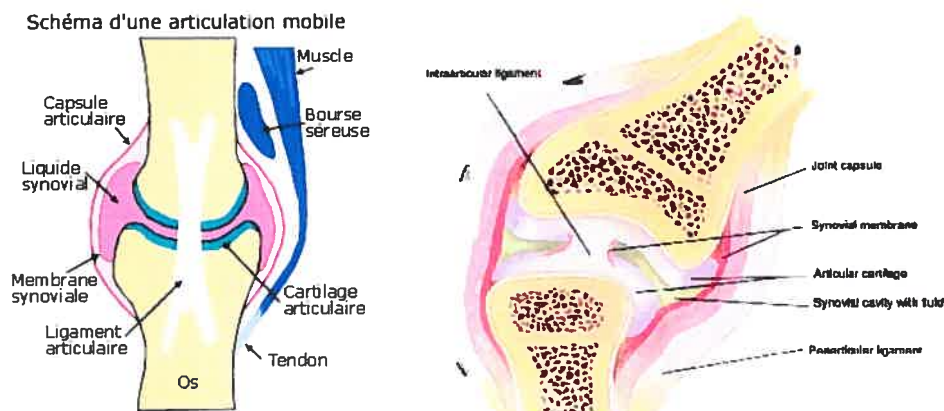
En fait, les lésions des **cartilages articulaires** sont fréquentes, responsables premières des arthroses, notamment de la hanche (coxarthrose) ou du genou (gonarthrose) [Figure 6].



**Figure 6 : Schéma représentatif de l'inflammation caractéristique des pathologies d'ordre arthritique, où le cartilage articulaire situé au niveau des joints se dégrade jusqu'au point de dégradation<sup>13</sup>**

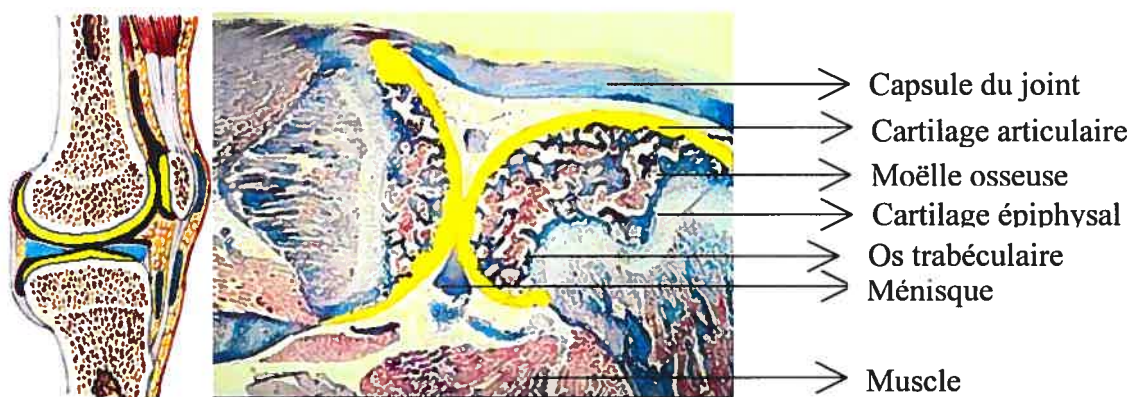
L'absence de périchondre à leur niveau fait qu'en cas d'usure de ce cartilage, les chondrocytes, dont les capacités de division sont faibles chez l'adulte, ne peuvent être remplacés et la réparation du cartilage est impossible. Une intervention s'avère donc être nécessaire pour remédier à la condition, faisant appel au développement de structures artificielles à caractère biomimétique.<sup>12</sup>

## 2.3. LE CARTILAGE ARTICULAIRE



**Figure 7 : Schéma représentant la présence du cartilage articulaire au niveau d'une articulation mobile<sup>14</sup>**

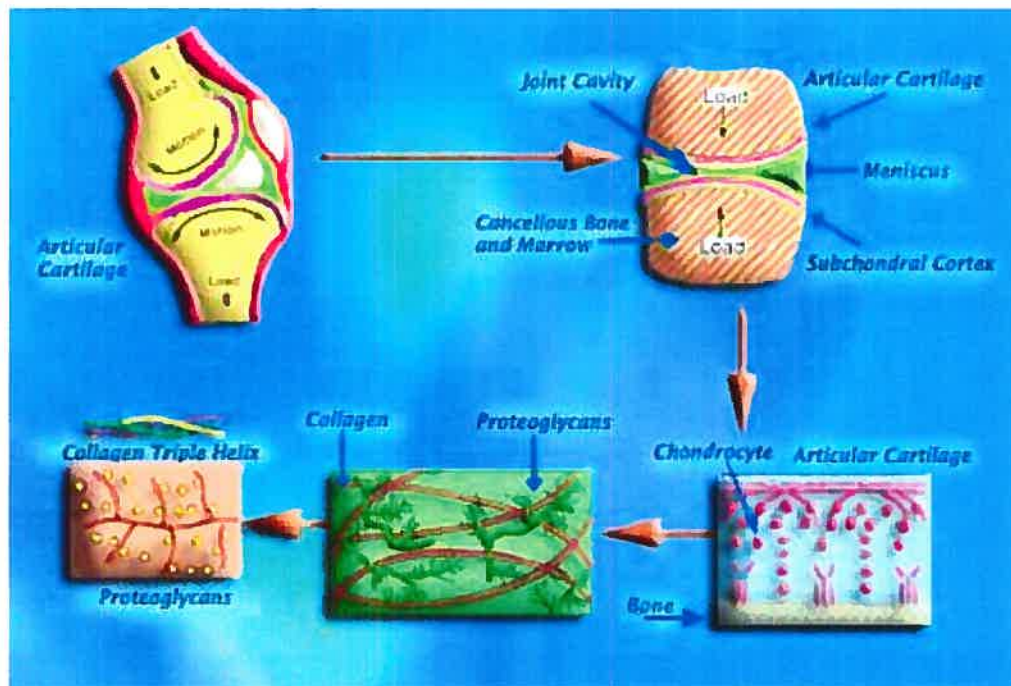
Les cartilages articulaires sont localisés au niveau des articulations mobiles [Figure 7]. La face articulaire forme l'interface entre les deux pièces osseuses. Ainsi, les cartilages articulaires assurent le jeu et la mobilité de l'articulation. Latéralement, l'articulation est limitée par le tissu synovial. La face opposée à l'articulation (ou face abarticulaire) est enchâssée dans l'os avec une calcification de la matrice extracellulaire cartilagineuse située à l'interface osseuse [Figure 8].



**Figure 8 : Schéma et coupe histologique (droite) représentant le cartilage articulaire (en jaune) ainsi que les différentes composantes environnantes<sup>15</sup>**

La disposition des chondrocytes dans ce type de cartilage est particulière. Les cellules superficielles (au voisinage de l'articulation) sont aplaties et parallèles à la surface articulaire ; les cellules profondes sont plus arrondies et prennent une disposition en colonnes perpendiculaires à la surface articulaire.

Les cartilages articulaires empêchent, avec le liquide synovial, le frottement des surfaces osseuses. Le cartilage articulaire doit être rigide mais aussi déformable pour assurer une répartition harmonieuse des pressions qui s'exercent sur l'articulation. La disposition des fibres de collagène II en arcades ou ogives contribue grandement à cette répartition. La **Figure 9** résume la composition et l'organisation morphologique du cartilage articulaire.

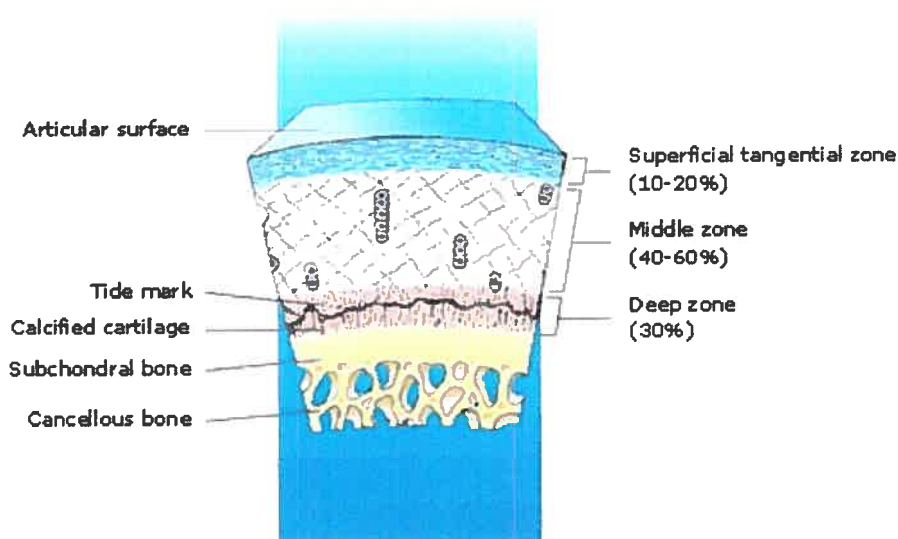


**Figure 9 : : Schéma récapitulatif de la composition du cartilage articulaire, indiquant les cellules cartilagineuses (chondrocytes) comprises à l'intérieur d'une structure tri-dimensionnelle organisée, composée de fibres de collagène et de volumineuses molécules nommées protéoglycans<sup>16</sup>.**

Dépourvus de périchondre, les cartilages articulaires se nourrissent essentiellement à partir du liquide synovial, et, pour une part, grâce à des échanges avec l'os sous-chondral. C'est en partie pour cette raison que **l'os sous-chondral s'avère être un élément prédominant dans la réparation du cartilage articulaire.** De plus, l'absence de cellules souches au site même du cartilage articulaire s'avère être une composante contribuant aux difficultés de rétablissement des structures cartilagineuses lésées. Ainsi, une structure de remplacement combinant les composantes osseuse et cartilagineuse serait l'approche de choix à entreprendre pour le succès de la réparation du cartilage articulaire lésé ou pathologique.



## 2.4. L'OS SOUS-CHONDRAL



**Figure 10 : Schéma représentatif du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral<sup>17</sup>**

La dégénérescence du cartilage articulaire n'est pas uniquement le résultat du vieillissement mais aussi des efforts, des charges ; les torsions peuvent augmenter le risque de dégénérescence sans négliger les instabilités articulaires ou musculaires qui provoquent des lésions articulaires dégénératives [Buckwalter 1998].

Le rôle de l'os sous-chondral dans la pathogenèse des lésions cartilagineuses est encore sous-estimé. L'os est non seulement un amortisseur important, mais participe également au métabolisme du cartilage : La région sous-chondrale est richement vascularisée et ainsi "vulnérable". Ses vaisseaux terminaux ont un contact direct avec la couche profonde du cartilage [Figure 10]. La perfusion de ces vaisseaux est essentielle et répond aux exigences nutritionnelles du cartilage, assurant plus de 50% de l'apport en glucose et en oxygène. La structure osseuse, le

métabolisme local, l'hémodynamique, et la vascularisation de la région sous-chondrale diffèrent à même l'articulation et d'une articulation à une autre. Les surcharges chroniques, répétitives, ainsi que les anomalies de la perfusion peuvent affecter une articulation, tandis que dans une autre articulation, ces mêmes conditions peuvent conduire à l'ostéo-nécrose ou à une ostéochondrite disséquante [Imhof 2000].

Il existe une certaine évidence que l'os sous-chondral joue un rôle dans les changements secondaires du cartilage articulaire. Les modifications incluent la redistribution de flux sanguin, résultat d'une hypertension de la moëlle, oedème et micro-nécroses. Ces résultats sont similaires à ceux observés dans la nécrose avasculaire d'os et soulève la question d'une étiologie vasculaire [Imhof 1997]. Il semble que le cartilage articulaire et la région sous-chondrale forment une unité fonctionnelle, dans laquelle les canaux liant l'os sous-chondral à la région profonde du cartilage peuvent expliquer le fonctionnement de cette unité [Imhof 1997]. Une étude a par ailleurs démontré que la dégénérescence du ménisque était corrélée statistiquement à la destruction de l'os sous-chondral dans la majorité des cas étudiés [Lewandrowski].

Les réactions pathologiques commencent par l'oedème de la moëlle, puis apparaît une nécrose suivie des fissures du cartilage et de l'os [Imhof 2000]. De plus, la surcharge répétitive sur la région sous-chondrale (incluant des vaisseaux) empêche l'approvisionnement du flux nutritif au cartilage. La maladie dégénérative articulaire s'accompagne fréquemment d'une réaction sous-chondrale améliorant la vascularisation, et augmentant le métabolisme avec la naissance d'un tissu fibreux



banal cicatriciel, mais bien vascularisé, sans comparaison avec la complexité ou avec la structure cartilagineuse. En vieillissant, la vascularisation diminue et le métabolisme ralentit en accordance. L'imagerie par résonance magnétique [IRM] permet de visualiser ces anomalies de la région sous-chondrale, confirmant les similarités fondamentales entre l'arthrose dégénérative, l'ostéochondrite disséquante, et la nécrose ischémique avasculaire de l'os. Ces entités différentes peuvent avoir une étiologie fondamentale principale avec plusieurs degrés de sévérité [Imnof 1999].

Les altérations cartilagineuses secondaires à une atteinte de la région sous-chondrale sont fonctionnelles au début, affectant la tension et la compressibilité du cartilage avec une tendance à l'hypertrophie. Les altérations de structure (composition et métabolisme) se résument dans les altérations du réseau de collagène et de protéoglycanes [Setton]. Il s'avère difficile de déterminer si la rupture initiale de la surface cartilagineuse est un résultat direct de forces mécaniques ou le résultat d'une lésion liée aux cellules chondrocytaires et au réseau collagénique [Setton].

La réponse de cartilage articulaire à l'agression aiguë (traumatisme) ou chronique (dégénérescence) est souvent une réparation imparfaite; les propriétés mécaniques et biochimiques du nouveau tissu diffèrent largement du cartilage d'origine, entraînant un déficit fonctionnel considérable [Frenkel].

Actuellement, les chirurgiens débrident l'articulation et pénètrent l'os sous-chondral en exécutent les ostéotomies, avec l'intention de diminuer les symptômes et de restaurer ou maintenir une surface articulaire fonctionnelle. Les résultats de ces

procédures s'avèrent être particulièrement imprévisibles, variant considérablement chez les différents types de patients [Buckwalter 1998].

Il est important de mentionner que les chondrocytes sont capables de migrer vers le site endommagé, sans toutefois pouvoir proliférer ou produire les macromolécules nécessaires à la synthèse d'une matrice normale. Le tissu de réparation devient alors un tissu similaire, mais légèrement distinct, au tissu hyalin [Frenkel].

Les études expérimentales montrent que la transplantation de chondrocytes, de cellules mésenchymateuses et l'emploi de greffes périostales ou péri-chondriales ont le potentiel de stimuler la formation d'une nouvelle surface articulaire [Buckwalter 1998]. Cette surface est toutefois qualifiée d'une qualité inférieure au fibrocartilage et s'avère être inapte à résister à long terme. Les nombreuses approches chirurgicales qui impliquent la pénétration de l'os sous-chondral offrent un soulagement à court terme, alors que d'autres approches ont donné une amélioration significative par la transplantation du tissu ostéochondral et périostal et par l'implantation de chondrocytes [Chen]. De plus, l'intégration de l'os sous-chondral dans un dispositif de remplacement de cartilage articulaire accorde le potentiel d'utilisation de cellules souches, aspect qui s'avère particulièrement pertinent considérant l'absence *in situ* de cellules souches au niveau du cartilage articulaire. Malgré ces procédures, les lésions articulaires demeurent encore de nos jours un grand problème médical [Buckwalter 1999, Ghivizzani].

## 2.5. DÉGÉNÉRESCENCE DU CARTILAGE ARTICULAIRE

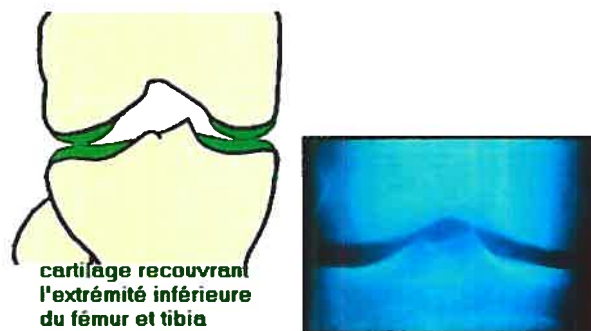


Figure 11 : Schéma et radiographie à rayons-X d'un genou normal<sup>18</sup>

Le cartilage articulaire d'un genou normal non pathologique est représenté à la [Figure 11]. L'espace entre fémur en haut et tibia représente l'épaisseur du cartilage articulaire. L'usure du cartilage articulaire est clairement décelée sur des films obtenus par radiographie à rayons-X par la diminution de l'espace contenu entre les deux têtes osseuses d'os adjacents [Figure 12]. Le fémur et le tibia sont en contact presque direct dans le cas du pincement complet, représentant la dégénérescence du cartilage articulaire.

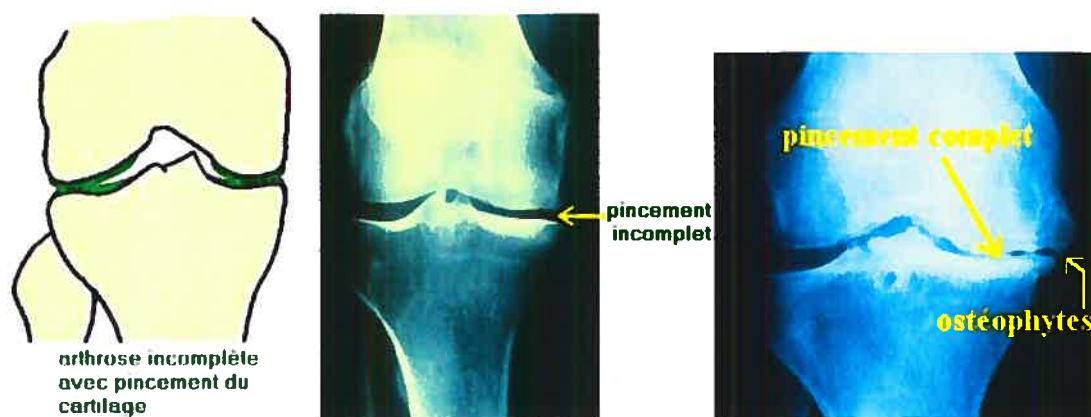


Figure 12 : Schéma (gauche) et radiographies d'un genou avec pincement incomplet (milieu) et complet (droite) du cartilage articulaire<sup>19</sup>.

En général, une perte extensive de cartilage articulaire est accompagnée d'altération substantielle au cartilage méniscal. Lorsque l'usure du cartilage est prépondérante, les films par rayons X montrent que les os sont désormais en contact direct. Les **Figures 12** et **13** montrent que la perte de cartilage articulaire élève considérablement la quantité de contraintes appliquées aux extrémités osseuses, résultant en la formation de saillies osseuses, ou ostéophytes, développées aux marges des joints. Les plans frontal et de côté d'un genou arthritique sont représentés à la **Figure 13**.



**Figure 13 : Radiographies de genou arthritique montrant la perte d'espace entre les têtes osseuses fémorale et tibiale. Plan frontal (gauche) et de côté (droite)<sup>20</sup>.**

*sagittal gauche ?*

Dans le plan frontal, on note l'absence d'espace entre les os, tel qu'indiqué par les flèches. Cette perte d'espace au niveau du joint se produit suite à l'usure extensive du cartilage articulaire. L'os réagit à cette perte de cartilage en générant des saillies osseuses (ostéophytes). Ces saillies osseuses sont détectées sur le plan de côté, tel qu'indiqué par les flèches.

L'étiologie de la maladie dégénérative articulaire est multiple, mais les causes mécaniques sont les plus retrouvées dans les dossiers cliniques [Imhof 1997]. La dégénérescence du cartilage articulaire est une cause fréquente de douleur et d'invalidité chez de nombreux individus, notamment les personnes âgées. Le cartilage articulaire est une structure complexe qui possède une capacité limitée pour la réalisation d'une réparation acceptable [Ghivizzani]. Lorsqu'un traumatisme cartilagineux s'étend jusqu'à l'os sous-chondral, il se produit dans le foyer lésionnel une migration de cellules issues de la moëlle osseuse accompagnée d'une réaction inflammatoire favorisant ainsi la formation d'un tissu cartilagineux similaire, par sa constitution, au fibrocartilage (*fibro-cartilage-like*) [Imhof 1997].

#### **UNE OSTÉOSCLÉROSE SOUS-CHONDRALE**

Parallèlement aux lésions cartilagineuses, on observe une sclérose de l'os sous-chondral avec épaissement des extrémités osseuses ainsi qu'une formation marginale d'excroissances ou ostéophytes appelées éperons (phénomène d'ostéophytose); les célèbres "becs de perroquet". L'ostéosclérose sous-chondrale résulte d'un excès de pression régnant dans la zone d'appui du fait de la disparition de l'amortisseur cartilagineux.

## 2.6. LA RÉPONSE BIOMÉCANIQUE DU CARTILAGE

En ce qui a trait à la biomécanique des tissus mous, la réponse mécanique du cartilage mis sous tension est directement modulée selon la théorie biphasique. En fait, deux (2) phases majeures sont recensées dans le cartilage articulaire, soit :

1. Une première phase fluide, comprenant l'eau et les électrolytes; et
2. Une deuxième phase solide, composée de collagène, protéoglycanes, glycoprotéines et de chondrocytes.

La capacité de distribution de charge provient ainsi d'une combinaison des phases fluide et solide, mais la charge est aussi dissipée dû à l'écoulement des fluides par rapport à la matrice solide. Les équations présentées ci-dessous représentent les bases de la théorie biphasique.

$$\frac{\partial \sigma_{ij}^s}{\partial x_j} + K(u^s - u^f) = 0 \quad (1)$$

$$\frac{\partial \sigma_{ij}^f}{\partial x_j} + K(u^f - u^s) = 0 \quad (2)$$

où  $\sigma_{ij}^s$  et  $\sigma_{ij}^f$  représentent les contraintes solides et fluide,  $u_s$  et  $u_f$  correspondent aux vitesses solide et fluide,  $\chi_j$  symbolise la notation mathématique de la forme concise des axes x, y et z, alors que K représente le coefficient de traînée relatif au module de Young à l'équilibre, à la perméabilité, et au niveau de porosité du treillis tridimensionnel [Yousefi].

Dans le cadre de ce projet, cette théorie a été utilisée afin de créer des treillis tridimensionnels détenant des réponses mécaniques similaires à celles exprimées par le cartilage articulaire.

## **2.7. OBJECTIFS ET HYPOTHÈSES :**

La lecture de la documentation scientifique relève la présence de nombreuses approches pour le développement de treillis 3D polymériques pour le remplacement du cartilage articulaire. Plusieurs techniques et méthodes ont été révisées et évaluées avant d'entreprendre cette investigation et d'élaborer le protocole expérimental.

L'objectif général de cette étude est d'établir un protocole de régénération du tissu ostéochondral basé sur la caractérisation biochimique, biomécanique et histologique de la composante osseuse de treillis tridimensionnels polymériques par génie tissulaire.

L'hypothèse de travail de ce projet consiste à cibler les paramètres et caractéristiques des treillis tridimensionnels aptes à reproduire le procédé de croissance cellulaire exprimé par l'os sous-chondral pour développer un tissu similaire à la partie osseuse du tissu articulaire ostéochondral.

L'investigation a été conduite selon les hypothèses secondaires suivantes :

1. L'utilisation de polymères biorésorbables pour la section osseuse de treillis ostéochondraux, combiné à la méthode de fabrication par bioplotter 3D permettrait le développement de treillis optimisés et reproductibles.
2. Un outil numérique faciliterait la conception de treillis hybrides pour le génie tissulaire du cartilage et de l'os, et simulerait les performances biomécaniques des structures treillis/tissus.
3. Les structures tridimensionnelles polymériques de PCL et de PLA permettraient une colonisation cellulaire adéquate à l'intérieur de la microstructure des treillis;
4. Les échantillons favoriseraient une viabilité cellulaire optimale croissante en fonction de la durée d'incubation en milieu de culture, et une production de protéines totales augmentant en parallèle.



## **CHAPITRE 3 : MÉTHODOLOGIE**

Le protocole expérimental ainsi que les procédures employées concordent avec les recommandations énoncées par le Centre de Recherche de l'Hôpital-du-Sacré-Cœur de Montréal (CRHSCM) et celles établies par l'Institut des matériaux industriels (IMI) / Conseil National de Recherche du Canada (CNRC).

### **3.1. MATÉRIEL**

Les polymères poly-lactide (PLA) et poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) ont été obtenus des sources commerciales Biomer Ltd et Dow Tone, respectivement. Ces polymères ont été synthétisés afin de rencontrer leurs exigences particulières en terme de poids moléculaire et de potentiel de dégradation. Le design moléculaire amélioré des polymères dégradables devrait être en mesure de générer des matériaux s'avérant être plus homogène et détenant la capacité de produire des résultats plus reproductibles.

### **3.2. FABRICATION DES TREILLIS**

#### **3.2.1. TECHNIQUE PAR [POROGEN-LEACHING] POUR LES TREILLIS EN PCL**

Des treillis poreux munis d'interconnexions ont été fabriqués à l'aide de granules de poly ( $\epsilon$ -caprolactone) [PCL] utilisant une combinaison de mélange co-

continu de deux polymères biocompatibles (PCL et oxyde de polyéthylène, PEO) et de lixiviation par particules de sels, tel que précédemment décrit [Reignier]. La composition de polymère / sel utilisée dans cette étude détenait un ratio de composition PCL/PEO maintenu à 50/50 afin d'assurer une morphologie co-continue des composantes polymériques, ainsi qu'une concentration en NaCl de 70% vol. [Reignier].

### Mesure de Porosité

La porosité, ou fraction volumique du vide  $V_f$  (%), des treillis de PCL a été calculée selon l'équation suivante :

$$V_f = \left(1 - \frac{\rho^*}{\rho_s}\right) \times 100 \quad (3)$$

où  $\rho^*$  correspond à la densité apparente du treillis polymérique poreux telle que déterminée en mesurant la hauteur, le diamètre et le poids des échantillons, et où  $\rho_s$  représente la densité du matériel non poreux [Tableau 1].

**Tableau 1 : Mesures de Densité et de Porosité (PCL)**

PCL/PEO/NaCl (%vol.)	Structure poreuse de PCL	
	Densité (g/cm)	Porosité (%)
20/20/60	0.242±0.004	78.84±0.37

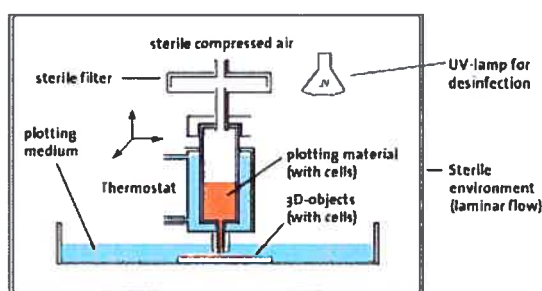
### Mesure des Propriétés Mécaniques

Des analyses en compression ont été conduites sur les échantillons cylindriques de dimensions moyennes de 6mm de diamètre et 3.7mm d'épaisseur,

utilisant un analyseur mécanique dynamique (Perkin Elmer, modèle DMTA V), dans une configuration de plateaux parallèles, et à un taux de déformation de  $0.005 \text{ s}^{-1}$ . Ces échantillons ont été perforés à même les feuillets poreux de PCL préparés par moulage de compression à  $150^\circ\text{C}$ .

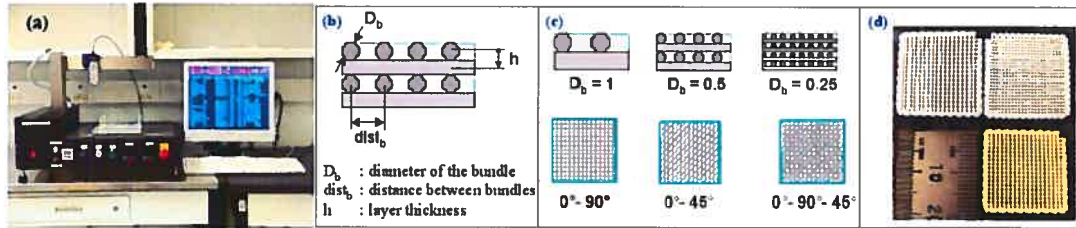
### 3.2.2. TECHNIQUE PAR BIOPLOTTER EN 3-DIMENSIONS POUR LES TREILLIS EN PLA

La technique de bioplotter en trois dimensions (3D) a été utilisée pour élaborer le modèle de conception ainsi que pour fabriquer les treillis en poly-lactide. Cette technique a été utilisée, avec succès, dans la littérature pour développer des treillis détenant la capacité de stimuler une croissance tissulaire optimale [Woodfield], et est basée sur un principe de dispersion de matériau à l'intérieur d'un milieu de traçage [Figure 14].



**Figure 14 : Schéma démontrant le procédé de fabrication par Bioplotter 3D<sup>21</sup>**

Un logiciel de conception assistée par ordinateur, spécifiant la géométrie des treillis, a également été employé à titre d'entrée de données à des fins de production du modèle physique par l'appareil [Figure 15].



**Figure 15: (a) Bioplotter 3D utilisé pour la fabrication des treillis de PLA; (b) & (c) patrons utilisés avec le bioplotter 3D; (d) échantillons de treillis<sup>22</sup>.**

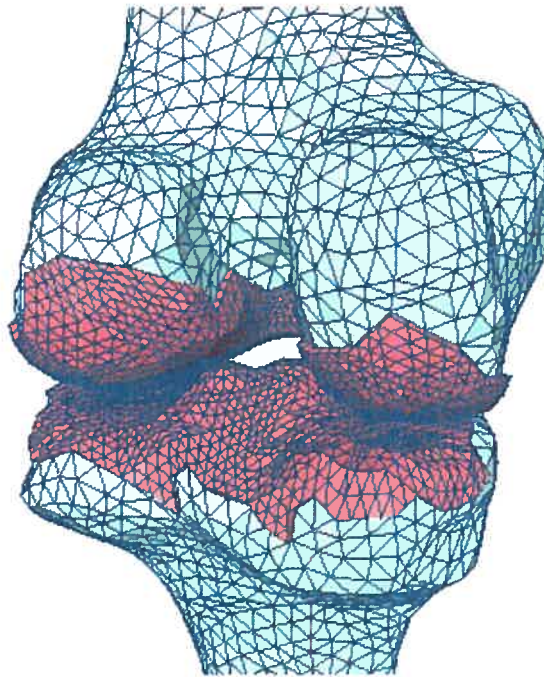
Afin de faciliter l'attachement cellulaire, la prolifération, ainsi que la déposition de la matrice extracellulaire (MEC), une porosité de 70%, est utilisée pour la conception des treillis de PLA [Tableau 2].

**Tableau 2 : Mesures de Densité et de Porosité (PLA)**

PLA (% vol.)	Structure poreuse de PLA	
	Densité (g/cm)	Porosité (%)
-100-	1.25±0.02	70.00±4.00

La flexibilité du bioplotter 3D par rapport aux paramètres de conceptions alternatifs permet d'analyser l'effet de l'architecture des pores sur la performance mécanique des treillis (module d'équilibre et perméabilité). Des courbes expérimentales associant l'architecture des treillis à leurs performances mécaniques ont été créées. Ces informations ont ensuite été utilisées comme entrées de données pour optimiser l'architecture des treillis par l'emploi d'outils numériques.

### 3.3. CONCEPTION DES TREILLIS ET SIMULATION DE LA RÉPONSE BIOMÉCANIQUE



**Figure 16 : Modélisation numérique du cartilage articulaire<sup>23</sup>**

Un outil de modélisation, basé sur la théorie biphasique, est utilisé pour prédire la distribution des champs de contraintes aux travers des structures polymère-tissu en fonction du temps. Mow *et al.* [Mow 1980, Mow 1997] ont développé cette théorie afin de décrire les caractéristiques de support de charge du cartilage, prenant en considération ses deux composantes; fluide et solide. Les équations d'équilibre des contraintes normalisées ont été modifiées tel que présenté aux équations (1) et (2).

Un logiciel 3D pour les hautes déformations et intégrant le modèle biphasique, mieux adapté pour l'analyse biomécanique des tissus biologiques, a été développé par

l'Institut de Matériaux Industriels / Conseil National de Recherche du Canada [Yousefi]. Cet outil numérique a été utilisé afin de simuler la réponse biomécanique des treillis tridimensionnels durant leur évolution structurelle après culture *in vitro*. Ce modèle a également permis d'élaborer la conception de treillis tridimensionnels munis de propriétés mécaniques désirées en ajustant les variables de conception (niveau de porosité, taille de pores, et matériau utilisé pour la formation des treillis).

Le modèle biphasique a été utilisé par itérations d'optimisation afin de faire correspondre la réponse biomécanique d'un treillis tridimensionnel soumis à une charge compressive à celle d'un cartilage natif et de l'os sous-chondral. Cette procédure a mené à un lot de perméabilité et de modules à l'équilibre optimaux pour les structures polymériques. Ces propriétés optimales ont été reliées à la taille de pore et au niveau de porosité des treillis, adaptées selon les procédures expérimentales. Une fois les architectures optimales des treillis évaluées par technique de prototypage rapide, ces topologies ont été utilisées avec une technique conventionnelle plus compatible avec la production de masse et au développement de structures à haute porosité : la méthode d'extraction par lixivation de porogène dans la présente investigation.

### **3.4. ÉVALUATION BIOLOGIQUE**

20 échantillons expérimentaux de PCL et 75 structures polymériques de PLA ont été divisés en 3 blocs de temps (24h, 1- et 2-semaines). Les treillis de PLA ont également été testés à des temps d'incubation additionnels plus élevés (4- et 8-semaines). Les analyses ont été conduites en duplicata (n=2) ou triplicata (n=3) pour chaque groupe et pour chaque type d'observations faites à chacun des blocs de temps, tel que défini dans chacune des sous-sections ci-dessous.

#### **3.4.1. ÉTUDE IN VITRO**

La lignée cellulaire ostéoblastique humaine MG-63 a été obtenue de ATCC (CRL-1427). Les cellules ont été maintenues dans des flacons de culture de 75 cm<sup>2</sup> auxquels un milieu de culture complet constitué de Dulbecco's Modified Eagle's Medium [DMEM] / HAM nutriment mixture F-12 avec L-glutamine et 15 mM HEPES (Sigma, St-Louis, MO, USA, D2906) a été ajouté. Le milieu a préalablement été enrichi par une concentration de 10% de sérum de veau foetal désactivé par la chaleur (Invitrogen Life Technologies, Burlington, Canada) et de 1% d'antibiotique pénicilline-streptomycine (). Les cellules ont été passées tous les 2-3 jours. Après 3 passages (14 jours), les cellules se sont développées jusqu'à confluence.

Les treillis polymériques ont d'abord été individuellement pesés et stérilisés en introduisant les échantillons dans deux bains successifs d'éthanol pour une durée

de temps de 30 min. Les treillis ont ensuite été transférés dans des récipients stériles de 250ml munis de couvercles dévissables, immergés dans le milieu de culture, et incubés pour la nuit à 37°C préalablement à l'ensemencement cellulaire. Les treillis ont subséquemment et individuellement été déposés dans des puits distinctifs de plaques de 12 puits.

L'ensemencement des treillis polymériques a suivi : la meilleure méthode d'ensemencement cellulaire a été déterminée comme étant une approche d'ensemencement par dépôt à la surface supérieure (« top seeding approach ») [Sherwood]. 1ml de suspensions cellulaire a été pipeté sur la surface des treillis polymériques, générant directement une concentration de  $5.0 \times 10^5$  cells / 1ml. 1ml de milieu DMEM / F-12 / FBS 10% a été ajouté à chacun des puits. Les échantillons ont été incubés à 37°C dans une atmosphère humide constante de 5% CO<sub>2</sub> (Incubateur muni d'un filtre HEPA, ThermoForma Série II Water Jacketed CO<sub>2</sub>) pour des périodes de temps de 24h, 1- et 2-semaines pour les échantillons de PCL et PLA, et aussi jusqu'à 4- et 8-semaines pour les échantillons de PLA. Le milieu a été changé tous les 2-3 jours. Les treillis polymériques ont été retirés après incubation avec cellules aux périodes de temps précédemment mentionnées pour évaluations de la cytotoxicité, décompte de protéines, observations histologique, et tests biomécaniques.

Concomitamment, des treillis polymériques en triplicata (n=3) pour chacune des durées d'incubation des échantillons de PLA (24h, 1-, 2-, 4- et 8-semaines;



$n_{\text{total}}=15$  échantillons) ainsi que 2 treillis de PCL ( $n=2$ ) pour chaque période d'incubation étudiée (24h, 1- et 2-semaines;  $n_{\text{total}}= 6$ ) ont été maintenus dans des conditions identiques, mais sans ensemencement cellulaire. Cette procédure a été conduite à des fins de comparaison entre les résultats biomécaniques obtenus pour ces treillis et les valeurs recensées pour les échantillons ayant été ensemencés avec des cellules ostéoblastiques.

### **3.4.1.1. ANALYSES BIOCHIMIQUES**

#### **3.4.1.1.1. CYTOTOXICITÉ**

L'estimation de l'activité cellulaire et de la distribution spatiale a été accomplie par dosage du MTT. Le MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) est un colorant mesurant l'activité cellulaire, relevé par les mitochondries et converti à une coloration bleue pour la détection de cellules viables et métaboliquement actives. Les échantillons polymériques préalablement incubés *in vitro* avec des cellules ostéoblastiques humaines MG-63 ont été retirés du milieu de culture et placés dans des nouvelles plaques de 12-puits après chaque durée d'incubation. Les structures ont été incubées à 37°C dans la solution MTT composée, par puit, de 40µL de solution contenant 5mg/ml MTT et 360µL de milieu de culture complet pour une période d'une (1) heure. Le surnageant a subséquemment été retiré et le précipitant extrait dans l'isopropanol acide (0.1 N HCl dans l'isopropanol absolu). L'isopropanol a été ajouté afin de dissoudre les cristaux bleus qui ont été formés par les cellules détenant un métabolisme cellulaire actif. Le

contenu de chaque puit a été collecté et transféré dans des micropuits distinctifs d'une plaque de 96 micropuits. Les densités optiques (OD) ont été déterminées à 562nm à l'aide d'un spectrophotomètre [Universal Plate Reader EL800 Bio-Tek Instruments Inc].

#### 3.4.1.1.2. DÉCOMPTE DE PROTÉINES

L'évaluation de la quantité totale de protéines contenue dans les treillis polymériques a été posée après chacune des durées d'incubation, utilisant une trousse de dosage de protéines BCA [Pierce, # Produit 23225-0708]. Ce dosage de protéines BCA consiste en une formulation compatible aux détergents et basée sur l'acide bicinchoninique (BCA) pour la détection colorimétrique et la quantification de la totalité des protéines.

Les treillis 3D polymériques ont été retirés du milieu de culture après chaque durée d'incubation, placés dans des fioles distinctives de 1.5ml auxquelles 400µl de tampon AlpAse (pH: 10.5) a été ajouté afin de lyser les cellules. Après un minimum de 2h plus tard, 25µl de solution ont été pipetés dans des micropuits préalablement identifiés de plaques de 96-micropuits, dans lesquels 25µl d'eau ultrapure a ensuite été ajoutée. 200µl de réactif BCA ("*working reagent*") ont été additionnés à chacun des micropuits, les plaques ont ensuite été remuées manuellement pour une durée de 30 sec., recouvertes d'un film plastifié, et incubées pour 30 min. à 37°C. Puis, les plaques ont été refroidies à température ambiante et l'absorbance a été mesurée à

543nm par un lecteur de plaques spectrophotométrique [Universal Plate Reader EL800 Bio-Tek Instruments Inc].

### **3.4.1.2. OBSERVATION HISTOLOGIQUE**

Les treillis 3D polymériques ont été préparés pour l'analyse histologique après les temps d'incubation préalablement définis (24h, 1- et 2-semaines pour les treillis de PCL, et 24h, 1-, 2- et 4- et 8-semaines pour les treillis de PLA). Les composites cellules / treillis 3D et les contrôles ont été fixés par 4% paraformaldéhyde pour 24h.

Une déshydratation standard dans des solutions d'alcool augmentant séquentiellement à 100% d'éthanol a été complétée, suivie d'une immersion dans un bain de xylène, puis de xylène saturé de paraffine, et finalement de fusion et paraffine [Marra]. Les blocs de polymères / tissus ont été sectionnés à 4-5  $\mu\text{m}$  et colorés à l'Hématoxyline et Éosine (H&E).

Les lamelles ont été préparées en triplicata et les structures composites ont ensuite été observées par microscopie optique [Nikon Eclipse 80i muni de caméra numérique Coolpix MDC Lens, Nikon, Japan]. Les images obtenues ont été utilisées pour évaluer qualitativement la colonisation cellulaire à l'intérieur des microstructures poreuses.

### 3.4.1.3. TEST BIOMÉCANIQUE

Des tests de compression non confinés ont été conduits sur les treillis polymériques à l'aide d'un biorhéomètre à déplacement progressif contrôlé [Figure 17].

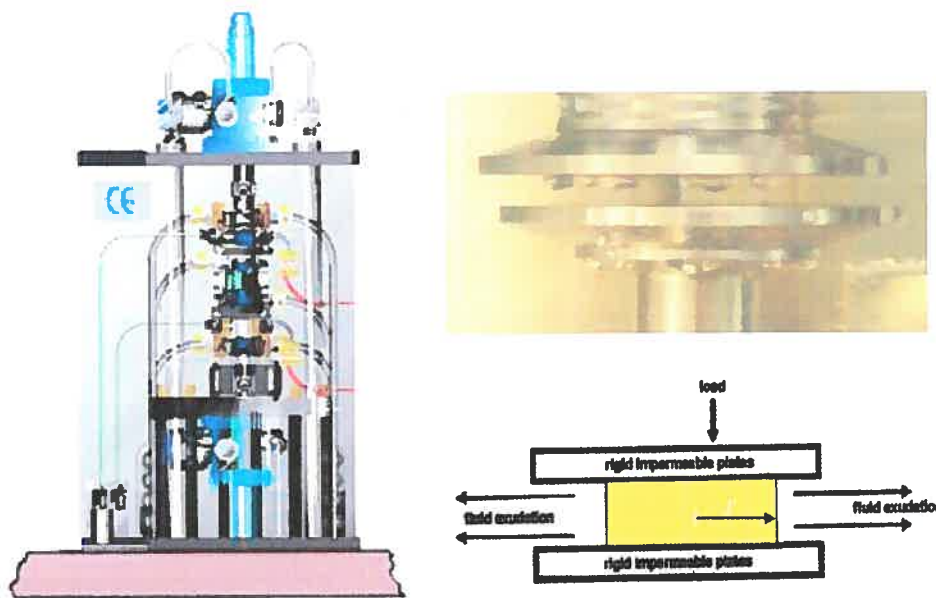


Figure 17 : Schéma représentant un modèle de biorhéomètre<sup>24</sup>

Le test consiste à appliquer un déplacement compressif graduel à l'échantillon de treillis tridimensionnel situé entre deux plaques parallèles pratiquement sans friction. Puisque les plaques sont imperméables, l'exudation du fluide hors des pores se produit sur les côtés de l'échantillon. 5 séries de contraintes successives (3% chacune) ont été appliquées à un taux de déplacement de 0.115mm/s, et les échantillons ont été soumis à un temps de relaxation de 30 min (equilibrium) entre chacune des applications de contraintes compressives.

#### **3.4.1.4. ANALYSE STATISTIQUE**

Tous les résultats biochimiques et histologiques consistent en la moyenne des valeurs obtenues pour trois (3) treillis 3D polymériques pour chacune des durées d'incubation testées. Les résultats obtenus pour les tests biomécaniques représentent une moyenne de 3 treillis enrichis de cellules et 3 treillis non enrichis de cellules, mesurés à chaque période de temps prédéterminée.

Des tests de  $t$  non pairés ont été effectués afin de comparer les forces compressives et les différences de modules entre les échantillons enrichis et non enrichis de cellules. Les résultats obtenus sont exprimés en moyenne  $\pm$  erreur-type (SEM). Tous les autres résultats ont été analysés statistiquement par ANOVA simple. Une valeur de  $p \leq 0.05$  est considérée comme statistiquement significative.

## ACCORD DES COAUTEURS DE L'ARTICLE SCIENTIFIQUE

Lorsqu'un étudiant n'est pas le seul auteur de l'article à inclure dans son mémoire, il doit obtenir l'accord de tous les coauteurs et joindre la déclaration signée à l'article en question.

### 1. Identification de l'étudiant et du programme

Nom de l'étudiante : Caroline Auclair-Daigle

Le sigle et le titre du programme : Maîtrise (M.Sc.A.) Génie Biomédical [2-535-1-0]

### 2. Description de l'article

Titre : "Polymeric Bone-like Scaffolds for Osteochondral Grafting : Performance Modeling, *in vitro* Culture and Biomechanical Assays"

Ordre des auteurs : Caroline Auclair-Daigle, B. Sc.; Qin Shi, Ph.D.; Mitra Azizeh-Yousefi, Ph.D.; Robert DiRaddo, Ph.D.; Julio Fernandes, M.D. M.Sc.

La revue à laquelle l'article est destiné : Tissue Engineering

L'état actuel de l'article : phase finale de préparation

### 3. Déclaration de tous les coauteurs autres que l'étudiant

À titre de coauteur de l'article identifié ci-dessus, je suis d'accord pour que Caroline Auclair-Daigle inclue cet article dans son mémoire de maîtrise qui a pour titre :

« Caractérisation Et Évaluation In Vitro De La Section Osseuse De Treillis 3d Ostéochondraux Pour Le Remplacement De Cartilage Articulaire Par Génie Tissulaire »

Qin Shi

30/06/05

Coauteur

Date

Mitra Azizeh-Yousefi

30/06/05

Coauteur

Date

Robert DiRaddo

30/06/05

Coauteur

Date

Julio Fernandes

30/06/05

Coauteur

Date

## CHAPITRE 4 : ARTICLE SCIENTIFIQUE

### **Polymeric Bone-like Scaffolds for Osteochondral Grafting : Performance Modeling, *in vitro* Culture and Biomechanical Assays**

*To be submitted to* : **Tissue Engineering**

<sup>1</sup>Caroline Auclair-Daigle, B. Sc.; <sup>1</sup>Qin Shi, Ph.D.; <sup>2</sup>Azizeh-Mitra Yousefi, Ph.D.;  
<sup>2</sup>Robert DiRaddo, Ph.D.; <sup>1</sup>Julio Fernandes, M.D. M.Sc.

<sup>1</sup>Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Centre de Recherche / Hôpital-du-Sacré-Coeur-de-Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>2</sup>Industrial Materials Institute, National Research Council, Boucherville, Québec, Canada.

**Tel:** (514) 338-2222 ext. 2489

**Fax:** (514) 338-2694

**\*To whom correspondence should be addressed**

Orthopaedics Research Laboratory, Department of Orthopaedics, Centre hospitalier Sacré-Coeur, 5400  
boul. Gouin Ouest, Montréal, Québec, Canada, H4J 1C5.

### **Abstract**

The design of hybrid cartilage-bone scaffolds is challenging since the high level of porosity required for tissue ingrowth reduces the stiffness of scaffold. This work aims to improve the mechanical performance of the bone section of an osteochondral scaffold while providing the optimal porosity. PLA (poly-lactide) and PCL (poly-ε caprolactone) scaffolds were fabricated by 3D-bioplotting and porogen-leaching techniques, respectively. A finite element modelling software was used to

predict the stress distribution in the constructs surrounded by native tissues. Cell culture analyses were conducted in order to evaluate the cytotoxicity and protein count of the scaffolds. Histological examination allowed for observations at the scaffold microstructure level as well as for the cell migration within. Analyses were performed at 24h, 1-, and 2-weeks of incubation time for PCL and PLA scaffolds, as well as up to 4- and 8-weeks for PLA scaffolds.

The property mismatch between the scaffold and native tissues has the potential of reducing the level of tissue ingrowth, and as a consequence affecting the efficiency of this technique for cartilage/bone replacement. The comparison of simulation results under compressive loads demonstrated that the stress field inside PCL scaffolds and that of cartilage are similar. *In vitro* assays data proved PCL and PLA scaffolds to be non toxic. Protein count values showed an elevation in protein amount according to incubation time for PLA scaffolds, but insufficient sample number for PCL constructs do not allow for conclusive observations. Histological slides showed the presence of migrated cells within the PCL and PLA scaffolds' micro porous structure.

A modelling tool would allow optimizing the performance of scaffolds. In vitro studies performed on higher sample number and incubation time would allow for a more elaborate and conclusive investigation.

**Key Words :** Tissue engineering, articular cartilage, osteochondral, bone, bioplotter



## 1. INTRODUCTION

Arthritis is a major cause of morbidity, disability and health care utilization nowadays. Articular cartilage plays an essential role in freely moving joints since it provides a near-frictionless and low-wear bearing surface of the articulating bones while helping to absorb mechanical loads. In addition, because of its avascular nature, cartilage exhibits a very limited capacity to regenerate and to repair under injury or arthritic disease. Current treatments have had limited success in terms of their efficiency or have unacceptable side effects. For example, the autologous chondrocyte implantation procedure lacks inter-patient consistency and the surgical procedure is technically challenging [Sherwood, Tibesku]. Its high financial cost makes it unviable as a widespread treatment in many health care systems. Moreover, the short-term success of a procedure does not necessarily equate with long-term repair. Therefore there is an urgent need for improved treatment of articular cartilage defects.

In fact, the biological basis of joint problems is the deterioration of articular cartilage and subchondral bone at the joint surface [Mizuta]. Self-repair of hyaline cartilage is limited and the tissue that forms is usually a combination of hyaline and fibrocartilage, which does not perform as well as hyaline cartilage and can degrade over time [Temenoff].

Tissue engineering of cartilage and bone using a cell-scaffold approach has demonstrated potential to offer an alternative and effective method for treating articular defects. The method, consisting of seeding highly porous biodegradable scaffolds with osteoblasts/chondrocytes and/or growth factors *in vitro* and culturing

them to promote tissue growth, offers several advantages. The scaffold degrades over time while leaving place to ingrowing tissues. The scaffold-tissue construct can then be surgically implanted into cartilage lesion *in vivo* once a certain level of tissue growth is achieved. The use of bioresorbable matrices in the treatment of chondral defects holds promise since the regenerated hyaline cartilage shows a full integration after several weeks [Petersen].

In several orthopaedic diseases such as osteoarthritis and osteochondritis dissequans, bone represents part of the disease. Therefore, the generation of new scaffolds that address both articular cartilage and subchondral bone as a unit should pave the way to a much more efficient treatment. Although bioresorbable scaffold design is a booming domain, current practice employs only limited empirical and heuristic knowledge, with little input from mathematical representation of the underlying material science fundamentals. A computational tool, based on material science would greatly facilitate the design of bioresorbable scaffolds by predicting transient scaffold-tissue construct behaviour and corresponding optimal scaffold porous architecture [Hollister]. Such a computational tool (CAD) would predict local stress fields in scaffold-biological tissue construct under physiological conditions, directly affecting tissue ingrowth.

In general, scaffolds must satisfy the following requirements: (a) provide a space that will define the shape of the regenerating tissue, (b) provide temporary function during tissue regeneration, and (c) facilitate tissue ingrowth by allowing the inclusion of seeded cells and growth factors [Hollister]. The second and third requirements imply conflicting design goals. While adequate mechanical properties

require a dense scaffold, cell migration and nutrient transport are facilitated by a porous scaffold. On the other hand, the stiffness of the scaffold may alter the local mechanical environment and consequently the metabolic activity of the cells [Guilak]. Therefore they should be designed to match the stiffness and strength of healthy tissues while maintaining an interconnected pore network and a reasonable overall pore volume. The topology optimization seems to be a logical solution to satisfy the conflicting requirements [Hollister].

In this investigation, we are aiming at the first steps toward the development of soft/hard hybrid scaffolds that will be used for the repair of cartilage/bone as a unit. Some new designs of the bony scaffold part allow a secure bone-to-bone fixation of the articular bone-cartilage interface [Hutmacher]. The fabrication technique must be flexible to the variations in the design parameters through the thickness.

Hence, the main goal of this study is to facilitate the development of the bone section of a hybrid scaffolds for cartilage/bone tissue engineering. The objectives of this investigation include (a) using a bioresorbable polymer for the bone section of a osteochondral scaffold using an emerging 3D bioplotting technique to fabricate optimized and reproducible scaffolds; (b) developing a numerical tool to facilitate the design of hybrid scaffolds for cartilage/bone tissue engineering and simulate the biomechanical performance of scaffold-tissue constructs (the specifics of this section can be found elsewhere [Gauvin 2005]); and (c) human osteoblast-like cell (MG-63) culturing on the 3D-scaffolds and performing subsequent biochemical, histological and biomechanical examination.

## 2. MATERIALS AND METHODS

### 2.1. SCAFFOLD MATERIALS

Poly-Lactide (PLA) and poly ( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) were obtained from commercial sources Biomer Ltd (Krailling, Germany) and Dow (Varenes, Québec, Canada) respectively. These polymers were synthesized to meet their special requirements in terms of molecular weight and degradability.

### 2.2. SCAFFOLD FABRICATION

#### 2.2.1. PCL SCAFFOLDS [POROGEN-LEACHING TECHNIQUE]

Interconnected poly ( $\epsilon$ -caprolactone) [PCL] porous scaffolds were fabricated using a combination of co-continuous blending of two biocompatible polymers (PCL and polyethylene oxide, PEO) and salt particulate leaching, such as previously described elsewhere [Reignier]. The polymer-salt composition used in this study had a PCL/PEO composition ratio kept constant at 50/50 to ensure a co-continuous morphology of the polymer components, and a NaCl concentration of 60% volume, hence generating an average porosity close to 80% [Table 1] [Reignier]. These samples were punched in PCL porous sheets prepared by compression molding at 150°C.

### 2.2.2. *PLA SCAFFOLDS (3D-BIOPLOTTER TECHNIQUE)*

3D plotting technique was used to fabricate the designed scaffolds. This technique has been successfully used in the literature to fabricate scaffolds with the capability of enhancing tissue ingrowth [Woodfield], and is based on dispensing a plotting material into a plotting medium. A computer-aided-design (CAD) file, specifying the geometry of the scaffold, has also been used as input to produce the physical model by the apparatus. Experimental curves relating the scaffold architecture to mechanical performance of scaffolds were created. This information was used as input to optimize scaffold architecture by numerical tools [Gauvin 2005].

### 2.3. **POROSITY MEASUREMENT (PCL AND PLA).**

The porosity or void volume fraction  $V_f$  (%) of the PCL scaffolds was calculated using the following equation:

$$V_f = \left(1 - \frac{\rho^*}{\rho_s}\right) \times 100 \quad \text{[Equation 1]}$$

where  $\rho^*$  is the apparent density of the porous scaffold determined by measuring the height, diameter and weight of the samples, and  $\rho_s$  is the density of the non-porous material.

### 2.4. **MECHANICAL CHARACTERIZATION.**

Both unseeded and cell-seeded scaffold constructs were tested under compression (saline bath at 37°C) for small and large deformations. A multi-purpose biorheometer was used for the biomechanical testing, as it can be re-configured to fulfill various testing needs. Three (3) series of unconfined compression tests were

conducted on the samples using this displacement-controlled apparatus at a displacement rate of  $0.115\mu\text{m/s}$ . Each test consists of applying gradual compressive displacement onto the scaffolds placed within two parallel quasi-frictionless plates [internal procedure IMI / NRC, 2005].

## 2.5. SCAFFOLD DESIGN AND SIMULATION OF BIOMECHANICAL RESPONSE

A modelling tool based on the biphasic theory has been used to predict the stress distribution throughout the scaffold-cartilage constructs in our previous work [Gauvin 2005]. Mow *et al.* [Mow 1980, Mow 1997] developed this theory to describe the load-bearing characteristics of cartilage, accounting for its both fluid and solid components, where the standard stress equilibrium equations are modified as follows:

$$\frac{\partial \sigma_{ij}^s}{\partial x_j} + K(u^s - u^f) = 0 \qquad \frac{\partial \sigma_{ij}^f}{\partial x_j} + K(u^f - u^s) = 0 \qquad \text{[Equation 2]}$$

In these equations,  $\sigma_{ij}^s$  and  $\sigma_{ij}^f$  are solid and fluid stresses,  $u_s$  and  $u_f$  are solid and fluid velocities, and  $K$  is the drag coefficient related to the equilibrium Young's modulus, permeability and porosity level of scaffold. This model specifically applies to the cartilage section of an osteochondral construct. As the purpose of this study is to investigate the bone section and the bone being elastic, the Hooke's law was used to predict the stress distribution for the bone component.

Hence a 3D large material deformation software that includes the biphasic model, better suited for biomechanical analysis of biological tissues, is currently being developed at the Industrial Material Institute / National Research Council (IMI/NRC)

[Yousefi]. This numerical tool will be used in our future work to simulate the biomechanical response of the 3D-designed osteochondral scaffolds for cartilage and bone (as a unit) during their structural evolution after *in vitro* culturing. This tool also will allow designing scaffolds with desired mechanical properties through adjusting design variables (porosity level, pore size, and scaffold material) based on the procedure described elsewhere [Gauvin 2005].

## **2.6. BIOLOGICAL EVALUATION**

20 PCL experimental samples and 75 PLA structures were divided into 3 time points (24h, 1- and 2-weeks). Additional testing times of 4- and 8-weeks were conducted for the PLA scaffolds. Analyses were conducted in triplicates from each group for each type of examination at one time point.

### **2.6.1. *IN VITRO* STUDIES**

MG-63 Human osteoblastic cell line was obtained from American type culture collection [ATCC, Manassas, VA]. Cells were maintained in 75 cm<sup>2</sup> flasks in complete HAM-F12/DMEM media [Sigma-Aldrich] containing 10% FBS [Invitrogen life technologies, Burlington, Canada] and grown to confluence. Discs of polymeric scaffolds were first individually weighed and sterilized by soaking in two changes of ethanol for 30 min. The discs were then transferred into a sterile 250ml screw-cap cup, immersed in culture medium, and incubated overnight at 37°C prior to cell seeding. The scaffolds were then individually put into distinctive wells of 24-well

plates [Falcon, Lincoln Park, NJ]. The constructs seeding followed: the best cell seeding method was found to be a top seeding approach [Sherwood]. 1ml of the cell suspension was pipetted onto the top of the polymer scaffolds directly giving a concentration of  $5.0 \times 10^5$  cells / 1ml. 1ml of media was added to each well. Disc were incubated at 37°C in a 5% CO<sub>2</sub> atmosphere [ThermoForma Series II Water Jacketed CO<sub>2</sub> incubator equipped with HEPA filter, Fisher Scientific Canada] for period of time of 24h, 1- and 2-weeks for the PCL scaffolds, and 24h, 1-, 2-, 4- and 8-weeks for PLA scaffolds. Media was changed every 2-3 days. Polymeric scaffolds were removed after incubation with cells at time points previously mentioned for evaluation of cytotoxicity, protein count, histological examination, and biomechanical testing.

Concomitantly, scaffolds in triplicate (n=3) for each testing time of PLA scaffolds (24h, 1-, 2-, 4- and 8-weeks post-incubation; n<sub>total</sub> =15 samples) along with two PCL scaffolds (n=2) for each time point studied (24h, 1- and 2-weeks post-incubation; n<sub>total</sub> =6 samples) remained culture medium without cell enrichment as to further compare their biomechanical results with those obtained for the biomechanical testing of cell-seeded scaffolds.

### **2.6.2. BIOCHEMICAL ANALYSES**

#### **Cytotoxicity**

Estimation of cellular activity and spatial distribution was accomplished using the MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay.



Polymer samples previously incubated with confluent human osteoblastic cells *in vitro* were removed from culture medium and placed into new 24-well-plates after each testing times.

Samples were incubated at 37°C in MTT solution composed of 40µL of solution containing 5mg/ml MTT and 360µL of complete culture medium per well, for duration of 1h. The supernatant was subsequently removed and the insoluble precipitant extracted in isopropanol. The optical densities (OD) were determined at 562 nm using a universal microplate reader EL800 [Bio-Tek Instruments Inc., Winooski, Vermont].

### **Protein Count**

Evaluation of total protein amount contained within the samples was performed after each testing time point, using a BCA Protein Assay Kit [Pierce, Biotechnology inc., Rockford]. The standard protein curve was established using bovine serum albumine (BSA) [Pierce]. Polymeric scaffolds were removed from culture medium after each testing time and placed into a distinctive test tube along with 400µl of of lysis buffer solution (100mM glycine, 1mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ZnCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, pH10.5). After a minimum of 2h, 25µl of the solution was then pipetted into appropriate 96-microwell plate wells, to each which 25µl of ultrapure water was added. 200µl of BCA working reagent was added to each well, the plate hand-shaken for 30 sec., covered, and incubated for 30 min. at 37°C. The plates were then cooled to room temperature and the absorbance measured at 562nm on a microplate reader [Universal Plate Reader EL800 Bio-Tek Instruments Inc.].

### 2.6.3. HISTOLOGICAL EXAMINATION

Seeded discs were prepared for histology after incubation time points previously defined (24h, 1- and 2-weeks for PCL scaffolds, and 24h, 1-, 2-, 4- and 8-weeks for PLA scaffolds). Cell-scaffold composites and control were fixed in TissuFix #2 [Laboratoires Gilles Chaput, Montréal, Québec, Canada] for 24h. Tissue blocks were sectioned at 4 or 5 $\mu$ m in the transverse plane and stained with Hematoxylin and Eosin (H&E). Slides were prepared in triplicate, the composite structure was then observed using light microscopy in order to qualitatively evaluate cellular ingrowth along with success and survival rates [Nikon Eclipse 80i optical microscope equipped with Coolpix MDC Lens, Nikon, Japan].

### 2.7. STATISTICAL ANALYSIS

All of the biochemical and histological results consist of an average of the values obtained for 3 scaffolds at each testing time. The results obtained through mechanical testing performed post incubation are an average of 3 cell-enriched scaffolds and 3 cell-free-culture-medium-only scaffolds measured for each time point. Unpaired, two-tailed *t* tests were performed as to compare the compressive strength and modulus differences for the cell-enriched and cell-free polymeric discs. All other results are expressed as means  $\pm$  or standard-error. Statistical analyses were accomplished by ANOVA. A value of  $p \leq 0.05$  was considered as statistically significant.

### 3. RESULTS

#### 3.1. SCAFFOLD FABRICATION

All polymeric discs were successfully prepared with controlled thickness and porosity. All scaffolds showed overall average dimensions of 6mm diameter and 4mm thickness.

##### 3.1.1. *CO-CONTINUOUS POLYMER LEACHING / PARTICULATE-LEACHING TECHNIQUES [PCL]*

Compared to conventional salt leaching techniques and derivative methods, this process allowed a better control of pore interconnection within salt through the fully interconnected open porous structure resulting from the porogen polymer etching [Reignier]. The scaffolds used in this investigation had a porosity of 78.84% [Table 1], which corresponds to the optimal range for this type of application [Reignier].

##### 3.1.2. *3D-BIOPLOTTER TECHNIQUE [PLA]*

PLA scaffolds were generated by this rapid prototyping technology in order to manufacture scaffolds with more suitable structural and mechanical properties for bone and cartilage regeneration. The designs of the scaffolds were unique, and each sample had a characteristic three-dimensional interconnected pore structure. Viewed from the top, the architecture presents several arrays of parallel bundles in the 155 to 215 $\mu$ m diameter range. A lateral view reveals the intercrossing filaments stacked in horizontal plane, with each filament fused at the cross-junctions [Figure 1]. This arrangement gave a porosity of 70.0% [Table 2].

### 3.2. PERFORMANCE MODELING

The software at its current state (without the biphasic capability) was first used for simulation of the load-bearing characteristics of typical hybrid osteochondral scaffolds. The numerical simulation of the unconfined compression test configuration was chosen to illustrate the effect of 10% compressive strain on the mechanical response of a hybrid scaffold surrounded by osteochondral native tissues [Figure 2a][Gauvin-2]. The finite element mesh was divided into different layers as to represent the variations in the properties through the thickness [Figure 2b]. The Young's moduli assigned to the scaffold and tissues were taken from the literature [Laasanen - Awad]. Figure 2c shows the stress field inside a hybrid scaffold surrounded by osteochondral native tissues.

The mechanical response of a scaffold surrounded by cartilaginous native tissue under unconfined compression test (5% compressive strain) was predicted using the IMI software. The finite element mesh is presented in the Figure 3a. The Young's modulus assigned to the tissue was taken from the literature. Figure 3b shows the stress field inside a scaffold from literature surrounded by the cartilaginous tissue. Figure 3c shows the stress field inside the PCL scaffold made for this work (85% porosity). The stress mismatch is less pronounced in this case.

However, it is imperative to note that additional new simulations are required for the specific characterisation of subchondral bone and for the bone scaffolds made in this work, as to better target the response of the subchondral bone (in term of its assigned Young's modulus) for cartilage repair through an osteochondral approach [Figure 3d].

### 3.3. MECHANICAL PROPERTIES OF THE BONE REGION

The design of the bone section investigated here was made such that its porosity would give this portion more mechanical strength. The aim was to target optimal porosity for the bone region, balancing mechanical properties, which are closer to bone at low porosities, and high surface area, which promotes vascularization and bone ingrowth and increases with increasing porosity [Sherwood]. An increased porosity leads to a diminished compressive modulus (initial linear elastic region). This dependence of Young modulus on porosity gives the opportunity to tailor the biomechanical response of scaffold to the damaged tissue [Gauvin-1]. It is worth noting that the region of densification is generally not observed due to the limitation of the apparatus to reach high compressive stress [Reignier]. **Figure 4** shows the Young's modulus' variation for PCL and PLA up to, respectively, 2- and 4-weeks of incubation time.

#### **PCL Scaffolds**

The results for the biomechanical testing of the PCL scaffolds showed that the initial PCL constructs held a compressive stiffness of approximately 2.92 MPa [Reignier]. Young's modulus remained rather constant in all of the constructs tested and for the duration of incubation time [**Figure 4A**]. No statistically significant differences were detected the samples enriched with the cell line and those that remained cell-free. The values for PCL appear to stay constant while showing a slight increase, but there was no statistically significant variations noted between the

1-week and 2-weeks incubated scaffolds. PCL constructs offered mechanical response that could be suitable for cartilage repair, however, those polymeric structures demonstrated mechanical properties (compressive elastic modulus, E) that were significantly lower than those of subchondral bone, whose compressive Young's modulus is approximately 13GPa [Rho].

### **PLA Scaffolds**

The results of the biomechanical testing for the PLA scaffolds showed that the initial PLA constructs held a compressive stiffness of approximately 13 MPa. The Young's modulus stays relatively constant for up to 4-weeks in culture medium, set aside the values obtained at 2-weeks that were lower possibly due to a mishandling of the samples and the probable occurrence of delamination [Figure 4B]. A drop in compressive stiffness is detected after 8-weeks of incubation time. PLA constructs showed Young's modulus values varying considerably for the same timepoint. Hence, reproducibility was not achieved.

## **3.4. BIOCHEMICAL ANALYSES**

### **MTT Cytotoxicity Testing**

*In vitro* MTT Assays data proved PCL and PLA scaffolds to be non toxic. Results show a positive gradient for the ratio of viable cells / dead cells over incubation time, for both PCL and PLA scaffolds [Figures 5a and 5b].

### **Protein Count Assays**

PCL scaffolds presented a slight variation but did not appear to generate significant differences between the amounts of protein detected after 2-weeks of incubation time versus after only 1-week contained in culture medium [Figure 6a]. PLA constructs showed a definite increase in total protein amounts from day one up to 8 weeks. There seems to be a constant raise throughout the duration of the incubation [Figure 6b].

### **3.5. HISTOLOGICAL EXAMINATION**

#### ***Poly ( $\epsilon$ -caprolactone)***

PCL histological light micrographs showed cell colonization throughout the microstructure of the scaffold, occurring as soon as after 1 week of incubation time in culture medium [Figure 7]. A constant gradient of cellular migration was maintained throughout incubation time. Cells within the scaffold were ellipsoid in shape. The PCL polymeric scaffold was distinguishable from tissue by its pinkish level intensity. Observable cell in-growth but no scaffold deformation were observed in the PCL group until the end of culture duration time. Cell clusters were mainly noted in the immediate areas adjacent to the surface of the scaffolds. This progress gained intensity with incubation time, at 2-weeks of incubation time, cellular in-growth was detected within practically all interconnected pores of the PCL scaffolds. All PCL samples sustain thick layers of cells on the surface as well as cellular activity within the scaffolds.

### *Poly-Lactide)*

All observations (not shown) made onto the PLA scaffolds were less evident, and the presence of numerous artefacts was noted. Light microscopy results indicate limited cell growth throughout the scaffold, as observed by histological examinations. Layers of osteoblastic cells are seen growing on the surface of the scaffold. Histological analysis confirms cellular production but minor proliferation throughout the scaffolds. After 8-weeks of incubation, histological examination of PLA scaffolds confirmed unilayers of cells grown to confluence on the surface of the scaffolds: approximately 5% of tissue ingrowth is observed.

The amounts of tissue ingrowth within PCL and PLA discs were not similar. A much thicker, confluent cell growth is noted on the surface of the PCL samples. Unseeded scaffolds did not display any cellular activity.

## **4. DISCUSSION**

This investigation aimed at developing polymeric scaffolds composed of different materials, porosity, pore sizes, architectures, and resulting mechanical properties, each specifically optimized for the bone section of an osteochondral construct for cartilage repair. It is, however, imperative to note that the determination of the best seeding method and extent of matrix deposition was made with the full osteochondral scaffold design in mind. The aim of this study also included an examination of the interaction of osteoblastic cells and the biomaterials and to evaluate the consequences of biomaterial changes, or lack thereof, over time in



culture. Nevertheless, it is clear that to truly evaluate the best combination, an *in vivo* implantation of these pre-fabricated constructs is required.

### **Materials**

Both poly-lactide) (PLA) and poly( $\epsilon$ -caprolactone) (PCL) that have been tested in this investigation as potential scaffold materials are common biodegradable polymers. In order for polymers to be considered for use in the biomedical field, and particularly for tissue engineering, optimal biological acceptability and compatibility is a primary concern [Angelova]. The PCL and PLA scaffold samples were only maintained *in vitro* for period of time of up to 2- and 8-weeks, respectively, but they did show suitability for use with biological matters. There is also the option of incorporating natural compounds into polymers, after minimal chemical modifications, which could result in materials with the desired physical properties and even better biocompatibility [Ishihara – Wang 1999].

### **Fabrication**

This study showed that PCL porous scaffolds prepared by a combination of co-continuous polymer leaching and particulate leaching techniques using melt processing techniques is of major interest for applications such as for the replacement of bone and articular cartilage. This new fabrication method enables to increase the porosity range compared to either of the two single techniques while keeping a good interconnectivity between the pores. As-prepared scaffolds may be used in tissue engineering as well as in other applications requiring well-defined micropore and macropore structures [Reignier].

The emerging 3D plotting techniques seem to bring more improvements into the fabrication process for cartilage and calcified tissue. The use of emerging solid freeform biphasic scaffolds fabrication (3D bioplotter in this current study) represents a new strategy for the repair of human osteochondral defects. In an attempt to facilitate cell attachment, proliferation and matrix deposition while ensuring sufficient mechanical support for this bone section of an osteochondral unit, a porosity of 74% is used in the designed PLA scaffolds.

The scaffolds generated by these techniques are advantageous for numerous reasons, such as the fact that they can be designed to fit patient-specific injuries and match articular surface geometry [Schek]. In fact, solid freeform prototyping systems are becoming valuable tools for tissue engineers to rapidly evaluate design alternatives [Hutmacher]. The integration of CAD tools to such a rapid prototyping system would permit both commercial and research scaffold designers to rapidly fabricate designed scaffold architectures and evaluate their mechanical properties prior to animal testing and clinical implantation. Select research teams have proposed such integration, and have established the efficiency of the approach by *in vitro* and pre-clinical *in vivo* validations [Sachlos].

The 3D bioplotter permitted the formation of a complex hybrid structure suitable as a cartilage-bone tissue-engineering scaffold for implantation into articular defects. In contrast to conventional rapid prototyping systems, mainly focused on melt processing, the 3D plotting can also apply a much larger variety of synthetic as well as natural materials, including aqueous solutions and pastes [Landers].

The flexibility of the 3D bioplotter to alternative design parameters allowed analysing the effect of pore architecture on the mechanical performance of scaffolds (equilibrium modulus and permeability). Once optimal scaffold architectures have been evaluated on rapid prototyping technique, these topologies were extended to conventional techniques more conducive to mass production and high porosity structure development, such as the co-continuous blending of two polymers porogen-leaching method in this current study.

### **Performance Modeling**

The lower compressive stress inside the scaffold for which the data were taken from literature could be due to its lower stiffness, which could lead to the perturbation of the stress field once the scaffold is implanted. This property mismatch also hold the potential of affecting the level of tissue ingrowth once the implantation is done. However, for osteochondral tissues, a gradient in scaffold properties is essential. Even though the PCL scaffolds (85% porosity) similarly matched the mechanical response of cartilage, they do not yet have the required gradient to be used as osteochondral scaffold, as they do not yet integrate their bone counterpart [Figure 3].

The development of a new software used in this investigation allow to predict the biomechanical performance and to optimize the architecture of porous osteochondral scaffolds. This tool greatly facilitates research in tissue engineering and has the potential of significantly helping the medical community and researchers in this field to improve the efficiency of the tissue regeneration procedure. Moreover,

this research could extend its contribution to the treatment of diseases such as osteoarthritis and osteochondritis dissequans, as well as improving grafting of osteochondral defects in trauma and oncologic surgery.

A few models have been developed as to theoretically relate tissue mechanics and transport to biochemical composition [Bushman - Quinn]. The elaboration of such models highlights the interrelations of native and neo-tissue mechanical and transport properties on factors describing biochemical composition.

The consequence of biomaterial degradation on changes in cell viability and how this may affect long term survival is not yet fully understood. However, PCL and PLA have been proven to potentially improve cell growth as well as modify degradation time and mechanical properties. Numerous studies have also shown PCL and PLA to be non-toxic to cells, while PCL and PLA scaffolds have also been proven to be degradable and shapeable materials [Huatan].

A generalized accumulation and degradation model for the description of engineered cartilage could be extrapolated using the numerical modeling tool. The significance of the models lies in their potential to guide future studies exploring the biophysics of cell metabolism and cell-matrix interactions. Subsequently, the consequences of product inhibition kinetics on matrix assembly have been addressed in the context of tissue engineering [Wilson].

## **Mechanical Characterisation**

### *PCL*

The values for the dried, unseeded PCL scaffolds laid at about 2.92 MPa, which may render these scaffolds suitable for support high loading applications, such as cartilage regeneration [Reignier]. The lack of difference between the 1-week and 2-weeks incubated scaffolds could be due to the insufficient period of time between the two timepoints. The same supposition could be attributed when comparing the absence of statistically significant variations between the cell-free and cell-enriched scaffolds. The results of the tests under compression constitute an appropriate assessment of the scaffold for load-bearing applications [Marra].

### *PLA*

The non-reproducibility of the PLA compressive elastic modulus could be related to the varying porosity of the samples (from 66% to 74%, even with identical scaffold dimensions). Apart for the incoherent values for the 2-weeks incubated scaffolds, there seems to be a constant preservation of modulus up to 4-weeks, preceding the lowering observed after 8-weeks of incubation time. Possible delamination could generate a drop in Young's modulus over time (more pronounced after 4-weeks). According to the compressive tests performed, bone ingrowth doesn't seem to increase the modulus within the 8-weeks period.

### ***In vitro studies***

The composites were seeded with a human osteoblastic cell line as an indicator of the potential of the materials to be used as the bone section of a clinical

osteocondral graft. The cultured osteoblasts were also examined in this preliminary study as to determine the osteoconductive potential of the materials

The production of such a tissue-engineered implant requires more *in vitro* time, which is certainly a limiting factor. Also, the ultimate success of repair cartilage may require its integration with surrounding articular cartilage to maintain biomechanical integrity. The fact that the tissue-engineered implants have been shown to mature *in vivo* could thus be of considerable advantage to surgeons and patients, as efforts to enhance restoration of the subchondral bone may play an important role in future effort to repair full-thickness articular cartilage lesions in humans [Mainil-Varlet]

#### **MTT & Protein Count**

The lack of statistically significant variation between the amounts of total protein detected within the PCL scaffolds after 1-week versus 2-weeks of incubation could be attributed to the limited numbers of samples available at the time of the testing, as well as to the short period of time between the 1- and 2-weeks incubation periods. The increasing quantities of total protein detected in the PLA constructs, in correlation with incubation time, seem to translate not only the presence of an increasing amount of cells within the scaffolds, but also their productivity in terms of the assembly of the extracellular matrix. However, the consequence of biomaterial degradation on changes in cell viability and how this may alter long-term survival of an implant is not clear. In fact, an increase in death associated with the release of acidic products during PLA degradation has been demonstrated [Wang 2004].

### **Histological Examination**

The highly porous PCL and PLA scaffold structures were expected to allow cell growth and proliferation, with the pore size increasing even further on soaking in culture medium, facilitating cell penetration and adhesion [Chang Lin & Lin]. Osteoblastic cells placed in the three-dimensional scaffolds were expected to migrate throughout the interconnected pores, and each scaffold's physical and chemical characteristics determine whether the seeded cells will grow and maintain their phenotype and extracellular matrix productions [Buckwalter 1993]. These characteristics include the scaffold's texture, porosity (size, structure, distribution), hydrophilicity, and surface free energy [Freed – Gugala]. These factors are strongly influenced by the quality of the polymer, its degradation rate, and the technique used for scaffold preparation.

Observations on the most widely used polymers have often evidenced the presence of a second, delayed tissue response in addition to the initial reaction following surgery for the implantation procedure. Such a response, sometimes years after implantation [Bergsma – Beumer], is normally associated with the beginning of chemical and mechanical degradation of the material and involves the presence of phagocytic cells associated with the material resorption process. Hence the use of certain natural polymers would be of interest in the regard [Campoccia]. It is therefore rather complicated to produce an ideal scaffold that will allow cells to keep their phenotype and allow a perfect matrix assembly [Mainil-Varlet].

Degradation time and pore size are two other important characteristics for tissue engineering such polymers composites. The pore sizes of the PCL scaffolds were estimated by mercury intrusion porosimetry (MIP) and it should be noted that

the intruded volume of pores between 0.1 and 10  $\mu\text{m}$  represents more than 50% of the overall porosity. The porous PCL scaffolds possess fully interconnected pores around 1-5 $\mu\text{m}$ . Macropores (around 100-500 $\mu\text{m}$ ) with a cubic shape are also observed. These macropores are fully interconnected by the continuous micropores network (typically, 1-2  $\mu\text{m}$ ). Occasionally, small pores (about 5-50 $\mu\text{m}$  in diameter) can be found in the cell wall [Reignier].

The average pore size is of 282 $\mu\text{m}$  for the PLA scaffolds, the range being very precise with the 3D-bioplotting technique (255-330 $\mu\text{m}$ ). The smaller pore size and interconnectivities between the pores of the PCL and PLA scaffolds, as well as the slower degradation rate of PLA scaffolds, limited cell in-growth toward the center of the constructs [Reignier]. In fact, the complete remodelling of PLA has been reported to be more than 2 years [Middleton - Bergsma – Wang 2004]. Conversely, the aim should be put on scaffolds that have a more reasonable degradation time of 2 months to 1 year [Johnson], which may be more suitable *in vivo*. However, PCL and PLA materials appear to have a suitable pore size that allows cell in-growth and migration.

It is therefore essential that a subchondral support structure provides an adequate structural support, sustains appropriate cell viability, and permits integration and maturation of the overlying neocartilage. Moreover, the ability of both components to integrate with all associated native tissues is a common multidimensional problem associated with such cartilage repair strategies.



## 5. CONCLUSION AND FUTURE WORK

The perspective of using a dual-phase composite graft to repair an osteochondral defect provides an environment for both osteo- and chondral repair processes [Gao]. This current investigation aimed at developing the bone section of a hybrid osteochondral scaffold, as further studies should elaborate similar approaches for the cartilage portion of such a replacement device.

Further investigation may yield a method of cartilage repair superior to the techniques now currently used, as additional investigation would be needed to clarify the long-term behaviour of such cartilage-like tissue-engineered implants. Future studies involve targeting the mechanical properties of the polymeric scaffolds as well as binding growth factors to the composites to optimize tissue growth within the scaffolds.

The main assignments of this work now include the development of future models that will parametrically relate the kinetics of *in vitro* neo-tissue formation to events occurring at the cell and molecular levels. Such a progress would potentially allow for enhanced design and optimization of engineered tissues [Wilson]. In parallel, the use of various models related to construct composition could be coupled with known structure-function relationships in order to approximate the mechanical response of emerging tissue constructs.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Fondation de la Recherche en Santé du Québec (FRSQ) and Industrial Materials Institute / National Research Council (IMI / NRC).

The authors are grateful for the operative assistance of Anna Bardetti, Christian DeGrandpré, Marc-André Rainville and Louise Sun (Industrial Materials Institute / National Research Council).

## REFERENCES

**Angelova N, Hunkeler D.** Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends in Biotechnology* 17: 409-421, (1999).

**Awad HA, Wickham MQ, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F.** *Bioengineering Conference*, Florida (2003).

**Bergsma JE, Rozema FR, Bos RR, de Bruijn WC.** Foreign body reactions to resorbable to poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *J Oral Maxillofac Surg* 51: 666-670, (1993).

**Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RR, Boering G.** Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 16: 25-31 (1995).

**Beumer GJ, van Blitterswijk CA, Ponec M.** Biocompatibility of a biodegradable matrix used as a skin substitute: an in vivo evaluation. *J Biomed Mater Res* 28: 545-552 (1994).

**Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegema TR, Eyre DR.** Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J. Bone Joint Surg Am* 75: 1533-1548 (1993).

**Bushmann MD, Grodzinsky AJ.** A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. *Journal of Biomechanical Engineering* 117: 179-192 (1995).

**Campoccia D, Doherty P, Radice M, Brun P, Abatangelo G, Williams DF.** Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials* 19: 2101-2127 (1998).

**Chang CH, Lin FH, Lin CC, Chou CH, Liu HC.** Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. *J Biomed Mat Res Part B, Appl Biomat* 71B: 313-321 (2004).

**Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G.** Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp. Cell Res* 240: 58-65 (1998).

**Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI.** Repair of osteochondral defect with tissue-engineered two-phase composite material of injectable calcium phosphate and hyaluronan sponge. *Tissue Engineering* 8: 827-837 (2002).

**Gauvin C., Yousefi A.M., Reignier, J., Huneault, M., DiRaddo, R., Fernandes, J.** Paper submitted to *Tissue Engineering* (2005).

**Gauvin-1, C., Reignier, J., Yousefi, A.-M., Huneault, M., DiRaddo, R., Fernandes, J.** Canadian Arthritis Network's Conference, Vancouver, November 11-13 (2004).

**Gauvin-2 C, Yousefi AM, DiRaddo RW, Fernandes J,** 13th biannual conference for the Canadian Society of Biomechanics, Halifax, Novo Scotia, August 4-7 (2004).

**Gugala Z, GogolewskiS.** In vitro growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold. *J Biomed Mater Res* 49: 183-91 (2000).

**Guilak F, Butler DL, Goldstein SA, Mooney DJ.** *Functional tissue engineering*, Springer, New York (2003).

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

**Huatan H, Collett JH, Attwood D, Booth C.** Preparation and characterization of poly(epsilon-caprolactone) polymer blends for the delivery of proteins. *Biomaterials* 16: 1297-1303 (1995).

**Hutmacher DW.** Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21: 2529-2543 (2000).

**Ishihara K, Fukumoto K, Iwasaki Y, Nakabayashi N.** Modification of polysulfone with phospholipid polymer for improvement of the blood compatibility. Part 1. Surface characterization. *Biomaterials* 20: 1545-1551 (1999).

**Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J, Meyers L, Sciadini MF.** Porous ceramics as bone graft substitute in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res* 14: 351-69 (1996).

**Laasanen MS, Töyräs J, Korhonen RK, Rieppo J, Saarakkala S, Nieminen MT, Hirvonen J, Jurvelin JS.** Biomechanical properties of knee articular cartilage. *Biorheology* 40: 133-140 (2003).

**Landers R, Hübner U, Schmelzeisen R, Mülhaupt R.** Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials* 23: 4437-4447 (2002).

**Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP.** *OsteoArthritis and Cartilage* 9 suppl. A: S6-S15 (2001).

**Marra KG, Szem JW, Kumta PN, Dimilla PA, Weiss LE.** *Journal of Biomedical Material Research* 47: 324-335 (1999).

**Mizuta H, Kudo S, Nakamura E, Otsuka Y, Takagi K, Hiraki Y.** *Osteoarthritis and Cartilage* 12: 586-596 (2004).

**Mow VC, Kuei SC, Lai WM, and Armstrong CG.** *J. Biomech. Eng.* 102: 73-84 (1980).

**Mow VC, Ratcliffe A, 2nd ed., Mow VC and Hayes WC (Eds).** *Basic Orthopaedic Biomechanic.* Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers, (1997).

**Petersen JP, Ruecker A, Von Stechow D, Adamietz P, Poertner R, Rueger JM, Meenen NM.** *European Journal of Trauma* 1: 1-10 (2003).

**Quinn TM, Dierickx P, Grodzinsky AJ.** Glycosaminoglycan network geometry may contribute to anisotropic hydraulic permeability in cartilage under compression. *Journal of Biomechanics* 34: 1483-1490 (2001).

**Reignier J, Huneault M.** *Proceedings of the International Symposium on Advanced Biomaterials 2005*, Montréal, April 4-7, 2005.

**Rho JY, Ashman RB, Turner CH.** Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. *J Biomech. Journal of Biomechanics* 26(2): 111-119 (1993).

**Sachlos E, Czernuszka JT.** Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials* 5: 29-40 (2003).

**Schek RM, Taboas JM, Segwiche SJ, Hollister SJ, Krebsbach PH.** Engineered osteochondral grafts using biphasic composite solid free-form fabricated scaffolds. *Tissue Engineering* 10 (number 9/10): 1376-1385 (2004).

**Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates M, Griffith LG, Landeen LK, Ratcliffe A.** *Biomaterials* 23(24): 4739-4751 (2002).

**Temenoff JS, Mikos AG.** Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21: 431-40 (2000).

**Tibesku CO, Szuwart T, Kleffner TO, Schlegel PM, Jahn UR, Van Aken H, Fuchs S.** Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation.. *J. Orthopaedic Research* 22:1210-4. (2004).

**Wang X, Grogan SP, Rieser F, Winkelmann V, Maquet V, La Berge M, Mainil-Varlet P.** Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds : an in vitro study. *Biomaterials* 25: 3681-3688 (2004).

**Wang C, Stewart RJ, Kopecek J.** Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains. *Nature* 397: 417-20 (1999).

**Wilson CG, Bonassar LJ, Kohles S.** Modeling the dynamic composition of engineered cartilage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 408: 246-254 (2002).

**Woodfield T.** *Cartilage Tissue Engineering: instructing cell-based tissue repair through scaffold design*, PhD Thesis, University of Twente (2004).

**Yousefi A, Gauvin C, Debergue P, DiRaddo R, Fernandes J.** *SPE ANTEC Technical Papers*. Chicago, May 17-19 (2004).

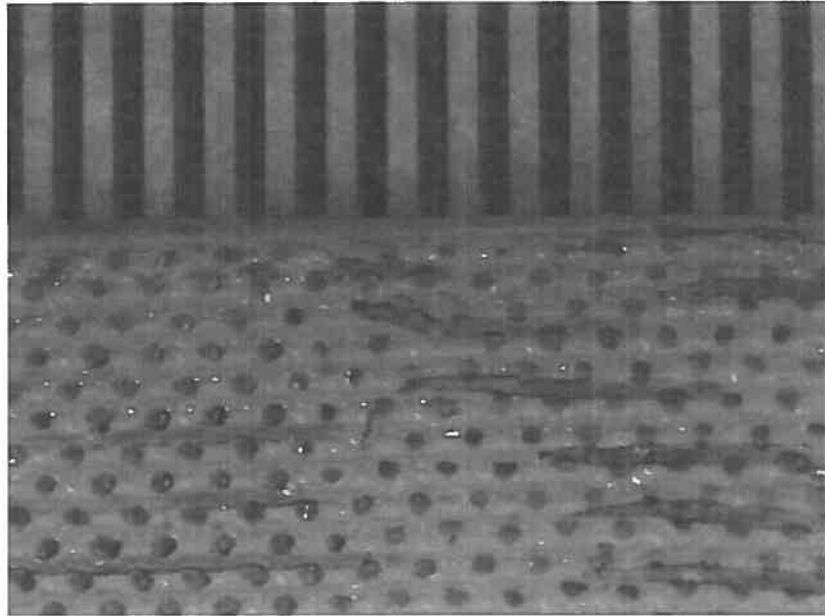
**TABLE 1 : PCL DENSITY AND POROSITY MEASUREMENTS**

PCL/PEO/NaCl (%vol.)	PCL porous structure	
	Density (g/cm)	Porosity (%)
20/20/60	0.242±0.004	78.84±0.37

**TABLE 2 : PLA DENSITY AND POROSITY MEASUREMENTS**

PLA (% vol.)	PLA porous structure	
	Density (g/cm)	Porosity (%)
100	1.25±0.02	70.0±4.0

**FIGURE 1 : 3D-BIOPLOTTED PLA SCAFFOLD, CROSS-SECTION**



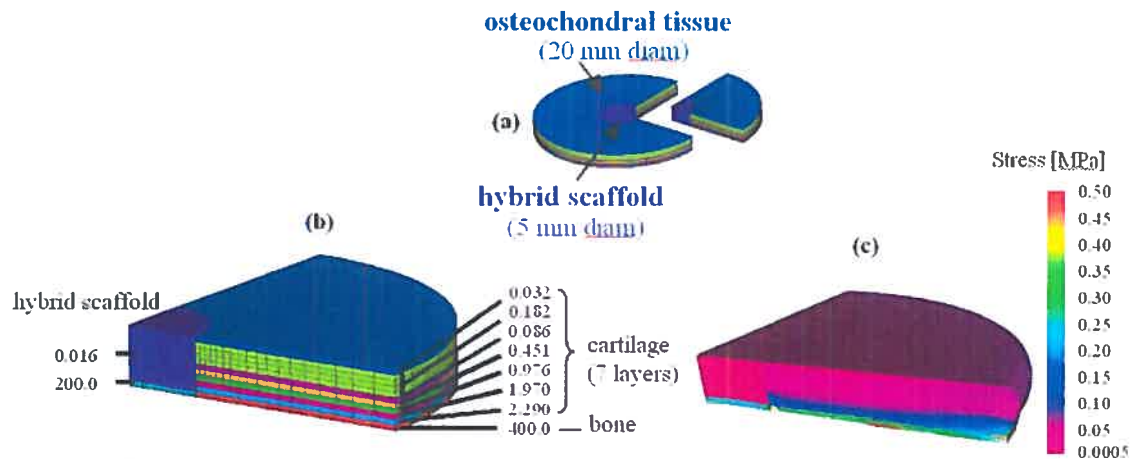
**FIGURE 2 : PREDICTION OF MECHANICAL RESPONSE INSIDE A HYBRID SCAFFOLD SURROUNDED BY OSTEOCHONDRAL NATIVE TISSUES.**

**(A) SCHEMATIC REPRESENTATION OF A TYPICAL SCAFFOLD IMPLANTED INSIDE TISSUE;**

**(B) MULTIPLAYER FINITE ELEMENT MESH OF ONE QUARTER OF THE SAMPLE;**

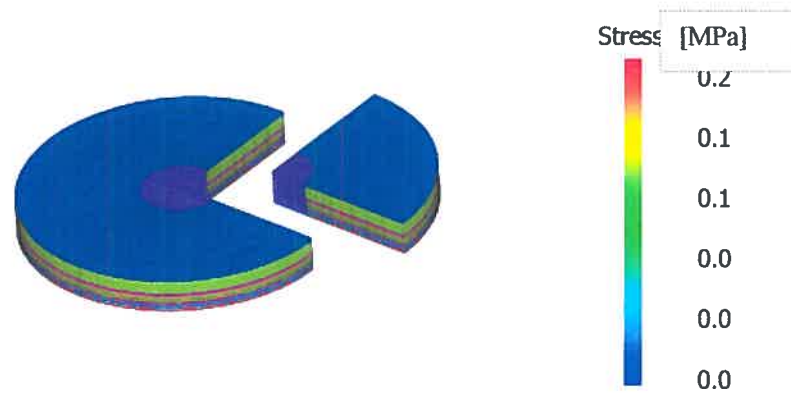
**(C) STRESS DISTRIBUTION THROUGHOUT THE SAMPLE UNDER 10% COMPRESSIVE STRAIN.**

**NUMBERS INDICATE YOUNG'S MODULUS TAKEN FROM THE LITERATURE [LAASANEN-AWAD].**

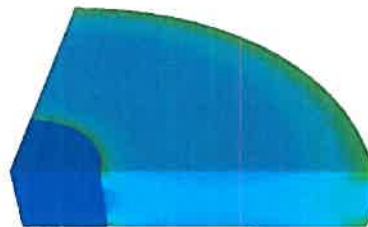




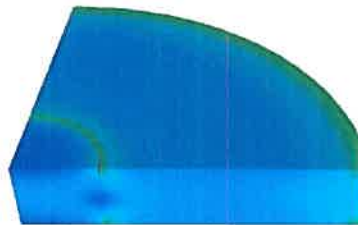
**FIGURE 3 : FINITE ELEMENT ANALYSIS SIMULATIONS  
(SCAFFOLD VS TISSUE) 5% DEFORMATION UNDER COMPRESSION**



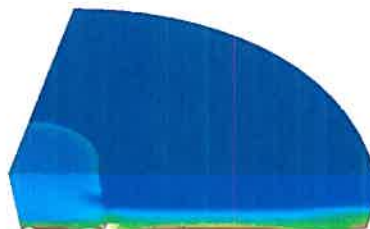
**(A) FEA MESH;**



**(B) SCAFFOLD FROM LITERATURE WITHIN CARTILAGINOUS TISSUE;**



**(C) PCL SCAFFOLD USED IN THIS STUDY, WITHIN CARTILAGINOUS TISSUE;**



**(D) OSTEOCHONDRAL MODEL, COMBINING THE SUBCHONDRAL BONE SECTION  
UNDERNEATH THE CARTILAGE COUNTERPART**

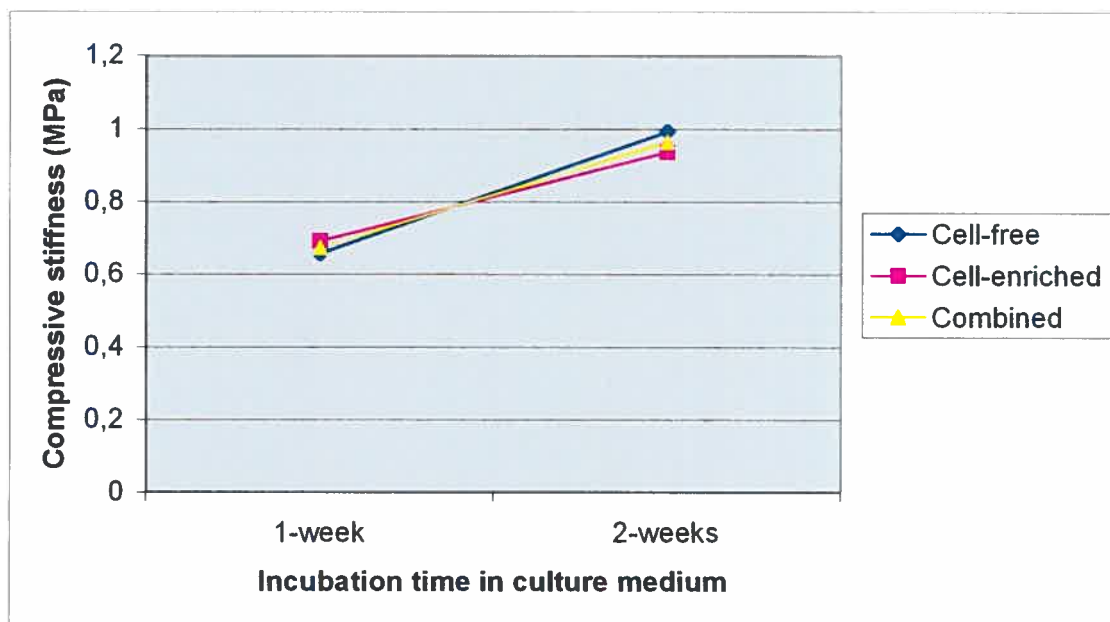
**FIGURE 4 : AVERAGE COMPRESSIVE MECHANICAL CHARACTERISATION (YOUNG'S MODULUS VALUES) OF PCL (A) AND PLA (B) SCAFFOLDS INCUBATED IN COMPLETE CULTURE MEDIUM WITHOUT ("CELL-FREE") OR WITH CELL-ENRICHMENT ("CELL-ENRICHED"). THE "COMBINED" CURVE CORRESPONDS TO THE YOUNG'S MODULUS VALUES OF BOTH CELL-FREE AND CELL-ENRICHED SAMPLES COMBINED TOGETHER.**

**Two-tailed  $t$  tests, statistically significant at  $p \leq 0.05$**

**(A) AVERAGE COMPRESSIVE STIFFNESS FOR PCL SCAFFOLDS INCUBATED 1-AND 2-WEEKS ("CELL-FREE" OR "CELL-ENRICHED, N=2 PER TIME POINT)**

**Differences detected all non-statistically significant ( $p \geq 0.05$ )**

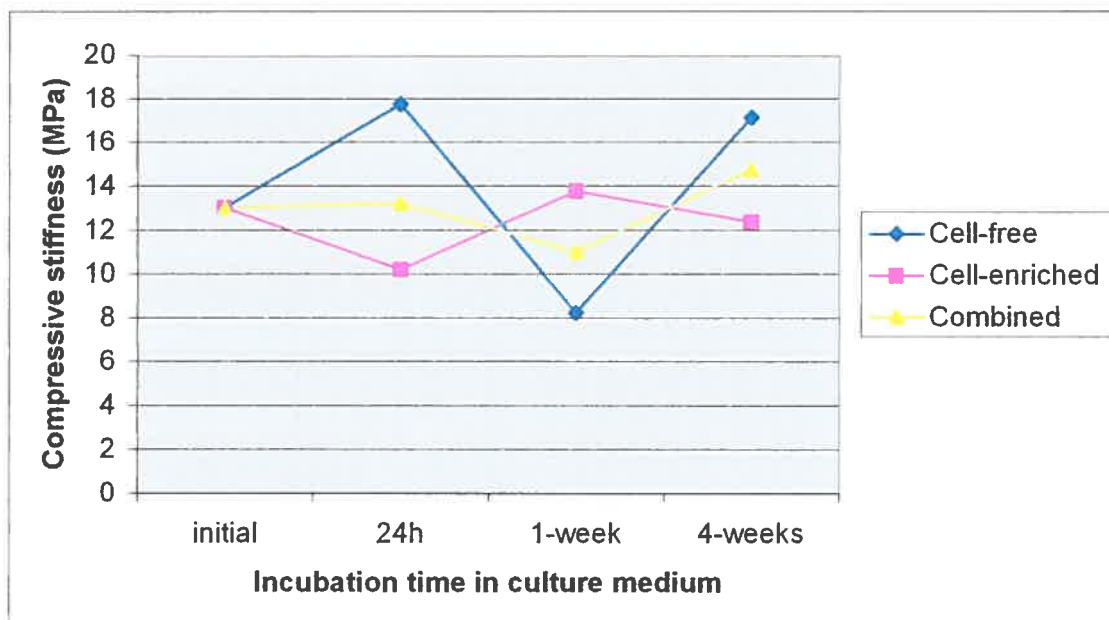
1. Cell-free (1w) and cell-enriched (1w) : ( $p \geq 0.05$ )
2. Cell-free (2w) and cell-enriched (2w) : ( $p \geq 0.05$ )
3. 1-week (combined) and 2-weeks (combined) scaffolds : ( $p \geq 0.05$ )



**(B) AVERAGE COMPRESSIVE STIFFNESS FOR PLA SCAFFOLDS INCUBATED UP TO 4-WEEKS (EXCLUDING 2- AND 8-WEEKS OF INCUBATION TIME) (“CELL-FREE” OR “CELL-ENRICHED N=3 PER TIME POINT)**

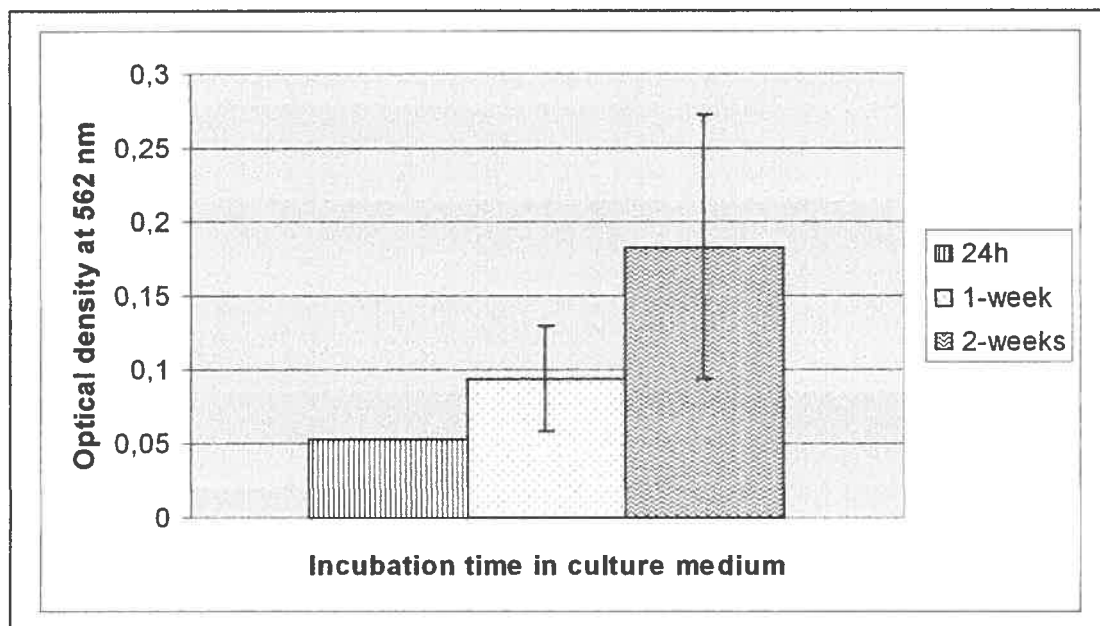
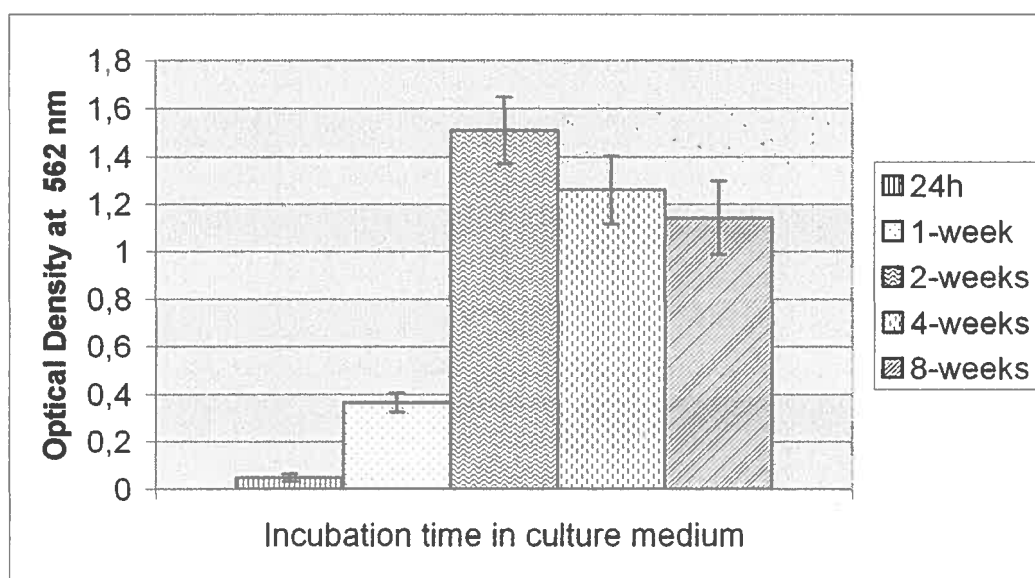
**Differences detected all non-statistically significant ( $p \geq 0.05$ )**

1. Cell-free (initial) and cell-enriched (initial) : ( $p \geq 0.05$ )
2. Cell-free (24h) and cell-enriched (24h) : ( $p \geq 0.05$ )
3. Cell-free (1-week) and cell-enriched (1-week) : ( $p \geq 0.05$ )
4. Cell-free (4-weeks) and cell-enriched (4-weeks) : ( $p \geq 0.05$ )
5. Initial vs 24h vs 1-week vs 4-weeks : ( $p \geq 0.05$ )



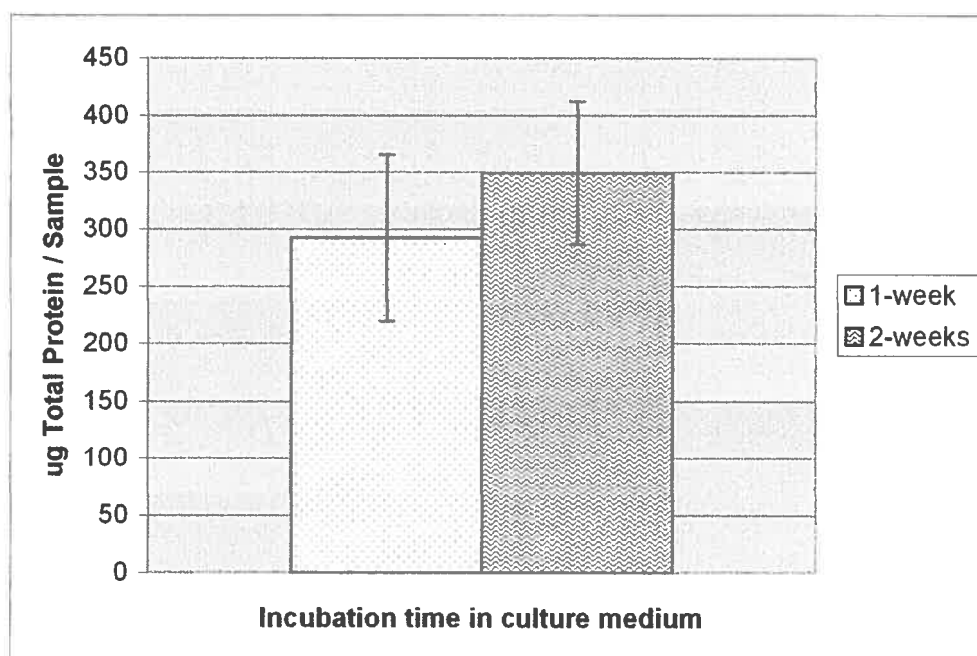
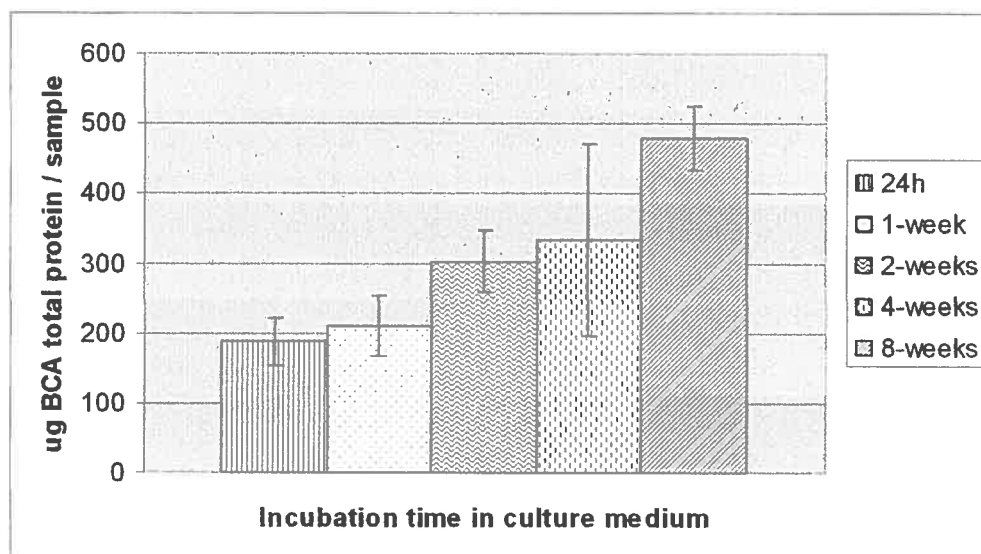
**FIGURE 5 : MTT CYTOTOXICITY ASSAYS ON PCL AND PLA SCAFFOLDS**Results expressed as means  $\pm$  standard-error

Statistical Analyses by ANOVA.

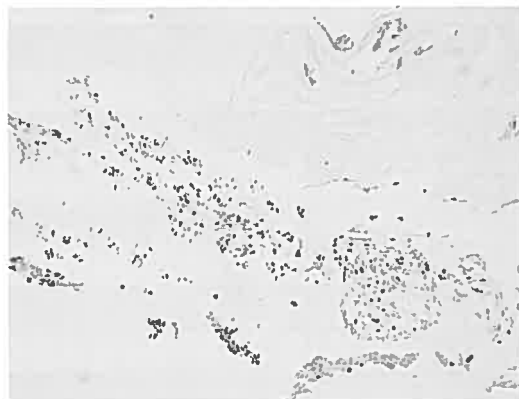
 $p \leq 0.05$  considered as statistically significant**(A) POLY (E-CAPROLACTONE) [PCL] SCAFFOLDS (POROGEN-LEACHING) N=2**All results non-statistically significant ( $p \geq 0.05$ )**(B) POLY-LACTIDE [PLA] SCAFFOLDS (3D-BIOPLOTTER), N=3 PER TIME POINT**All results non-statistically significant ( $p \geq 0.05$ )

**FIGURE 6 : BCA PROTEIN ASSAYS, TOTAL PROTEIN QUANTIFIED**Results expressed as means  $\pm$  standard-error

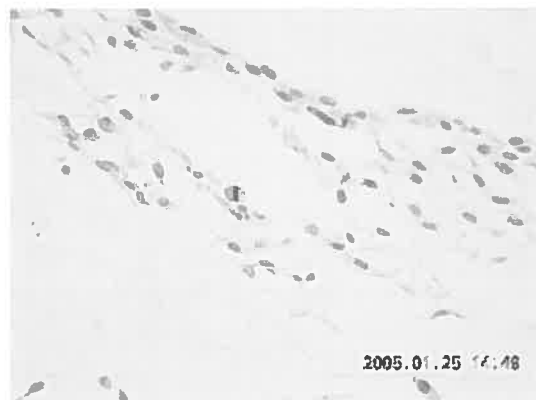
Statistical Analyses by ANOVA.

 $p \leq 0.05$  considered as statistically significant**(A) PCL SCAFFOLDS, N=2 PER TIME POINT**All results non-statistically significant ( $p \geq 0.05$ )**(B) PLA SCAFFOLDS, N=3 PER TIME POINT**All results non-statistically significant ( $p \geq 0.05$ )

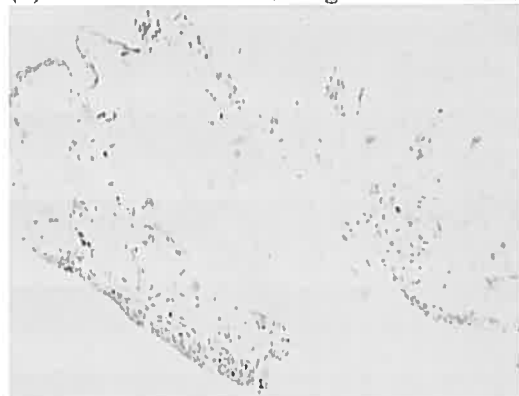
**FIGURE 7 : HISTOLOGICAL EXAMINATION OF THE PCL SCAFFOLDS SHOWING THE CELL COLONIZATION THROUGHOUT THE MICROPOROUS STRUCTURE**



**(a) 1-week incubated, magnification 10x;**



**(b) 1-week incubated, magnification 40x;**



**(c) 2-week incubated, magnification 10x;**



**(d) 2-week incubated, magnification 40x.**

## **CHAPITRE 5 : SYNTHÈSE SUBSTANTIELLE**

### **(Discussion générale des résultats)**

Cette investigation visait le développement et l'évaluation *in vitro* de treillis polymériques tridimensionnels composés de différents matériaux, porosités, tailles de pores, architectures et propriétés mécaniques résultantes, chacune spécifiquement optimisée pour la section osseuse d'une structure ostéochondrale pour le remplacement de cartilage articulaire lésé lors de blessures ou de pathologies d'ordre arthritique ou autres.

Il est toutefois impératif de mentionner que la détermination de la meilleure méthode d'ensemencement et d'étendue de la déposition de la matrice a été faite en considérant, de façon primordiale la conception globale du treillis tridimensionnel ostéochondral. L'objectif de la présente étude visait également l'évaluation de l'interaction des cellules ostéoblastiques avec les biomatériaux ainsi que l'évaluation des conséquences des modifications des biomatériaux, ou l'insuffisance de changements survenus, sur la durée d'incubation des treillis en milieu de culture.

Néanmoins, il est inévitable de préciser qu'afin d'évaluer la meilleure combinaison, une implantation *in vivo* de ces structures polymériques s'avère indispensable.

## 5.1. CONCEPTION DES TREILLIS ET OPTIMISATION TOPOLOGIQUE

La conception de la section osseuse investiguée dans cette étude a été élaborée de sorte que sa porosité puisse accorder à cette portion une part de la résistance mécanique. L'objectif visait à déterminer la porosité optimale pour la région osseuse d'une unité ostéochondrale, balançant les propriétés mécaniques, plus rapprochées de l'os à basses porosités, et une aire de surface élevée, assurant la promotion de la vascularisation et de la croissance cellulaire, et augmentant en parallèle avec l'accroissement de la porosité [Sherwood]. Une porosité élevée mène à un module de compression affaibli. Cette dépendance du module de Young sur la porosité octroie l'opportunité de conceptualiser sur mesure la réponse biomécanique d'un treillis par rapport au tissu lésé [Gauvin-1].

Tel que précédemment mentionné, l'optimisation topologique vise la création de treillis tridimensionnels reproduisant les caractéristiques des tissus natifs ostéochondraux. Deux méthodes de fabrication ont été exploitées afin de générer des treillis polymériques tridimensionnels cylindriques détenant des dimensions de 6mm de diamètre par 4mm d'épaisseur. L'objectif était ainsi de chercher à observer comment les paramètres topologiques des treillis 3D affectent leur performance mécanique. Pour ce faire, des treillis tridimensionnels détenant différentes tailles de pores, différentes porosités ainsi qu'en utilisant deux différents polymères ont été générés. La caractérisation mécanique de ces treillis 3D indique qu'en faisant varier ces paramètres topologiques il est possible de se rapprocher très fidèlement de la



réponse biomécanique du cartilage et/ou de l'os soumis à une charge. Aussi, puisque l'objectif global de cette étude est d'évaluer la faisabilité d'un protocole de régénération de tissus ostéochondraux, les résultats obtenus par les procédés d'optimisation topologique et de caractérisation mécanique soulignent l'importance de développer une distribution de taille de pores au travers de l'épaisseur du treillis tridimensionnel.

La fabrication de treillis biphasiques par prototypage rapide représente une nouvelle stratégie pour la réparation de lésions ostéochondrales humaines ainsi que pour les remplacements de joints lésés ou pathologiques. Ces treillis tridimensionnels détiennent plusieurs avantages, et pour de nombreuses raisons. En particulier, ils peuvent être conçus précisément pour un type de lésions spécifique à un patient, et pour une géométrie de surface articulaire particulière [Schek].

Par contre, la production d'un tel implant par génie tissulaire requiert davantage de temps passé *in vitro*, ce qui représente inévitablement un facteur limitant. De plus, le succès ultime d'une réparation de cartilage pourrait nécessiter son intégration avec le cartilage articulaire environnant afin de maintenir son intégrité biochimique [Mainil-Varlet]. Le fait que de nombreux implants générés par génie tissulaire aient démontré une maturation *in vivo* pourrait donc être avantageux pour les chirurgiens et les patients, puisque les efforts accordés à la restauration de l'os sous-chondral pourrait bientôt jouer un rôle important dans les réflexions futures visant la réparation de lésions du cartilage articulaire chez l'humain [Mainil-Varlet].

## 5.2. SIMULATIONS PAR ANALYSE D'ÉLÉMENTS FINIS

Pour ce qui est des simulations en analyses d'éléments finis, la réponse mécanique d'un treillis tridimensionnel contenu à l'intérieur d'un tissu natif cartilagineux et soumis à des tests de compression non-confinés (à 5% de contraintes compressives) a été prédite selon un logiciel de simulation créé au CNRC. Un maillage d'éléments finis a ainsi été défini. Grâce à ce modèle, une simulation du champ de contraintes contenu à l'intérieur d'un treillis 3D (dont les données ont été extraites de la littérature), et de celui d'un tissu cartilagineux natif situé en périphérie a pu être généré. La charge unitaire compressive inférieure à l'intérieure du treillis 3D est due à sa rigidité plus faible, ce qui pourrait mener à un champ de contrainte perturbé dès l'implantation du treillis tridimensionnel. Ce défaut d'alignement des propriétés aurait d'ailleurs la possibilité d'affecter le taux de croissance cellulaire à l'intérieur de la microstructure polymérique tridimensionnelle.

Par contre, une simulation des champs de contraintes contenus à l'intérieur d'un treillis de PCL tel qu'utilisé dans le cadre de cette investigation, et entouré d'une simulation d'un même tissu cartilagineux natif, démontre que la différence au niveau de la distribution des contraintes compressives est beaucoup moins prononcée. Les champs de contraintes s'avèreraient ainsi être particulièrement similaires entre le treillis tridimensionnel polymérique de PCL et ceux recensés dans un tissu cartilagineux natif. Par contre, pour le remplacement de tissus ostéochondraux, un gradient au niveau des propriétés des treillis s'avère être essentiel. Ainsi, même si les treillis tridimensionnels de PCL évalués dans ce projet semblent offrir une réponse

mécanique correspondant à celle que l'on retrouve dans le cartilage natif, les treillis de PCL ne détiennent pas encore le gradient requis pour pouvoir être utilisés à titre de treillis 3D qualifiés d'ostéochondraux, puisqu'ils n'intègrent pas encore leur composante osseuse.

### **5.3. CARACTÉRISATION MÉCANIQUE**

Les treillis polymériques tridimensionnels de PCL et de PLA ont démontré détenir des propriétés mécaniques significativement inférieures à celles attribuées à l'os trabéculaire. Par contre, les résultats des tests en compression constituent une évaluation appropriée des treillis développés pour des applications de support de charge telle que pour le cartilage articulaire [Marra].

L'étude comparative des résultats de séries de contraintes successives sur le niveau de stress mesuré dans les treillis tridimensionnels de PCL permet d'affirmer que la réponse mécanique des échantillons de PCL à 85% porosité est similaire, comparée aux données prises dans la littérature, à celle du cartilage. En fait, les résultats obtenus portent à croire qu'en préservant la porosité à 80-85% et en modifiant l'intervalle de taille de pores, une reproduction efficace de la réponse biomécanique du cartilage pourrait être atteinte.

Les résultats s'avéraient toutefois être particulièrement instables pour ce qui est des tests effectués sur les treillis de PLA. La délamination recensée chez certains de ces treillis pourrait être à l'origine d'une reproductibilité insatisfaisante. La

viscosité changeante de l'état des matériaux utilisés pour la production des treillis, due à la limitation de la quantité de matériau pouvant être contenu à l'intérieur du dispositif de dispersion du matériau, et ainsi à une certaine variabilité entre les lots de matériaux visqueux introduits, pourrait en partie expliquer cette non reproductibilité.

De plus, il est à noter qu'au moment où ces expériences ont été effectuées, les partenaires de ce projet au CNRC étaient en période d'apprentissage en ce qui a trait au fonctionnement du bioplotter 3D et ainsi certains des paramètres structuraux n'ont pas pu être maintenus constants durant l'investigation. La situation semble maintenant être résolue et le fonctionnement et la compréhension de la nouvelle technologie par prototypage rapide paraît être bien maîtrisés.

## **5.4. ÉTUDE *IN VITRO***

### **5.4.1. ANALYSES BIOCHIMIQUES**

#### **5.4.1.1. CYTOTOXICITÉ**

Les évaluations effectuées *in vitro* pour ce qui est de la détection quantitative de la viabilité cellulaire démontrent le caractère non toxique des polymères PCL et PLA. Les résultats génèrent un gradient positif pour les ratios de cellules viables / cellules mortes recensées à l'intérieur des microstructures poreuses des treillis tridimensionnels, ce gradient croissant en fonction de la durée d'incubation des échantillons en milieu de culture enrichi de lignée cellulaire.

#### **5.4.1.2. DÉCOMPTE DE PROTÉINES**

Les treillis polymériques de PCL ne semblent pas générer de différences significatives entre les quantités de protéines totales détectées après 2-semaines d'incubation versus après seulement 1-semaine contenus en milieu de culture. Cette absence de variation pourrait être attribuée au nombre limité d'échantillons disponibles au moment où ces analyses ont été conduites, élément ne permettant pas une évaluation exhaustive de la capacité de production de matrice extracellulaire à l'intérieur de la structure microporeuse. Aussi, une autre explication pourrait provenir de la période de temps d'incubation insuffisante entre les deux groupes d'échantillons testés (1 semaine entre les treillis maintenus 1- et 2-semaines en milieu de culture).

Par contre, les structures tridimensionnelles de PLA présentent clairement une augmentation de la quantité de protéines totales recensées à l'intérieur de leur microstructure poreuse, un gradient s'établissant de façon constante jusqu'à 8 semaines d'incubation en milieu de culture. L'augmentation du gradient de production de protéines s'avère être relativement stable entre chacun des temps d'incubation.

Cette élévation de la quantité de protéines synthétisées par les ostéoblastes signifie une activité proliférative présente tout au long de la durée de l'incubation. Le but de cette partie de l'étude était de démontrer le métabolisme normal des cellules et

non les différentes composantes de la matrice organique osseuse telles les sialoprotéines et le collagène de type I.

#### **5.4.2. EXAMEN HISTOLOGIQUE**

Une forte colonisation à l'intérieur de la microstructure des treillis polymériques était anticipée, et a été confirmée par les observations histologiques qualitatives effectuées par microscopie optique.

Les treillis polymériques tridimensionnels ont étéensemencés d'une lignée cellulaire ostéoblastique humaine afin d'évaluer le potentiel des deux matériaux polymériques (PCL et PLA) à être utilisés pour la section osseuse d'une greffe ostéochondrale synthétique. Les ostéoblastes ont également été examinés dans cette étude afin de déterminer le potentiel ostéoconductif des matériaux.

Les prémisses supposaient que les structures tridimensionnelles poreuses de PCL et de PLA permettraient une croissance et une prolifération cellulaire, en parallèle avec une taille de pores prenant de l'expansion durant l'incubation des treillis en milieu de culture, facilitant la pénétration et l'adhésion des cellules [Chang Lin & Lin]. Les treillis de PLA fabriqués par la technique de bioplotter 3D détenaient un intervalle de taille de pores variant de 225-330 $\mu\text{m}$ , ce qui s'avère approprié pour la colonisation des cellules ostéoblastiques nécessitant une taille de pores supérieure à 100-250 $\mu\text{m}$ .

De plus, les prédictions étaient telles que des cellules ostéoblastiques introduites dans des treillis tridimensionnels devraient migrer aux travers des interconnexions, et que chacune des caractéristiques physiques et chimiques des treillis déterminerait si les cellulesensemencées croîtraient et maintiendraient leur phénotype et leur production de matrice extracellulaire. Ces caractéristiques incluent la texture du treillis, sa porosité (taille, structure, distribution), son hydrophilicité et son énergie libre de surface [Freed, Gugala]. Ces facteurs sont fortement influencés par la qualité des polymères, son taux de dégradation, ainsi que les techniques employées pour sa préparation.

Les observations effectuées sur les polymères les plus vastement utilisés ont souvent démontré d'évidence de la présence d'une deuxième réponse tissulaire, différée, en addition à la réaction initiale suivant la procédure chirurgicale d'implantation. Une telle réponse, survenant parfois plusieurs années après l'implantation initiale, est normalement associée au commencement de la dégradation chimique et mécanique du matériau et implique la présence de cellules phagocytaires associées au procédé de résorption du matériau. Ainsi, le développement de polymères naturels pourrait constituer en une approche intéressante pour limiter les réactions de l'organisme face aux matériaux polymériques synthétiques, et inciter plutôt une intégration efficace, optimale, et fiable à long terme. Il s'avère donc particulièrement ardu de produire un treillis tridimensionnel idéal, qui permettrait aux cellules de préserver leur phénotype tout en assurant la formation d'une matrice extracellulaire d'intégrité et de solidité inégalées [Mainil-Varlet].

## **CHAPITRE 6 : CONCLUSIONS & ÉLÉMENTS À CONSIDÉRER / INVESTIGATIONS FUTURES**

L'objectif principal de cette étude visait à évaluer la faisabilité d'un protocole expérimental nouvellement élaboré, et de mener une étude de caractérisation biochimique, biomécanique et histologique de la composante osseuse de treillis tridimensionnels polymériques ostéochondraux pour le remplacement de cartilage articulaire par génie tissulaire.

La méthodologie expérimentale définie et suivie dans le cadre de cette investigation serait en mesure d'être améliorée afin de remédier à certains biais et ainsi à abaisser la variabilité des résultats. À cet effet, ici sont proposées les suggestions et études éventuelles à prendre en considération pour combler les lacunes, faiblesses du projet et omissions notées lors de son déroulement, dans l'optique d'offrir des éléments de guidance pour les études futures portées à ce sujet.

Tout d'abord, des périodes d'incubation plus longues (au-delà de 16-semaines en milieu de culture) permettraient un meilleur suivi du développement de la colonisation cellulaire à l'intérieur des pores, ainsi qu'une compréhension plus complète de la génération de la matrice extracellulaire à l'intérieur de la microstructure polymérique tridimensionnelle. Des temps d'incubation plus



prolongés permettront aussi de valider l'outil de modélisation numérique utilisé dans le cadre de cette investigation.

Ensuite, un outil de modélisation plus raffiné, basé sur la théorie du modèle biphasique, permettrait d'optimiser les caractéristiques du treillis pour en améliorer son design et sa performance, tout en réduisant le nombre d'essais et erreurs. Combiné à la modélisation de la cinématique de dégradation du treillis et de la croissance cellulaire, cet outil permettrait également, lors de travaux futurs, une prédiction plus juste du comportement de la structure lors de son évolution. Ce modèle permettrait ultimement de réduire le nombre de manipulations requises dans le temps pour une expérience donnée, en réduisant l'approche d'essais et erreurs à un minimum, constituant ainsi la voie à entreprendre afin de mener à terme une investigation plus exhaustive et, somme toute, plus concluante.

## RÉFÉRENCES

**Angelova N, Hunkeler D.** Rationalizing the design of polymeric biomaterials. *Trends in Biotechnology* 17: 409-421 (1999).

**Auger, François A.** Le génie tissulaire : du rêve à la réalité *Médecine/sciences* 16 : 1324-1331 (2000).

**Awad HA, Wickham MQ, Halvorsen YD, Gimble JM, Guilak F.** *Bioengineering Conference*, Florida (2003).

**Bergsma JE, Rozema FR, Bos RR, de Bruijn WC.** Foreign body reactions to resorbable to poly(L-lactide) bone plates and screws used for the fixation of unstable zygomatic fractures. *J. Oral Maxillofac Surg* 51: 666-670 (1993).

**Bergsma JE, de Bruijn WC, Rozema FR, Bos RR, Boering G.** Late degradation tissue response to poly(L-lactide) bone plates and screws. *Biomaterials* 16: 25-31 (1995).

**Beumer GJ, van Blitterswijk CA, Ponc M.** Biocompatibility of a biodegradable matrix used as a skin substitute: an in vivo evaluation. *J Biomed Mater Res* 28: 545-552 (1994).

**Buckwalter JA, Woo SL, Goldberg VM, Hadley EC, Booth F, Oegema TR, Eyre DR.** Soft-tissue aging and musculoskeletal function. *J. Bone Joint Surg Am* 75: 1533-1548 (1993).

**Buckwalter JA, Mankin HJ.** Articular cartilage: degeneration and osteoarthritis, repair, regeneration, and transplantation. *Instr Course Lect* 47: 487-504 (1998).

**Bushmann MD, Grodzinsky AJ.** A molecular model of proteoglycan-associated electrostatic forces in cartilage mechanics. *Journal of Biomechanical Engineering* 117:179-192 (1995).

**Campoccia D, Doherty P, Radice M, Brun P, Abatangelo G, Williams DF.** Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification. *Biomaterials* 19: 2101-2127 (1998).

**Chang CH, Lin FH, Lin CC, Chou CH, Liu HC.** Cartilage tissue engineering on the surface of a novel gelatin-calcium-phosphate biphasic scaffold in a double-chamber bioreactor. *J Biomed Mat Res Part B, Appl Biomater* 71B: 313-321 (2004).

**Chen FS, Frenkel SR, Di Cesare PE.** Repair of articular cartilage defects: part I. Basic Science of cartilage healing. *Am J Orthop* Jan;28(1):31-33 (1999).

**Freed LE, Hollander AP, Martin I, Barry JR, Langer R, Vunjak-Novakovic G.** Chondrogenesis in a cell-polymer-bioreactor system. *Exp. Cell Res*; 240: 58-65 (1998).

**Frenkel SR, Di Cesare PE.** Degradation and repair of articular cartilage. *Front Biosci* 4: D671-685 (1999).

**Gao J, Dennis JE, Solchaga LA, Goldberg VM, Caplan AI.** Repair of osteochondral defect with tissue-engineered two-phase composite material of injectable calcium phosphate and hyaluronan sponge. *Tissue Engineering* 8: 827-837 (2002).

**Gauvin, C., Yousefi A.M., Reignier, J., Huneault, M., DiRaddo, R., Fernandes, J.** Paper submitted to Tissue Engineering (2005).

**Gauvin-1, C., Reignier, J., Yousefi, A.-M., Huneault, M., DiRaddo, R., Fernandes, J.** Canadian Arthritis Network's Conference, Vancouver, November 11-13 (2004).

**Gauvin-2 C, Yousefi AM, DiRaddo RW, Fernandes J.** 13th biannual conference for the Canadian Society of Biomechanics, Halifax, Novo Scotia, August 4-7 (2004).

**Ghivizzani SC, Oligino TJ, Robbins PD, Evans CH.** Cartilage injury and repair. *Phys Med Rehabil Clin N Am* 11(2): 289-307 (2000).

**Gugala Z, Gogolewski S.** In vitro growth and activity of primary chondrocytes on a resorbable polylactide three-dimensional scaffold. *J Biomed Mater Res* 49: 183-91 (2000).

**Guilak F, Butler DL, Goldstein SA, Mooney DJ.** "Functional tissue engineering", Springer, New York (2003).

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

**Huatan H, Collett JH, Attwood D, Booth C.** Preparation and characterization of poly(epsilon-caprolactone) polymer blends for the delivery of proteins. *Biomaterials* 16: 1297-1303 (1995).

**Hutmacher DW.** Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 21: 2529-2543 (2000).

**Imhof H, Sulzbacher I, Grampp S, Czerny C, Youssefzadeh S, Kainberger F.** Subchondral bone and cartilage disease: a rediscovered functional unit. *Invest Radiol* 35(10):581-588 (2000).

**Imhof H, Breitensteher M, Kainberger F, Rand T, Trattnig S.** Importance of subchondral bone to articular cartilage in health and disease. *Top Magn Reson Imaging*. 10(3):180-192 (1999).

**Imhof H, Breitensteher M, Kainberger F, Trattnig S.** Degenerative joint disease: cartilage or vascular disease? *Skeletal Radiol* 26(7):398-403 (1997).

**Ishihara K, Fukumoto K, Iwasaki Y, Nakabayashi N.** Modification of polysulfone with phospholipid polymer for improvement of the blood compatibility. Part 1. Surface characterization. *Biomaterials* 20: 1545-1551 (1999).

**Johnson KD, Frierson KE, Keller TS, Cook C, Scheinberg R, Zerwekh J, Meyers L, Sciadini MF.** Porous ceramics as bone graft substitute in long bone defects: a biomechanical, histological, and radiographic analysis. *J Orthop Res* 14: 351-369 (1996).

**Laasanen MS, Töyräs J, Korhonen RK, Rieppo J, Saarakkala S, Nieminen MT, Hirvonen J, Jurvelin JS.** Biomechanical properties of knee articular cartilage. *Biorheology* 40: 133-140 (2003).

**Landers R, Hübner U, Schmelzeisen R, Mülhaupt R.** Rapid prototyping of scaffolds derived from thermoreversible hydrogels and tailored for applications in tissue engineering. *Biomaterials* 23: 4437-4447 (2002).

**Lewandrowski KU, Muller J, Schollmeier G.** Concomitant meniscal and articular cartilage lesions in the femorotibial joint. *Am J Sports Med* 25(4):486-494 (1997).

**Mainil-Varlet P, Rieser F, Grogan S, Mueller W, Saager C, Jakob RP.** Articular cartilage repair using a tissue-engineered cartilage-like implant: an animal study. *OsteoArthritis and Cartilage* 9: suppl. A, S6-S15 (2001).

**Marra KG, Szem JW, Kumta PN, Dimilla PA, Weiss L.** In vitro analysis of biodegradable polymer blend/hydroxyapatite composites for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Material Research* 47: 324-335 (1999).

**Mizuta H, Kudo S, Nakamura E, Otsuka Y, Takagi K, Hiraki Y.** Active proliferation of mesenchymal cells prior to the chondrogenic repair response in rabbit full-thickness defects of articular cartilage. *Osteoarthritis and Cartilage* 12: 586-596 (2004).

**Mow VC, Kuei SC, Lai WM, and Armstrong CG.** Biphasic creep and stress relaxation of articular cartilage in compression? Theory and experiments. *J. Biomech. Eng* 102: 73-84 (1980).

**Mow VC, Ratcliffe A, 2nd ed., Mow VC and Hayes WC (Eds).** "Basic Orthopaedic Biomechanics", Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, chap. 4 (1997).

**Petersen JP, Ruecker A, Von Stechow D, Adamietz P, Poertner R, Rueger JM, Meenen NM.** *European Journal of Trauma* 1: 1-10 (2003).

**Quinn TM, Dierickx P, Grodzinsky AJ.** Glycosaminoglycan network geometry may contribute to anisotropic hydraulic permeability in cartilage under compression. *Journal of Biomechanics* 34: 1483-1490 (2001).

**Reignier J, Huneault M.** *Proceedings of the International Symposium on Advanced Biomaterials 2005*, Montréal avril 2005.

**Rho JY, Ashman RB, Turner CH.** Young's modulus of trabecular and cortical bone material: ultrasonic and microtensile measurements. *Journal of Biomechanics* 26(2): 111-119 (1993).

**Sachlos E, Czernuszka JT.** Making tissue engineering scaffolds work. Review: the application of solid freeform fabrication technology to the production of tissue engineering scaffolds. *European Cells and Materials* 5: 29-40 (2003).

**Schek RM, Taboas JM, Segvich SJ, Hollister SJ, Krebsbach PH.** Engineered osteochondral grafts using biphasic composite solid free-form fabricated scaffolds. *Tissue Engineering* 10 (9/10): 1376-1385 (2004).

**Setton LA, Elliott DM, Mow VC.** Altered mechanics of cartilage with osteoarthritis: human osteoarthritis and an experimental model of joint degeneration. *Osteoarthritis Cartilage* 7(1):2-14 (1999).

**Sherwood JK, Riley SL, Palazzolo R, Brown SC, Monkhouse DC, Coates M, Griffith LG, Landeen LK, Ratcliffe A.** A three-dimensional osteochondral composite scaffold for articular cartilage repair. *Biomaterials* 23(24): 4739-4751 (2002).

**Temenoff JS, Mikos AG.** Review: tissue engineering for regeneration of articular cartilage. *Biomaterials* 21: 431-440 (2000).

**Tibesku CO, Szuwart T, Kleffner TO, Schlegel PM, Jahn UR, Van Aken H, Fuchs S.** Hyaline cartilage degenerates after autologous osteochondral transplantation. *J. Orthopaedic Research* 22(6):1210-1214 (2004).

**Wang X, Grogan SP, Rieser F, Winkelmann V, Maquet V, La Berge M, Mainil-Varlet P.** Tissue engineering of biphasic cartilage constructs using various biodegradable scaffolds : an in vitro study. *Biomaterials* 25: 3681-3688 (2004).

**Wang C, Stewart RJ, Kopecek J.** Hybrid hydrogels assembled from synthetic polymers and coiled-coil protein domains. *Nature* : 397-417 (1999).

**Wilson CG, Bonassar LJ, Kohles S.** Modeling the dynamic composition of engineered cartilage. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 408: 246-254 (2002).

**Woodfield T.** “*Cartilage Tissue Engineering: instructing cell-based tissue repair through scaffold design*”, PhD Thesis, University of Twente (2004).

**Yousefi A, Gauvin C, Debergue P, DiRaddo R, Fernandes J.** *SPE ANTEC Technical Papers*, Chicago, May 17-19 (2004).

## REFERENCES ÉLECTRONIQUES

Tous les sites suivants ont été consultés à diverses reprises durant la période s'étendant de Septembre 2004 à Juillet 2005.

1. <http://www.focus-on-genes.de/fr/11.htm>
2. [www1.imperial.ac.uk/.../divisions/is/tissue/](http://www1.imperial.ac.uk/.../divisions/is/tissue/)
3. <http://www.fmed.ulaval.ca/loex/explicationconcept.html>
4. <http://www.climoilou.qc.ca/>
5. [http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te02/studies/studies\\_e.html](http://www.frontier.kyoto-u.ac.jp/te02/studies/studies_e.html)
6. <http://geo.hmg.inpg.fr/loret/postes-mdv.pdf>
7. [myweb.uiowa.edu/aksalem/tissueeng.htm](http://myweb.uiowa.edu/aksalem/tissueeng.htm)
8. <http://geo.hmg.inpg.fr/>
9. <http://12.31.13.50/library/healthguide/enus/support/topic.asp?hwid=tp109>  
[26](#)
10. [www.coe.neu.edu/.../BERL\\_research\\_tissueeng.html](http://www.coe.neu.edu/.../BERL_research_tissueeng.html)
11. [www.cptc.ctc.edu/](http://www.cptc.ctc.edu/)
12. <http://12.31.13.50/library/healthguide/enus/support/topic.asp?hwid=tp109>  
[26](#)
13. [www.healthpages.org](http://www.healthpages.org)
14. <http://www.reseauproteus.net>

15. <http://www.37c.com.cn/education/courseware/physiology1/free/images/Skeletal/Histology/Articular%2520Cartilageh.jpg&imgrefurl=http://www.37c.com.cn/education/courseware/physiology1/free/assistant/skeletal/Histology/Synovial/Synovial01.asp&h=241&w=320&sz=40&tbnid=7ZtR5O035w4J:&tbnh=85&tbnw=113&hl=fr&start=83&prev=/images%3Fq%3Dcartilage%2B%26start%3D80%26hl%3Dfr%26lr%3D%26sa%3DN>
16. <http://zubrinus.com>
17. [www.orthoteers.co.uk/](http://www.orthoteers.co.uk/)
18. <http://www.genou.com/arthrose/arthrose.htm>
19. <http://www.genou.com/arthrose/arthrose.htm>
20. [http://www.jri-oh.com/Knee\\_Articular.htm](http://www.jri-oh.com/Knee_Articular.htm)
21. <http://www.turkcadcam.net/rapor/otoinsa/tek-harc-yigma-sivayarak.html>
22. [www.imi.cnrc-nrc.ca](http://www.imi.cnrc-nrc.ca)
23. <http://www.math.fu-berlin.de>
24. <http://www.cheng.cam.ac.uk/research/themes/three.html>



