

KATIA BILODEAU

**CONCEPTION ET VALIDATION D'UN  
BIORÉACTEUR SPÉCIFIQUE À LA  
RÉGÉNÉRATION DU TISSU ARTÉRIEL SOUS  
CONTRAINTES MÉCANIQUES**

Mémoire présenté  
à la Faculté des études supérieures de l'Université Laval  
dans le cadre du programme de maîtrise en génie de la métallurgie  
pour l'obtention du grade de Maître ès Sciences (M.Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES ET DE GÉNIE  
UNIVERSITÉ LAVAL  
QUÉBEC

NOVEMBRE 2004

## Résumé

En raison des problèmes inhérents aux biomatériaux et à la transplantation d'organes, tels que la durée de vie, le rejet et la disponibilité, l'ingénierie tissulaire est désormais envisagée à plus long terme comme solution de remplacement des organes défaillants. Cette approche vise à induire et structurer la croissance tissulaire afin d'organiser les cellules en tissus et ces tissus en organes. Pour ce faire, un bioréacteur reproduisant les conditions intracorporelles est indispensable.

Au cours de ce projet de maîtrise, un bioréacteur à perfusion spécifique à la régénération des artères a été conçu pour favoriser la croissance de ce tissu et étudier l'effet des diverses contraintes mécaniques (tension axiale, élongation axiale, pression interne, débit, cisaillement) sur ses propriétés mécaniques finales. La conception du bioréacteur a été effectuée suivant une méthodologie rigoureuse comprenant l'identification des besoins, la rédaction du cahier des charges, la modélisation assistée par ordinateur, la réalisation du prototype et la validation. Ce bioréacteur sera par la suite utilisé par le laboratoire pour le développement d'un substitut artériel ayant les propriétés et la structures d'une artère native.

## **Abstract**

Tissue engineering provides a new approach for overcoming the current problem of organ shortage and biomaterial failure. Three-dimensional tissues, such as arteries, are much more difficult to regenerate than bi-dimensional ones. In this context, a specific bioreactor is required in order to reproduce and maintain the appropriate environment required for 3-D tissue regeneration.

During this project, a perfusion bioreactor specific for arterial tissue was designed to stimulate growth and study the effects of mechanical factors such as axial stress, axial strain, internal pressure, flow and shear stress, on final construct properties. The design was realized following a step-by-step methodology: identification of the needs, listing of the specifications, computer assisted modeling and design, and prototype realisation and validation. This bioreactor will be used by the laboratory for the development of an arterial substitute with similar properties and structure of a native artery.

## Avant-Propos

La recherche en bioingénierie est particulièrement multidisciplinaire. J'ai eu la chance de bénéficier de l'expertise de plusieurs personnes sans qui la réalisation d'un tel projet aurait été impossible. J'aimerais donc profiter de cette occasion pour remercier :

- Diego Mantovani, mon directeur de recherche et le co-auteur des articles de ce mémoire, pour m'avoir donné l'occasion de réaliser ce projet, pour son dynamisme et pour ses conseils culinaires;
- Sébastien Blanchet, pour ses connaissances incroyables en mécanique, son imagination débordante, sa passion pour son travail, ses « craqués ben tight » et surtout pour avoir donné forme au bioréacteur;
- Richard Janvier, pour le partage de ses connaissances sur la culture cellulaire et le plexiglass et pour son aide dans l'élaboration du cahier des charges;
- Stéphanie Coulombe, pour ses conseils sur la culture cellulaire et la stérilisation;
- Stéphane Turgeon, pour ses divers conseils dans une variété de domaines;
- Jean Ruel, pour son aide en modélisation et son point de vue critique;
- Frédéric Couet, pour son implication durant son stage d'été dans l'évaluation des contraintes dans la paroi artérielle à l'aide des éléments finis et sa section à ce sujet dans l'article *Design of a Perfusion Bioreactor Specific to the Regeneration of Vascular Tissues under Mechanical Stresses*;
- Francesca Boccafoschi, pour sa partie sur la mécanotransduction dans l'article *Design of a Perfusion Bioreactor Specific to the Regeneration of Vascular Tissues under Mechanical Stresses*;
- Marie-Anne Lavoie, pour son aide avec le logiciel d'éléments finis Ansys et pour les cafés du troisième étage;

- Louis Gauthier, pour son expertise avec le logiciel Pro/Engineer;
- Jason Habermehl, pour la correction de l'anglais et pour la reprise du flambeau;
- le CRSNG et le CERPIC, pour leur soutien financier tout au long de ma maîtrise;
- Mes collègues du bureau 0788, plus particulièrement Annie, Nick, Karim, Valérie, FO, Étienne et Julie, pour l'ambiance incroyable;
- Alpha, le poisson du bureau, pour m'avoir tenu compagnie pendant mes nuits à l'université;
- Félix Lapointe, pour avoir sauvé Alpha d'une mort certaine et pour son support;
- Geneviève Toussaint, pour avoir perpétué la tradition des cafés, mais au premier étage, ceci étant définitivement moins fatigant;
- Ma mère, Ginette Fortin, pour m'avoir transmis sa passion de la création;
- Mon père, Paul Bilodeau, pour m'avoir aidé dans les premières idées de conception et aussi pour m'avoir transmis son côté rationnel et sa détermination;
- Et finalement mes amis, l'équipe du Laboratoire de Bioingénierie et Biomatériaux et tous les autres qui m'ont côtoyé au cours de ma maîtrise.

Merci pour votre soutien, merci d'avoir mis votre touche dans ce projet, merci en somme d'avoir été là pendant cette partie de ma vie.

# Table des matières

<b>Résumé .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract .....</b>	<b>ii</b>
<b>Avant-Propos .....</b>	<b>iii</b>
<b>Table des matières .....</b>	<b>v</b>
<b>Liste des tableaux .....</b>	<b>viii</b>
<b>Liste des figures .....</b>	<b>ix</b>
<b>Introduction .....</b>	<b>1</b>
0.1. Problématique .....	2
0.2. Objectif du projet .....	4
0.3. Structure du mémoire.....	5
0.4. Références .....	7
<b>Chapitre 1   L'ingénierie tissulaire : à quand des pièces de rechange                  aussi bonnes que celles d'origine? .....</b>	<b>8</b>
1.1. Résumé .....	9
1.2. Introduction .....	10
1.3. Qu'est-ce que l'ingénierie tissulaire ?.....	10
1.4. Les bioréacteurs à perfusion .....	11
1.5. Qu'est-ce qui a été fait jusqu'à maintenant ?.....	12
1.6. Que nous réserve l'avenir ?.....	13
1.7. Conclusion .....	14
1.8. Bibliographie.....	15

<b>Chapitre 2</b>	<b>Bioreactors for Tissue Engineering: Focus on Mechanical Constraints. A Comparative Review. ....</b>	<b>16</b>
2.1.	Résumé.....	17
2.2.	Abstract.....	18
2.3.	Introduction.....	18
2.4.	Bioreactors.....	19
2.5.	Applications of bioreactors.....	22
2.5.1.	<i>Cartilage</i> .....	22
2.5.2.	<i>Cardiac tissue</i> .....	24
2.5.3.	<i>Blood vessels</i> .....	27
2.5.4.	<i>Heart valves</i> .....	29
2.5.5.	<i>Hepatic cells</i> .....	31
2.6.	Conclusion.....	32
2.7.	References.....	34
<b>Chapitre 3</b>	<b>Design of a Perfusion Bioreactor Specific to the Regeneration of Vascular Tissues under Mechanical Stresses .....</b>	<b>39</b>
3.1.	Résumé.....	40
3.2.	Abstract.....	41
3.3.	Introduction.....	41
3.4.	Strategy.....	44
3.4.1.	<i>Mechanotransduction</i> .....	45
3.4.2.	<i>Modeling of the stresses in the arterial wall</i> .....	48
3.5.	Bioreactor Design.....	53
3.5.1.	<i>Requirements and specifications</i> .....	53
3.5.2.	<i>Modeling</i> .....	54
3.5.3.	<i>Prototype</i> .....	57
3.6.	Conclusion.....	60
3.7.	Acknowledgments.....	61
3.8.	References.....	62

<b>Chapitre 4</b>	<b>Processus de conception détaillé.....</b>	<b>68</b>
4.1.	Nécessité de la méthodologie de conception .....	69
4.2.	Identification des besoins.....	69
4.3.	Spécifications du bioréacteur.....	70
4.3.1.	<i>Dimensions</i> .....	70
4.3.2.	<i>Matériaux</i> .....	71
4.3.3.	<i>Débit</i> .....	72
4.3.4.	<i>Rotation</i> .....	73
4.3.5.	<i>Contraintes mécaniques</i> .....	74
4.4.	Spécifications du système à perfusion .....	75
4.4.1.	<i>Dimensions</i> .....	76
4.4.2.	<i>Pompe</i> .....	76
4.4.3.	<i>Oxygénation</i> .....	77
4.5.	Modélisation et prototype .....	77
4.6.	Précisions sur la validation .....	77
4.7.	Références .....	82
<b>Conclusion.....</b>	<b>.....</b>	<b>83</b>
	Développements futurs .....	85
	Quelques considérations éthiques.....	86
<b>Annexe A</b>	<b>Plans supplémentaires du bioréacteur.....</b>	<b>87</b>
A.1.	Bioréacteur complet .....	88
A.2.	Partie rotative .....	90



## Liste des tableaux

<b>Table 2.1</b> : Bioreactor applications for cartilage culture.....	22
<b>Table 2.2</b> : Bioreactor applications for cardiac tissue culture.....	25
<b>Table 2.3</b> : Bioreactor applications for vascular tissue culture .....	27
<b>Table 2.4</b> : Bioreactor applications for heart tissue culture .....	30
<b>Table 2.5</b> : Comparison of bioreactors used for different tissue cultures (advantages and <i>disadvantages</i> ) .....	32
<b>Table 3.1</b> : Three-layered arterial structure .....	42
<b>Table 3.2</b> : Mechanical conditions and suited results .....	45
<b>Table 3.3</b> : Summary of main <i>in vitro</i> findings on mechanical stress regulation of vascular cells functions.....	48
<b>Table 3.3</b> : Listing of bioreactor parts and supplier .....	59
<b>Tableau 4.1</b> : Résumé des tests de compatibilité avec des cellules .....	80

# Liste des figures

<b>Figure 1.1:</b> Principe de croissance sur une structure d'échafaudage .....	11
<b>Figure 1.2 :</b> Principe de fonctionnement d'un bioréacteur .....	12
<b>Figure 2.1 :</b> Simplified perfusion system.....	20
<b>Figure 2.2:</b> Example of a rotating bioreactor.....	21
<b>Figure 2.3:</b> Example of a non-rotating bioreactor .....	21
<b>Figure 3.1 :</b> Axisymmetric elements producing a two layer arterial model .....	49
<b>Figure 3.2 :</b> Pressure profile applied on artery model .....	51
<b>Figure 3.3 :</b> Radial stress distribution in the artery.....	52
<b>Figure 3.4 :</b> Circumferential stress distribution in the artery.....	52
<b>Figure 3.5 :</b> Isometric view of the bioreactor .....	54
<b>Figure 3.6 :</b> Section of the bioreactor (front view) .....	55
<b>Figure 3.7 :</b> Prototype of the bioreactor (isometric view) .....	58
<b>Figure 3.8 :</b> Prototype of the bioreactor (front view).....	59
<b>Figure 3.9:</b> Diameter variation measurement with the Lasermike .....	60
<b>Figure 4.1 :</b> Système à perfusion à double circulation.....	76
<b>Figure 4.2 :</b> Soufflet recouvert.....	78
<b>Figure A.1 :</b> Vue isométrique du bioréacteur complet .....	88
<b>Figure A.2 :</b> Vue en coupe du bioréacteur complet .....	89
<b>Figure A.3 :</b> Vues combinées de la partie rotative.....	91
<b>Figure A.4 :</b> Vue de face de la partie rotative.....	92
<b>Figure A.5 :</b> Vue de dessus de la partie rotative .....	93
<b>Figure A.6 :</b> Vue de côté de la partie rotative.....	94

## **Introduction**



## 0.1. Problématique

Actuellement, la perte ou le dysfonctionnement d'un organe ou de tissus est l'un des problèmes de santé les plus fréquents, dommageables et coûteux pour la société d'aujourd'hui [1]. Ce problème est d'autant plus important qu'il n'y a présentement aucune solution optimale face au nombre croissant de cas à traiter, malgré l'avancement des connaissances en biologie, en science et en ingénierie.

Les domaines des biomatériaux, d'une part, et de la transplantation d'organes, d'autre part, connaissent ainsi une période de croissance et de popularité, notamment en raison de l'augmentation de l'espérance de vie, du vieillissement de la population et de la volonté collective d'améliorer la qualité de vie des patients [2]. Par contre, ces deux approches, destinées à pallier aux défaillances des organes, ne sont pas infaillibles.

La première approche énoncée, les biomatériaux, correspond aux matériaux employés dans le but de traiter ou de remplacer des tissus humains défectueux pour une période de temps. Ces matériaux englobent entre autres des plastiques, des silicones, des céramiques, des métaux et des composites [3]. La complication majeure associée aux biomatériaux est leur durée de vie est presque toujours inférieure à l'espérance de vie du patient [1]. Ceci est premièrement causé par l'usure des matériaux employés, aucun matériau synthétique n'ayant une durée de vie infinie. Cette dernière est limitée notamment par l'absence de potentiel de régénération propre aux matériaux vivants. Une autre cause majeure est le fait qu'une biocompatibilité parfaite, soit une interaction parfaite du matériau non vivant avec les cellules vivantes [4], n'a pas encore été obtenue [5]. De plus, la qualité de vie du patient est souvent diminuée par la prise permanente d'anticoagulants et par le besoin de subir plus d'une opération en raison du problème de durée de vie exposé ci-dessus. Ceci est particulièrement le cas des enfants et adolescents en pleine croissance, les biomatériaux ne pouvant s'adapter aux modifications évolutives de leur corps [1].

La seconde approche, la transplantation d'organes, consiste en un transfert de cellules, d'un tissu ou d'un organe d'un point à un autre d'un même individu (autogreffe) ou d'un individu à un autre (allogreffe). Dans ce dernier cas, il peut être question de greffe entre deux

individus d'une même espèce, mais génétiquement différents (allogreffe), ou de deux espèces différentes (xéno greffe) [4]. Le problème majeur de la transplantation est la pénurie d'organes humains. Cette pénurie est causée par le faible nombre de donneurs. En effet, par année, il y a environ 275 donneurs vivants et 420 donneurs cadavériques au Canada, ce qui ne suffit pas pour combler la demande croissante dont il sera question ci-dessous. Le nombre de donneurs cadavériques est très limité puisqu'à peine deux pour cent de tous les décès répondent aux critères de la mort cérébrale avant l'arrêt du cœur [6]. C'est ainsi qu'en 2000, 147 personnes sont décédées faute d'organes implantables disponibles au Canada [6] et 50 au Québec [7]. Au Québec, ces patients étaient principalement en attente d'une greffe de reins (23 cas), de foie (13 cas) et de cœur (3 cas) [7].

De plus, le nombre de personnes en attente augmente continuellement, compte tenu notamment du vieillissement de la population et de l'exigence d'une meilleure qualité de vie. Il est d'ailleurs passé de 1830 en 1981 à près de 3700 en 2000 au Canada [6]. Au Québec, de 1995 à 2003, il est passé de 514 à 860, une augmentation de 67%. Pour la même période, le nombre de greffes est passé de 382 à 488, une augmentation de seulement 28% [7]. Il est évident que l'écart entre la demande et la disponibilité des organes ne cesse de s'accroître. Il en résulte que le temps d'attente moyen a une nette tendance à la hausse.

Au-delà de la pénurie d'organes, il y a également un problème au niveau du taux de réussite des greffes. En effet, depuis 1981, seulement 12 083 transplantations ont réussi sur 21 451 [6]. De plus, la qualité de vie des patients est aussi diminuée par la prise chronique d'immunosuppresseurs [8].

Finalement, la transplantation, provenant souvent de cadavres, entraîne l'impossibilité évidente de prévoir le moment de l'intervention [7]. Il n'est donc pas possible de traiter les patients au moment idéal selon leur état [8]. Ce problème pourrait être pallié par la xéno transplantation, soit la greffe de cellules animales chez l'humain, mais ceci occasionne entre autres des risques au niveau épidémiologique [9].

De nouvelles approches sont donc aujourd'hui envisagées afin de proposer des solutions de remplacement à plus long terme pour les organes humains défaillants, dont l'ingénierie

tissulaire. Cette approche vise à échafauder, induire, guider et structurer la croissance cellulaire afin d'organiser les cellules en tissus complexes et, éventuellement, ces tissus en organes fonctionnels. Ses principes sont présentés plus en détails dans le chapitre 1.

La raison d'être de l'ingénierie tissulaire est qu'elle pourrait, idéalement, régler la quasi totalité des problèmes inhérents aux deux méthodes ci-dessus. En ce sens, elle contribuerait à éliminer la pénurie d'organes en permettant une disponibilité quasiment infinie de tissus pour les greffes. Également, des tissus humains seraient abondamment disponibles pour faire des recherches, comme des recherches pharmaceutiques, ce qui pallierait au manque de dons de corps humains à la science [10]. Une hausse majeure de la qualité de vie des patients serait aussi possible puisque les tissus greffés feraient partie intégrante du corps. Ainsi, les tissus pourraient évoluer avec le patient, ce qui est particulièrement souhaitable dans le cas d'un enfant en pleine croissance. Aussi, la réaction immunitaire serait mieux contrôlée et même éliminée, surtout dans le cas où les cellules régénérées proviendraient du patient. De plus, considérant que les patients pourraient être traités avant que leur état ne soit critique, les interventions auraient potentiellement un meilleur taux de réussite [10].

Finalement, l'ingénierie tissulaire permettrait une diminution des coûts pour la société. Par exemple, un patient dialysé pendant cinq ans coûte environ 250 000 dollars [11]. Pour la même période, un patient greffé d'un rein coûte 50 000 dollars [11]. Il est logique de penser que l'ingénierie tissulaire abaisserait encore plus ces coûts.

## **0.2. Objectif du projet**

L'objectif de ce projet de maîtrise était de développer un bioréacteur à perfusion polyvalent pour étudier l'effet, durant la phase de régénération des artères, des diverses contraintes mécaniques auxquelles elles sont normalement soumises. Un bioréacteur à perfusion se définit comme un bioréacteur dont le milieu de culture est constamment renouvelé pour approvisionner les cellules en nutriments et en oxygène et éliminer les déchets. Il est à noter que, tout au long de ce mémoire, l'emploi du terme « bioréacteur » (ou « bioreactor ») fera référence à « bioréacteur à perfusion » à moins d'une indication contraire.

Le bioréacteur faisant l'objet de ce projet devait reproduire un environnement pseudo-physiologique propice à la régénération vasculaire. Un tel appareil est nécessaire puisque, dans le corps, les cellules sont constamment soumises à des signaux biomécaniques, bioélectriques et biochimiques qui conditionnent et influencent leurs activités à court terme et leur devenir à long terme. Si ces signaux ne sont pas adéquats, les cellules se différencient, se désorganisent et, éventuellement, meurent [12]. Les bioréacteurs ont permis à l'ingénierie tissulaire de faire un pas de géant, car c'est seulement depuis leur apparition que des tissus ayant une géométrie tridimensionnelle définie ont pu être régénérés. Les bioréacteurs seront présentés de façon plus détaillée au chapitre 2.

Parmi tous les gradients auxquels sont soumis les tissus, l'emphase a été mise sur les contraintes mécaniques parce qu'il a été montré qu'elles étaient indispensables à l'obtention de tissus tridimensionnels cohésifs et fonctionnels. Ceci sera plus détaillé au chapitre 3.

Ce projet s'inscrit dans un contexte de recherche visant à étudier des stratégies pouvant mener à une solution permanente au problème de défaillance artérielle. Il a nécessité de nombreuses interactions avec des intervenants provenant des mondes de la biologie, de la médecine et de l'ingénierie. La conception du bioréacteur a été faite de façon méthodologique et rationnelle par l'identification des besoins, la rédaction du cahier des charges, la modélisation à l'aide du logiciel Pro/Engineer, le prototypage et la validation de l'assemblage au niveau de sa résistance, de sa fonctionnalité et de son étanchéité.

### **0.3. Structure du mémoire**

Compte tenu de la rédaction par article du présent mémoire, il a semblé opportun d'en expliquer le fil conducteur.

Le premier chapitre est un article publié dans la revue *Médecins du Québec*. Il correspond à une introduction vulgarisée à l'ingénierie tissulaire. Le second chapitre, un article soumis à la revue *Artificial Organs*, est une revue de la littérature sur l'utilisation des bioréacteurs dans la recherche en ingénierie tissulaire, particulièrement pour la culture de cartilage, de valves cardiaques, de tissus cardiaques, de vaisseaux sanguins et d'hépatocytes. Il se veut

une description des principales caractéristiques des bioréacteurs existants, mais aussi une étude de l'influence des contraintes mécaniques pendant la période de culture sur les propriétés des tissus régénérés.

Le troisième chapitre présente le cœur du travail de maîtrise avec un article, aussi soumis à *Artificial Organs*, présentant la conception du bioréacteur dans le cadre de la recherche sur la culture des tissus vasculaires. Le quatrième chapitre y apporte des précisions en présentant en détails la méthodologie employée.

Finalement, la conclusion fait un retour sur le mémoire et le complète avec les limitations du bioréacteur, les développements futurs et quelques considérations éthiques.



## 0.4. Références

1. Office québécois de la langue française. (2002). <http://www.granddictionnaire.com>.
2. Griffith LG and Naughton G. (2002). Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*. **295**(5557):1009-14.
3. Stock UA and Vacanti JP. (2001). Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med*. **52**:443-51.
4. Bone Tissue Engineering Center (BTEC). (2002). *Bone Tissue Engineering*. Carnegie Mellon. [http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone\\_tissue\\_engineering/bone\\_tissue\\_engineering.htm](http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone_tissue_engineering/bone_tissue_engineering.htm).
5. Weiss L. (2002). *Solid Freeform Fabrication of Scaffolds*. Bone Tissue Engineering Center (BTEC), Carnegie Mellon. <http://www.btec.cmu.edu/research/engineering/sff/sff.htm>.
6. Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G and Freed LE. (1999). Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng*. **63**(2):197-205.
7. Arnst C. (2000, July 31). I Can See Clearly Now (Bioengineered corneas could become commonplace). *Business Week*, New York.
8. Morsiani E, Brogli M, Galavotti D, Bellini T, Ricci D, Pazzi P and Puviani AC. (2001). Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial-flow bioreactor. *Artif Organs*. **25**(9):740-8.
9. Jasmund I and Bader A. (2002). Bioreactor developments for tissue engineering applications by the example of the bioartificial liver. *Adv Biochem Eng Biotechnol*. **74**:99-109.
10. Lalan S, Pomerantseva I and Vacanti JP. (2001). Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J Surg*. **25**(11):1458-66.
11. Miller K and Phillips T. (2002). *Patches for a Broken Heart*. Science@NASA. [http://science.nasa.gov/headlines/y2002/14feb\\_heart.htm?friend](http://science.nasa.gov/headlines/y2002/14feb_heart.htm?friend).
12. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS and Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. **282**(5391):1145-7.

# Chapitre 1

## **L'ingénierie tissulaire : à quand des pièces de rechange aussi bonnes que celles d'origine?**



Bilodeau, K. et Mantovani, D., *L'ingénierie tissulaire : à quand des pièces de rechange aussi bonnes que celles d'origine?* Le Médecin du Québec, 2003. **38**(9): p. 107-10.

## **1.1. Résumé**

La recherche en ingénierie tissulaire est grandement motivée par le fait qu'elle apporterait une solution à la défaillance des biomatériaux et à la pénurie d'organes. Elle présente néanmoins des défis de taille que plusieurs chercheurs, dans une variété de domaines, tentent continuellement de surmonter. L'état actuel de l'avancement des recherches laisse présager de grandes innovations dans le traitement des défaillances d'organes.

Cet article présente une introduction à l'ingénierie tissulaire en survolant sa méthodologie, les recherches réalisées jusqu'à maintenant et ce que nous réserve l'avenir. Il a été écrit sous une forme vulgarisée pour un public de médecins omnipraticiens.

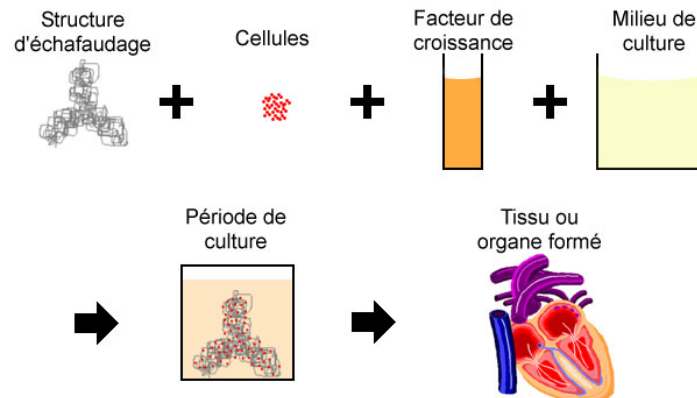
## 1.2. Introduction

Grâce aux récents progrès réalisés en biologie, en médecine et en ingénierie, la possibilité que le corps humain puisse être réparé aussi facilement qu'une automobile ne relève plus du domaine de la science-fiction. Depuis l'émergence de l'ingénierie tissulaire, en 1980, de nombreuses applications, jusqu'alors insoupçonnées, n'ont cessées d'être mises au point. Ce domaine semble tout désigné pour offrir des solutions aux problèmes actuels de pénurie d'organes et de défaillance des biomatériaux. Un jour, il suffira peut-être d'un simple «arrêts aux puits» pour se retrouver avec un organe régénéré tout neuf.

## 1.3. Qu'est-ce que l'ingénierie tissulaire ?

L'ingénierie tissulaire peut se définir comme l'ensemble des techniques et des méthodes s'inspirant des principes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour développer des substituts biologiques pouvant restaurer, maintenir ou améliorer les fonctions des tissus. La recherche dans ce domaine utilise les connaissances de secteurs variés, tels que la culture de cellules, les polymères et les sciences de la vie [1]. Elle nécessite une source abondante de cellules saines qui peuvent être autologues (du même individu), homologues (d'un autre individu de même espèce) ou hétérologues (d'un individu d'une autre espèce). Ces cellules peuvent aussi être jeunes, adultes ou embryonnaires (indifférenciées) [2].

Différentes stratégies peuvent être employées pour faire croître les tissus de façon contrôlée. L'une des premières a été d'encourager la croissance *in vitro* de tissus s'organisant d'eux-mêmes [3]. Les problèmes qui ont surgi portaient surtout sur la cohésion des cellules et sur la forme qui en résultait, les colonies de cellules cultivées étant incapables de s'organiser d'elles-mêmes en tissus ou en organes pouvant être implantés. En fait, les cellules ont besoin de signaux et de guides extérieurs pour former des tissus ou des organes tridimensionnels et fonctionnels [4]. C'est ainsi qu'est née la méthode illustrée à la figure 1.1.



**Figure 1.1:** Principe de croissance sur une structure d'échafaudage

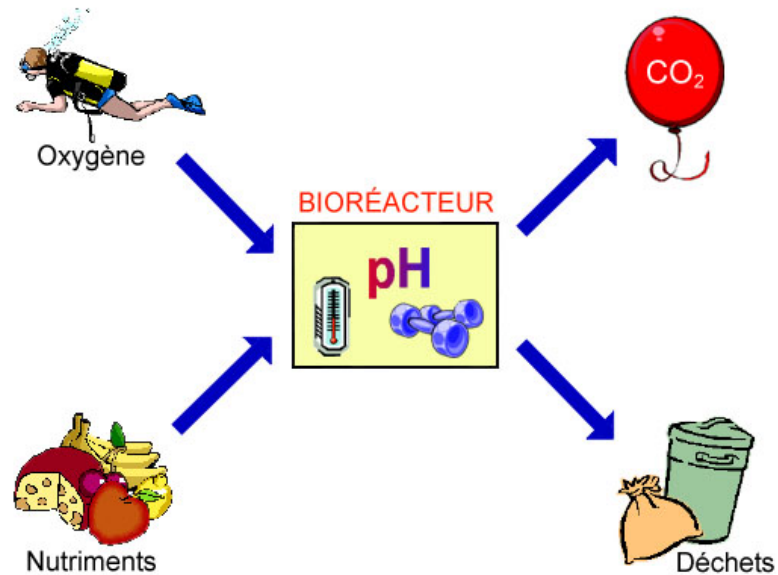
La méthode qui est de plus en plus employée actuellement et qui semble la plus prometteuse est celle de la croissance *in vitro* de cellules sur une structure d'échafaudage biodégradable ayant une structure et une géométrie spécifiques [3]. Elle comporte deux étapes principales. Premièrement, cette structure estensemencée avec des cellules et des facteurs de croissance. Deuxièmement, elle est placée dans un milieu de culture,ensemencé ou non, pendant une période de culture dans un bioréacteur à perfusion (voir section suivante). Par la suite, le tissu résultant peut être implanté [5].

## 1.4. Les bioréacteurs à perfusion

Toutes les recherches menées dans le domaine ont montré la nécessité de construire des bioréacteurs spécifiquement voués à la croissance cellulaire [2]. Leur fonctionnement est schématisé à la figure 1.2.

Un tel appareil est nécessaire parce que, dans l'organisme, les cellules sont constamment sollicitées par des signaux mécaniques, électriques et chimiques, qui leur indiquent comment se comporter. Si ces signaux ne sont pas adéquats, les cellules se différencient, se désorganisent et finissent par mourir [4]. Les bioréacteurs permettent de créer un milieu de culture adéquat qui se rapproche des conditions intracorporelles, ce qui favorise la régénération cellulaire. Ainsi, les cellules sont continuellement approvisionnées en oxygène et en nutriments et débarrassées du gaz carbonique et des déchets. Les paramètres de

culture, tels que le pH, la température et les contraintes mécaniques, sont constamment contrôlés. De plus, ces conditions peuvent être modifiées pour permettre l'étude de leurs influences sur la croissance et sur la qualité des différents types de cellules. Par exemple, il a été découvert que les conditions intracorporelles ne favorisent pas la croissance du cartilage, car la teneur en oxygène y est trop faible [6]. C'est la raison pour laquelle le cartilage se répare mal de lui-même.



**Figure 1.2 :** Principe de fonctionnement d'un bioréacteur

Les bioréacteurs ont permis à l'ingénierie tissulaire de faire un pas de géant, car c'est depuis leur arrivée qu'on a pu cultiver efficacement des tissus en trois dimensions. En effet, l'optimisation de l'alimentation en oxygène et en nutriments, de la température, du pH et des contraintes mécaniques stimule la formation de la matrice extracellulaire et favorise la cohésion cellulaire. Il est ainsi possible de former un tissu organisé ayant une forme spécifique.

### 1.5. Qu'est-ce qui a été fait jusqu'à maintenant ?

Il est connu que la peau régénérée *in vitro* est déjà utilisée pour soigner les grands brûlés. Également, depuis quelque temps, le cartilage est lui aussi disponible commercialement.

Des études cliniques (chez l'humain) sont actuellement en cours au niveau de la cornée, des os, de l'urètre et des cellules pancréatiques [7]. Ces divers tissus ont la particularité d'être peu ou pas vascularisés et n'ont pas besoin de vascularisation pour atteindre une dimension physiologique qui leur permette d'être fonctionnels. Ils sont aussi plus faciles à régénérer en raison de leur géométrie et de leur structure.

Pour la majorité des types de tissus, la recherche dans le domaine en est encore surtout au stade *in vivo* chez les animaux. C'est le cas notamment des vaisseaux sanguins, des muscles, des valves cardiaques, des os, de la trachée, des oreilles, du foie, des reins, du pancréas, de la vessie, des intestins et des glandes salivaires [3]. Les études se rapprochant le plus du stade de l'expérimentation chez l'humain semblent être celles menées sur les vaisseaux sanguins, la vessie et les valves cardiaques.

Par ailleurs, des études *in vitro* sont actuellement en cours sur des organes beaucoup plus complexes, tels que les yeux [3]. Il s'agit d'un défi de taille, si l'on considère la complexité fonctionnelle et la variété structurelle des tissus qui les composent.

Enfin, la culture de cellules dans un bioréacteur ouvre la voie à l'élaboration de nouveaux types d'organes artificiels externes. De nombreuses études actuellement en cours visent la création d'un foie artificiel qui remplirait les fonctions variées et difficilement reproductibles du foie par la culture d'hépatocytes [8,9]. Les bioréacteurs offrent cette possibilité puisqu'ils permettent de meilleures conditions de culture, notamment une plus grande oxygénation. Il est ainsi désormais possible d'atteindre une plus grande densité cellulaire et d'obtenir, par ce moyen, un appareil assurant adéquatement les fonctions hépatiques.

## **1.6. Que nous réserve l'avenir ?**

Actuellement, le plus grand obstacle à la croissance de tissus complexes est la difficulté à les vasculariser. Tant que ce but ne sera pas atteint, la dimension des tissus cultivés sera limitée par la distance maximale de diffusion des nutriments, des gaz et des déchets. Ainsi, la taille maximale des tissus régénérés est actuellement d'environ 3 mm<sup>3</sup> [10]. Il est donc primordial de promouvoir la vascularisation des tissus, par des facteurs de croissance ou

autres, pour imiter davantage le fonctionnement du corps humain. Par exemple, dans le coeur humain, il faudrait reproduire un tissu où toutes les cellules se trouvent à moins de 20 microns de distance d'un vaisseau sanguin [11]. Évidemment, une fois de plus, le défi est de taille, mais une telle réalisation permettrait une meilleure alimentation des tissus en nutriments. Le but ultime de l'ingénierie tissulaire serait de produire des organes avec des vaisseaux sanguins de taille suffisamment grande pour qu'on puisse les suturer à ceux du patient durant l'intervention [2].

Une autre voie d'avenir pour l'ingénierie tissulaire est la culture de cellules souches. La particularité de ces cellules est qu'elles ont la capacité unique de se reproduire en de nombreuses générations et de se différencier en une variété de types de cellules, lorsque les conditions de culture sont adéquates [12]. L'avantage des cellules souches est que leur isolation et leur différenciation fourniraient une source abondante de cellules, ce qui serait particulièrement utile dans le cas des tissus difficiles à prélever. Ainsi, les chercheurs travaillent actuellement sur des méthodes pouvant induire et diriger la différenciation permanente des cellules souches [3]. Pour ce faire, ils ont besoin de bioréacteurs à perfusion, comme ceux dont il est question précédemment, de plus en plus perfectionnés afin d'atteindre des conditions de culture idéales qui varieront selon la différenciation désirée.

## **1.7. Conclusion**

On peut facilement comprendre que, pour la médecine, le potentiel de l'ingénierie et de la régénération tissulaire est incroyable. Ces techniques sont le résultat de l'innovation scientifique, apanage de chercheurs qui ont osé guider la prolifération de la simple cellule pour reconstruire des tissus structurés et pour tenter de les organiser de façon à former des organes fonctionnels. Le chemin sera encore bien long avant de pouvoir recréer toutes les parcelles de la merveilleuse machine qu'est le corps humain, mais il nous est désormais permis d'en rêver et même d'y croire.



## 1.8. Bibliographie

1. Office de la langue française, 2002.
2. Griffith LG, Naughton G. Tissue Engineering : Current Challenges and Expanding Opportunities. *Science* 8 février 2002 ; 295 : 1009-14.
3. Stock UA, Vacanti JP. Tissue Engineering : Current State and Prospects. *Annu Rev Med* 2001 ; 52 : 443-51.
4. Bone Tissue Engineering Center (BTEC), Carnegie Mellon. *Bone Tissue Engineering*, mai 2002. Disponible : URL : [http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone\\_tissue\\_engineering/bone\\_tissue\\_engineering.htm](http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone_tissue_engineering/bone_tissue_engineering.htm).
5. Weiss L. *Solid Freeform Fabrication of Scaffolds*, Bone Tissue Engineering Center (BTEC), Carnegie Mellon, 2002. Disponible : URL : <http://www.btec.cmu.edu/research/engineering/sff/sff.htm>.
6. Obradovic B, et al., Gas Exchange is Essential for Bioreactor Cultivation of Tissue Engineered Cartilage. *Biotechnol Bioeng* 1999 ; 63 : 197-205.
7. Arnst C. I Can See Clearly Now (Bioengineered corneas could become commonplace). *Business Week* New York, 31 juillet 2000.
8. Morsiani E, et al. Long-Term Expression of Highly Differentiated Functions by Isolated Porcine Hepatocytes Perfused in a Radial-Flow Bioreactor. *Artificial Organs* 2001 ; 25 (9) : 740-8.
9. Jasmund I, Bader A. Bioreactor Developments for Tissue Engineering, Applications by the Example of the Bioartificial Liver. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology* 2002 ; 74 : 99-109.
10. Sonal Lalan BA, et al. Tissue Engineering and Its Potential Impact on Surgery. *World J. Surg* 2001 ; 25 : 1458-66.
11. Miller K, Phillips T. Patches for a Broken Heart. *Science@Nasa* 2002. Disponible : URL : <http://science.nasa.gov/headlines>.
12. Thomson JA, et al. Embryonic Stem Cell Lines Derived from Human Blastocysts. *Science* 6 novembre 1998 ; 282 : 1145-7.

## **Chapitre 2**

### **Bioreactors for Tissue Engineering: Focus on Mechanical Constraints. A Comparative Review.**

---

---

Katia Bilodeau et Diego Mantovani

Soumis en novembre 2004 à *Artificial Organs*.

## **2.1. Résumé**

Considérant les techniques actuelles de culture cellulaire, la stimulation de la prolifération cellulaire et la formation de tissus à géométrie bidimensionnelle sont régies par des mécanismes bien connus et régulièrement réalisés en laboratoire. Le tout se complexifie lorsqu'il est question de la formation d'un tissu cohésif tridimensionnel. Dans ce cas, il est indispensable de cultiver les tissus dans un environnement spécifique, reproduisant les conditions de cultures particulières aux tissus cultivés, ce qui est obtenu en utilisant un bioréacteur. Au-delà de l'encouragement de la régénération tissulaire, les bioréacteurs sont utilisés pour l'étude et la compréhension des divers facteurs influençant les propriétés des tissus régénérés. Cette revue présente les divers types de bioréacteurs, les études discutant de leurs applications et une discussion comparative focalisée sur l'influence des contraintes mécaniques pendant la période de culture des tissus.

## 2.2. Abstract

Considering the actual techniques in cell culture, the stimulation of cellular proliferation and the formation of bi-dimensional tissues such as skin are widely performed in laboratories. The process becomes more complex for the formation of a cohesive three-dimensional tissue. In this case, a special environment, which is achieved and maintained in a specific bioreactor, is required. A bioreactor reproduces a pseudo-physiological environment favourable for tissue regeneration and specific to three-dimensional cell culture. Furthermore, bioreactors can be used for studying and understanding the mechanical factors influencing tissue regeneration. This review presents principal types of bioreactors, some of their applications and a comparison of main studies, dealing with the influence of mechanical stresses and strains during the culture period on the final properties of regenerated tissues.

## 2.3. Introduction

Tissue engineering is a new research field in rapid expansion. Its goal is to find a new solution to the current problem of organ shortage and biomaterial failures. In the future, it could allow a more accurate treatment of tissue and organ diseases by reducing graft rejection and therefore increasing the quality of life of all patients. For example, it may provide an efficient solution to the problem of arterial failure which is usually treated by grafting of an inert prosthesis having only a five to ten year life time [1].

Bioreactors have already improved the processing and the final results of skin and cartilage healing, the only two lab-grown products commercially available now days. Some *in vivo* studies are currently in progress in humans to test bioengineered corneas, bones, urethras and pancreatic cells [2]. Upto date, significant results were obtained in laboratory for these applications and their culture led to the growth of functional tissues with suitable dimension.

Most of the regenerated tissues are actually tested *in vivo* in animals (blood vessels, muscles, heart valves, tracheas, ears, livers, kidneys, pancreas, bladders, intestines, salivary

glands, etc. [3]). The experiments the closest at hand to actual human implantation seem to be on blood vessels, bladders and heart valves.

Three major strategies are used to control the regeneration of three-dimensional tissues. The first is the implantation of an acellular matrix to encourage the formation of a new tissue [4]. *In vivo* studies have shown that it is difficult to encourage cell migration into the scaffold, resulting in poor tissue formation [5].

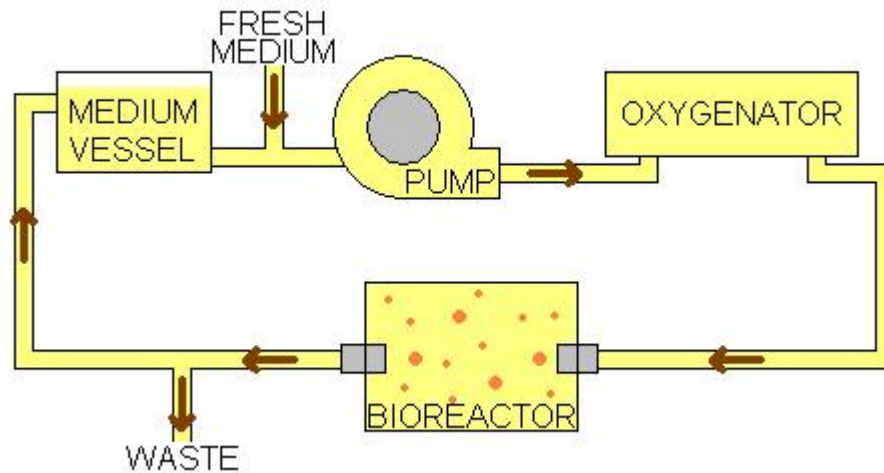
The second is to encourage the self assembly of cells [4]. Although much effort and several studies have been made, no functional tissue has yet been regenerated with this method because of a lack of cohesion between cells, dedifferentiation and an inadequate resulting tissue shape. In fact, external guides and signals, such as mechanical stress and strain, are essential to make cells grow into functional three-dimensional implantable organs [6], and these guides are difficult to apply on non-supported cells.

Finally, the use of a scaffold offers the possibility to tailor the initial properties of the construct and allows an easier application of mechanical conditions on the young and fragile construct at the beginning of the regeneration. This approach consists of seeding one or more kinds of cells on a scaffold (natural or polymeric) configured to the appropriate shape. The construct is then inserted in culture medium, in presence of growth factors, and submitted to specific intracorporeal conditions in a bioreactor to let cells colonize it. Eventually, these scaffolds, if biodegradable, will disappear, thus leading to a highly coherent, totally biological and functional tissue. Already, resulting regenerated tissues have been successfully implanted *in vivo* [3, 4, 7, 8].

## **2.4. Bioreactors**

A bioreactor can be defined as any apparatus that attempts to mimic physiological conditions in order to maintain and encourage tissue regeneration. Culture parameters such as temperature, pH, biochemical gradients and mechanical stresses are permanently controlled. Every culture condition can be modified to study their influence on the growth of different tissues.

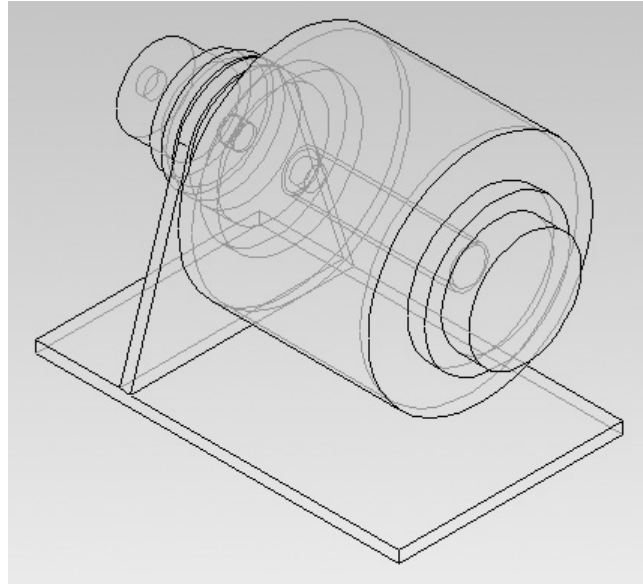
In the case of a perfusion bioreactor, the culture medium has to be continually renewed to supply gas and nutrients to cells and to remove metabolites and catabolites. Thus, the required perfusion system is usually composed of an oxygenator, a pump and a medium culture reservoir as shown in the figure 2.1. All, or a portion, of the culture medium can be recirculated with or without a supply of fresh medium.



**Figure 2.1** : Simplified perfusion system

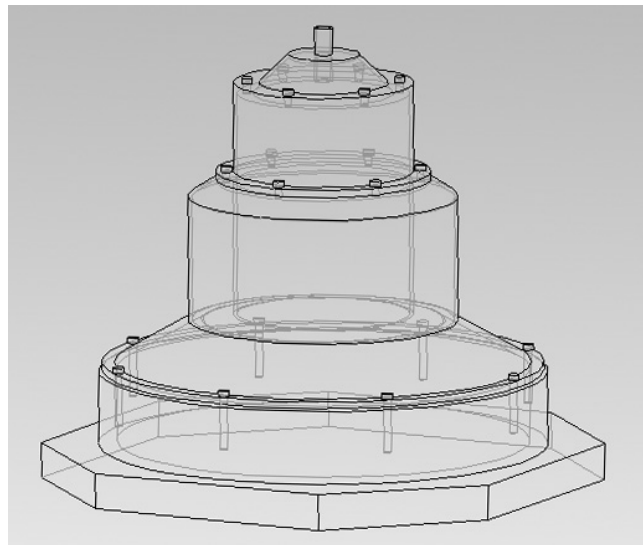
Specific bioreactors are essential for the research in tissue engineering [7]. In the body, cells are always stimulated by mechanical, electrical and chemical signals that influence their behaviour. If these signals are inadequate or non-existent, cells dedifferentiate, become disorganised, and it can lead to cells death [6]. In fact, biological tissues adapt their structure and composition to surrounding specific and functional demands [9]. Putting cells alone or only in contact with materials in culture medium is not enough to obtain a functional tissue. Therefore, bioreactors are particularly crucial for the regeneration of complex three-dimensional tissues.

Current bioreactors can be divided into two main classes, rotating and non-rotating. Rotating bioreactors (figure 2.2) have a culture chamber permanently in rotation. It encourages the uniform growth of the tissues. Also, the rotation speed can be adjusted to produce a free-falling state. This protects fragile tissues because it decreases shear stresses and it avoids contact between cells and the walls of the bioreactor [10].



**Figure 2.2:** Example of a rotating bioreactor

A non-rotating bioreactor has a motionless culture chamber which allows for the culture of complex tissues. Specific mechanical stresses can easily be applied on the cultivated tissues. The perfusion solution can flow through the culture chamber, and eventually through the tissues. An example is shown in figure 2.3. In this case, it is possible to apply shear stresses on cultivated cells from 0.02 to 1 Pa by increasing the pressure in the lower chamber which moves the silicon membrane [11].



**Figure 2.3:** Example of a non-rotating bioreactor

## 2.5. Applications of bioreactors

Even if the works that present the full design methodology used to elaborate the bioreactor are rare, it is possible to review their functions and to compare their specifications. The following are the main applications of bioreactors designed for the growth of cartilage, cardiac tissues, vascular tissues, cardiac valves and hepatic cells. Each section consists of a summary of the characteristics of the tissues and examples of cell culture using bioreactors.

### 2.5.1. Cartilage

Cartilage is a non-vascularized tissue made of chondrocytes and an extracellular matrix (ECM) composed of collagen and glycosaminoglycans (GAG) [12]. Chondrocytes are spherical cells located in little cavities in the ECM [13]. They are responsible for the synthesis and the degradation of this ECM. These cells compose 1% of cartilage volume while water composes 80% of cartilage weight [14]. Because this tissue is not vascularized, chondrocytes extract their nutrients from the synovial fluid.

Cartilage is located on the articular surfaces of bones and also constitutes some parts of the skeleton [13]. It is submitted to various mechanical stresses and strains and is in a quasi anaerobic environment. In these intracorporeal conditions, cartilage does not extensively repair itself, often making cartilage injuries irreparable [14].

The following studies, using rotating and non-rotating bioreactors, show how cartilage growth can be influenced and improved.

**Table 2.1** : Bioreactor applications for cartilage culture

	<b>D. Pazzano <i>et al.</i>, 2000 [15]</b>	<b>B. Obradovic <i>et al.</i>,1999 [16]</b>	<b>K.J. Gooch <i>et al.</i>, 2001 [12]</b>	<b>T. Nishikori <i>et al.</i>, 2002 [17]</b>	<b>L. Freed <i>et al.</i>, 1997 [18]</b>
<b>Cell source</b>	Bovin calf glenohumeral joint surfaces	Fermoropatellar grooves of 2-3 week old bovine calves	Knee joints of 2-4 week old bovine calves	Hip, knee and shoulder joint of 10 week old rabbits	Fermoropatellar grooves of 2-3 week old bovine calves
<b>Scaffold</b>	PGA coated by PLLA	PGA	PGA	Collagen	PGA
<b>Type of the bioreactor</b>	Non-rotating	Rotating	Mixing	Non-rotating	Rotating
<b>Flow</b>	1 $\mu$ m/s through tissues	None	Induced by mixing	None	Perfusion
<b>Mechanical stresses</b>	Induced by flow	Low stresses (free-falling conditions)	Shear stresses induced by mixing	Induced by ultrasound	Quasi inexistent (weightless environment)
<b>Studied parameters</b>	Flow and perfusion	Gas exchanges and replacement frequency of culture medium	Reynolds number	Ultrasounds	Weightless environment



D. Pazzano *et al.* [15] showed that a perfusion flow of 1  $\mu\text{m/s}$  through the cartilaginous tissue is beneficial in regard to its expected properties. The perfused group consisted of more cells and a better quality ECM (cohesion, GAG content) than in the control group. Medium perfusion encourages cellular proliferation by ensuring efficient transport of nutrient, gas, catabolites and metabolites. Therefore, the quality of the ECM was improved because of the mechanical stresses induced by the flow and the better uniformity of the pH. It is also known that an acidic medium inhibits the formation of the ECM [9]. The cellular metabolism causes a pH diminution and a flow minimizes the impact of this reduction. This study confirms the fact that an acidic and anaerobic medium, such as intracorporeal conditions, is detrimental for cartilage regeneration. Thus, it might provide an explanation to why adult cartilage injuries fail to heal efficiently. B. Obradovic *et al.* [16] also demonstrated this healing difficulty of cartilage injuries in an adult body. They particularly showed that cartilage regeneration is more inhibited by anaerobic conditions than by a shortage of nutrients.

K.J. Gooch *et al.* [12] studied the effect of mixing on cartilage regeneration. They found that mixing improves nutrient and waste transport, but also deteriorates the tissues because of an increase in GAG release under the shear stresses induced. On the other hand, mechanical stresses caused by mixing are beneficial to collagen and GAG growth, so it would be interesting to apply mechanical stresses on cartilage without the negative effects of mixing. This was done by the research group of T. Nishikori [17], who were inspired by a previous clinical study showing the benefits of low-intensity pulsed ultrasounds in bone fracture healing [19]. Applying these ultrasounds towards growing cartilage, they found that it didn't modify the number or morphology of chondrocytes, but the produced tissues were more rigid and mature than the control group. These results demonstrated that low dynamical mechanical stresses improve ECM quality. A study by Y.J. Kim corroborated this by showing an improvement of EMC synthesis under pulsed compressions at frequencies from 0.001 to 1 kHz [20]. This is in agreement with an *in vivo* study that studied the benefits of running on young dogs during 25 weeks [21]. Knee cartilage of physically active dogs was more rigid and had a higher GAG concentration than in the

knees of inactive dogs. Thus, young cartilage reacts to dynamical stresses by an augmentation of ECM synthesis.

Considering that mechanical stresses improve ECM mechanical properties, the quasi total lack of stresses is unfavourable. L. Freed *et al.* [18] studied the absence of gravity on cartilage growth and they observed that cell number and activity was similar in the control group on Earth and in the space group, but the control pieces were larger, had a higher rigidity and their ECM were better organized. Thus, mechanical stresses influence more ECM synthesis than cellular proliferation. Also, the pieces grown in space were more spherical than those on Earth because they did not have any preferential direction of growth.

In summary, stressing the cartilage induces mechanical, electrical and physicochemical signals that orientate the synthesis and the degradation of the ECM, so mechanical stresses are essential for the creation of a good quality ECM. Also, a long-term lack of stresses causes a loss of mechanical properties and structure. Thus, mechanical stresses are directly linked to cartilage differentiation [14].

It also has been seen that intracorporeal conditions don't encourage the reparation of cartilage, especially because of the lack of oxygen and the insufficient evacuation of carbonic gas. These conditions cause an acidic environment unfavourable to chondrogenesis. Also, growth and quality of extracellular matrix are increased by low dynamical mechanical stresses. It would be interesting to carry out tests with higher stresses to find at which stress level the damage of the tissues would become more important than the beneficial effects. This would be useful to identify ideal stresses for cartilage growth. These stresses would be specific to chondrocytes, because optimal cell culture conditions are different for each cell type as it will be shown in the next section.

### **2.5.2. Cardiac tissue**

Cardiac tissue is a specialized tissue and, in opposition to striated muscles such as biceps and quadriceps, cardiac muscle is not able to repair itself. This is due to the restricted regeneration potential of cardiomyocytes [22] and the lack of myoblasts in this tissue, a cell type with the capacity to divide and differentiate to form new muscular tissues [23].

Another particularity of heart tissue is its continuous and independent contractions. The nervous system influences the heart only to modify the frequency or the intensity of its beats. Even if the heart is isolated, it will continue to beat at its intrinsic rhythm as long as it is supplied with glucose and oxygen [24].

Studies about the *in vitro* culture of cardiac tissue are more complex, less advanced and rarer than those about cartilage. The effects of culture parameters and their mechanisms are still largely unknown, and the advantage with using bioreactors is the possibility of obtaining a better understanding of various phenomena [25], as it is shown in table 2.2.

**Table 2.2 :** Bioreactor applications for cardiac tissue culture

	<b>R.L. Carrier <i>et al.</i>, 1999 [26]</b>	<b>R.L. Carrier <i>et al.</i>, 2002 [27]</b>	<b>M. Radisic <i>et al.</i>, 2003 [28]</b>	<b>C. Fink <i>et al.</i>, 2000 [29]</b>
<b>Cells source</b>	Cardiac myocytes of young rats and chicks	Cardiac myocytes of neonatal rats	Cardiac myocytes of neonatal rats	Cardiac myocytes of embryonic chicks and neonatal rats
<b>Scaffold</b>	PGA	PGA	Ultrafoam® collagen hemostat	Cell/collagen master mix
<b>Type of the bioreactor</b>	One fixed, one agitated and one rotating	Mixed flask (control) and perfused vessels	Perfused fixed cartridges	Fixed
<b>Flow</b>	Depending on the bioreactor	Mixing or direct perfusion	Direct perfusion through the constructs	None
<b>Mechanical stresses</b>	Depending on the bioreactor	Shear stresses induced by mixing and flow	Shear stresses induced by flow	Strain
<b>Studied parameters</b>	Influence of the cultivation vessel	Effects of perfusion rate and partial pressure of oxygen	Effects of seeding methods (direct perfusion)	Effects of a unidirectional chronic stretch

R.L. Carrier *et al.* [26] found that a rotating bioreactor improves cell quantity, distribution and metabolism compared to fixed or agitated culture vessels. First, gas and nutrient transport approaches more closely intracorporeal conditions than in the other vessels. Also, the free-falling state in the rotating bioreactor is possible thanks to a rotation of 11 to 12 rpm. It allows cell flotation with low shear stresses. This is very useful for the culture of very fragile cardiac tissues [22], especially at the earlier stages of regeneration. Shear stresses as low as 0.1 Pa are sufficient to harm cardiac myocytes. Adequate stresses to encourage growth and differentiation of these cells are around 0.001 Pa, and can only be obtained with a laminar flow [10]. An agitating vessel creates turbulent zones; therefore a rotating bioreactor is more convenient for fragile tissue culture.

In another study, R.L. Carrier *et al.* [27] discovered that a higher partial pressure of oxygen ( $p_{O_2}$ ) helps the differentiation of cardiac tissues. Also, the cultivated constructs under higher  $p_{O_2}$  and/or under direct perfusion had a higher protein and DNA content. Finally, a direct perfusion through tissues causes a better distribution of cells throughout the construct thickness. In this case, there are more cells in the core of the scaffold, in opposition to classic cardiac culture where cells are more localised on the scaffold external layer. This type of perfusion compensates in part for the capillaries absence by providing nutrients and gas through the entire scaffold thickness. But a direct perfusion causes shear stresses in the order of 0.1 Pa which is higher than physiological stresses and, as mentioned before, sufficient to harm this type of cells.

In these two first studies, a cell density of 20 to 25% of native tissues was observed. M. Radisic *et al.* [28] focused their researches on the seeding process and found that a perfused seeding allows for substantially higher cells densities.

To minimise the stresses on constructs, a rotating bioreactor was sent to the orbital station MIR to obtain contractile cardiac pieces [30]. Rotation was not necessary for the suspension state of the cells, but for nutrient and gas transport. Both kinds of flotation, in space and in a rotating bioreactor, encourage cells to agglomerate into tissues and minimises the shear stresses on these tissues [10]. Of course, a permanent free-falling state in a rotating bioreactor is a less expensive solution.

C. Fink *et al.* [29] studied the effects of strain (elongation) instead of shear stresses. Instead being deteriorated, the cardiac tissues responded to a 20% strain by hypertrophy. These tissues had an increase of DNA and protein/cell ratios and an improved organisation of the cells into parallel arrays. Also, the stretched cells were longer and wider and the thickness distribution of cells was more uniform than in the control tissues. This study leads to an understanding of how chronic hypertension can result in heart hypertrophy.

It would be interesting to carry studies on the effect of dynamical strains that would more reproduce the intracorporeal conditions. This was done in the study of arterial tissue

regeneration described in next section. It will be shown there that arterial tissues require significantly different culture conditions than cardiac tissues.

### 2.5.3. Blood vessels

Blood vessels have the role of connecting tissues and organs together. More specifically, arteries transport blood from the heart to the organs [31]. An artery has a three layered structure. The external layer, the adventitia, is made of connective tissue and is responsible for the anchorage of the artery with surrounding tissues and the vascularization and innervation of large diameter arteries (vasa vasorum). Smooth muscle cells and extracellular matrix (collagen, elastin and proteoglycans) constitute the middle layer called the media. The contribution of this layer is the contractile and mechanical properties. Finally, the inner layer, called the intima, consists of a subendothelium which supports a monolayer of endothelial cells, the endothelium. The intima is responsible for the hemocompatibility of the artery [31-33].

Normal blood pressures are around 80 to 120 mmHg (11 to 16 kPa) for most arteries, except for the pulmonary artery that has a pressure between 10 and 25 mmHg (1.3 and 3.3 kPa). Stresses on the arteries are pulsatile because of the pulsation of blood flow [34]. Abnormal pressures are often the cause or the effect of arterial disease.

**Table 2.3 :** Bioreactor applications for vascular tissue culture

	<b>C.B. Weinberg <i>et al.</i>, 1986 [35]</b>	<b>L.E. Niklason <i>et al.</i>, 1999 [36]</b>	<b>L'Heureux <i>et al.</i>, 1998 [37]</b>	<b>S.P. Hoerstrup <i>et al.</i>, 2001 [38]</b>	<b>S.C. Muluk <i>et al.</i>, 1998 [39]</b>
<b>Cells source</b>	Bovine aortic endothelial cells, smooth muscle cells and adventitial fibroblasts	Bovine aortic smooth muscle cells and endothelial cells	Human umbilical vein smooth muscle cells and endothelial cells and human skin fibroblasts	Myofibroblasts and endothelial cells from ovine carotid artery	Intact human saphenous vein and pig internal jugular vein
<b>Scaffold</b>	Collagen and Dacron mesh	PGA	None	PGA coated by P4HB	n/a
<b>Type of the bioreactor</b>	Fixed	Fixed	Fixed	Fixed	Fixed
<b>Flow</b>	None	Perfusion in the lumen	Perfusion in the lumen	Pulsatile perfusion in the lumen	Perfusion in the lumen
<b>Mechanical stresses</b>	None	Pulsatile radial stress	Shear stresses and pressure induced by the flow	Shear stresses and pressure induced by the flow	Axial stretching and twisting
<b>Studied parameters</b>	Collagen concentration and culture time	Effects of dynamical mechanical stresses	No use of a scaffold	Effect of pulsatile flow	Combination of mechanical stresses
<b>Burst strength obtained</b>	<100 mmHg	2000 mmHg	2000 mmHg	300 mmHg	n/a

In their pioneering work published in 1986, C.B. Weinberg *et al.* [35] obtained a well differentiated artery structure by doing separate annular castings supported by a Dacron mesh. The burst strength of the regenerated arteries was around 90 mmHg, which is less than normal systolic blood pressures. Thus, their regenerated vessel would have instantly failed if it had been implanted *in vivo*. In addition, after a one month culture period, burst strength started to decrease significantly, which is in accordance with results seen before, i.e. a dedifferentiation of cells under nonintracorporeal conditions.

A structural difference between Weinberg's vessel and a native artery was the longitudinal orientation of smooth muscle cells rather than circumferentially. A native artery is stiffer in the circumferential direction than in the longitudinal direction [40]. Smooth muscle cells have a preferential growth direction parallel to stresses during the culture period which improves rigidity in this direction. This also explains the low burst strength of their vessel.

Mechanical stresses during the culture period are essential to vascular tissues. Niklason *et al.* [36] seeded a biodegradable scaffold with smooth muscle cells and cultivated it in a bioreactor under a pulsatile radial stress of 165 beats/minute. After eight weeks, the arteries had a thickness twice that of non pulsed controls and their burst strengths were greater than 2000 mmHg instead of 300 mmHg. Therefore, in comparison with Weinberg *et al.*, this study shows that a flow, especially a pulsatile one, improves the growth of vascular tissues.

L'Heureux *et al.* [37] made a cylindrical wrapping of different cellular sheets to reproduce the three layer structure of the artery. First, they wrapped a sheet of smooth muscle cells for the media and, after a maturation period in a bioreactor, they surrounded it with a sheet of fibroblasts for the adventitia. After another period in the bioreactor, they seeded endothelial cells which grew into an endothelium. The artery-like tissue obtained had a burst strength around 2000 mmHg.

S.P. Hoerstrup *et al.* [38] designed and used a pulsed perfusion bioreactor specific to small vessel culture. After a one month culture period, they obtained a 5 mm diameter artery with a burst strength of 326 mmHg, compared to 50 mmHg for static controls. The interesting fact is that after one week, both burst strengths were around 180 mmHg, but with further

culture, the pulsed group improved while the other decreased. This diminution is in agreement with the decrease of mechanical properties under static culture that was previously observed by Weinberg *et al.* [35].

Preceding studies were mostly on the impact of mechanical stresses induced by flow, but D.A. Vorp *et al.* [41] designed an apparatus allowing the study of the combination of axial stretch and twist to reproduce the specific stresses on coronary arteries mostly caused by the beating heart. S.C. Muluk *et al.* [39] used this device to study the early thrombosis phenomenon in autologous saphenous veins implanted for a coronary bypass. They showed that stretching, twisting and submitting a saphenous vein to an arterial flow results in a significant enhancement of tissue factor expression, an important prothrombotic surface molecule, as compared to only pulsatile flow. This is another example of the dedifferentiation of tissues when not subjected to proper intracorporeal conditions.

Thus, optimal culture conditions vary between the different types of vascular tissues. Stresses beneficial to vascular tissues would be harmful to growing cardiac tissue [10] and useless to growing cartilage. The optimal culture conditions are also different for heart valves, the topic of the next section.

#### **2.5.4. Heart valves**

The four heart valves ensure the unidirectionality of the blood flow in the heart [34]. They consist of two or three very thin shutters which open and close in sequence with each heartbeat [42]. Their sealing allows for adequate operation pressures in the heart [24].

The desirable characteristics of a heart valve grown *in vitro* would be a stable geometry with a potential for growth and regeneration within the patient [43]. The shape is usually obtained with a biodegradable scaffold which supports cells before the construct becomes a cohesive tissue. Since the geometry and the structure of heart valves are complex, as well as the mechanical stresses and strains they are submitted to, research on the regeneration and engineering of these tissues is quite undeveloped compared to those in the preceding studies.

**Table 2.4** : Bioreactor applications for heart tissue culture

	<b>G.C. Engelmayr Jr. <i>et al.</i>, 2003 [44]</b>	<b>K. Schenke-Layland <i>et al.</i>, 2003 [45]</b>	<b>S.P. Hoerstrup <i>et al.</i>, 2000 [46]</b>	<b>A. Mol <i>et al.</i>, 2003 [47]</b>
<b>Cells source</b>	n/a	Endothelial cells and myofibroblasts from lamb carotid arteries	Endothelial cells and myofibroblasts from lamb carotid arteries	Human venous myofibroblasts
<b>Scaffold</b>	PGA and PGA/PLLA, both coated with P4HB	Decellularized porcine pulmonary valves	PGA coated with P4HB	PGA coated with P4HB
<b>Type of the bioreactor</b>	Fixed	Fixed	Fixed	Fixed
<b>Flow</b>	None	Pulsatile	Pulsed perfusion through the valve	None
<b>Mechanical stresses</b>	Cyclic flexural stimulation	Dynamical stresses induced by the flow	Dynamical stresses induced by the flow	Increasing cyclic strain
<b>Studied parameters</b>	Effects of cyclic flexure on scaffolds	Repopulation potential of decellularized valves	Effects of pulsed flow vs constant flow	Effects of cyclic strain

G.C. Engelmayr Jr. *et al.* [44] studied stiffness and fatigue behaviour of a biodegradable polymeric scaffold with a bioreactor applying cyclic flexure. Every scaffold showed a decrease of mechanical properties over time in the culture medium, which can be explained by the polymer degradation. The mechanical loss was significantly more important in the dynamic case than in the static control, suggesting that dynamic conditions accelerate the degradation. This bioreactor could eventually be used to isolate flexure effects on the growth of *in vitro* heart valves.

Other potential scaffolds are decellularized heart valves. K. Schenke-Layland *et al.* [45] evaluated their repopulation potential under a pulsatile flow. In 16 days, they obtained a tissue with mechanical and structural properties resembling those of native valves. The particularity of valves cultivated in hydrodynamic conditions was the quasi uniform cell migration from the outside to the inside of the scaffold, which was not observed in static controls, and their improved mechanical properties.

This mechanical improvement was underlined by S.P. Hoerstrup *et al.* [46] who studied the influence of pulsatile blood flow on the properties of heart valves. As in the vascular case, control constructs under static conditions became very fragile and possessed low structural integrity after a few weeks. Thus, mechanical stresses are essential for the differentiation of heart valve tissue. This is in agreement with A. Mol *et al.* [47] who obtained strained constructs showing better organization and mechanical properties than unstrained controls.



Their ultimate tensile strength and Young's modulus were respectively two and three times higher than statically cultured constructs.

Even in a bioreactor, it is impossible to exactly reproduce intracorporeal conditions, so Hoerstrup's pulsed constructs failed to achieve native properties [46]. In fact, after two weeks, the mechanical and structural properties stopped improving, remained constant for a few days, then started decreasing. But when the pulsed valves were implanted *in vivo* in replacement of the pulmonary valve, they operated functionally for 20 weeks and their properties improved during this period.

This *in vivo* test was performed in the low pressure section of the heart (10 to 25 mmHg instead of 80 to 120 mmHg in the high pressure section [34]). Considering that heart failures occur more often in the high pressure section (aortic and mitral valves) [48], regenerated valves have not been submitted to stresses as high as they would normally have to resist, but this study seems very promising.

### **2.5.5. Hepatic cells**

The possibilities of bioreactors are not limited to the perfusion of culture medium for cell regeneration. Some bioreactors employ cells to maintain, clean or improve their culture medium. One example of this application is the artificial external liver.

The liver is a complex organ performing many functions. Most of these are done by hepatocytes. They are responsible of the synthesis of many proteins, the regulation of glucose and lipids, the production of bile and the elimination of alcohol, ammoniac and some drugs. The conception of an artificial liver is quite complex because almost all of these functions are essential [49].

Research is now based on the hypothesis that only hepatocytes can perform all liver functions [50]. The problem with culturing hepatocytes is their rapid dedifferentiation in a static medium [51]. It has been shown that porcine hepatocytes can survive and stay differentiated for a long period in a hollow fiber perfusion bioreactor [50, 51]. Moreover, the improvement of oxygen alimentation allowed for an augmentation of cell concentration

in the culture medium [51]. These studies showed that a clinical application of external liver using hepatocytes is possible.

## 2.6. Conclusion

Since the design of the first bioreactor, tissue engineering has improved immensely. The optimization of oxygen and nutrient supply, temperature, pH, transport of catabolites and metabolites and mechanical stresses stimulates the formation of the extracellular matrix and allows for cohesion between cells. It is now possible to grow tissues with specific geometries. By maintaining pseudo-physiological culture conditions specific to cultivated cells, bioreactors allow for the culture of well differentiated three-dimensional tissues with specific mechanical properties.

From this review, it appears clearly that rotating bioreactors are used more often for the culture of fragile tissues, while non-rotating bioreactors are more adapted to the culture of tissues with a complex geometry that are normally submitted to higher mechanical constraints in the body. Advantages and disadvantages of bioreactor types for different tissue cultures are shown in table 2.5.

**Table 2.5 :** Comparison of bioreactors used for different tissue cultures  
(advantages and *disadvantages*)

Tissues	Non-rotating bioreactors	Rotating bioreactors
<b>Cartilage</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possible application of mechanical stresses</li> <li>• Complex shapes realizable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Adequate exchange of nutrients and gas</li> <li>• <i>Insufficient mechanical stresses</i></li> </ul>
<b>Blood vessels</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Possible application of mechanical stresses and strains</li> <li>• Complex shapes realizable</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Uniform culture</li> <li>• <i>Insufficient mechanical stresses and strains</i></li> </ul>
<b>Cardiac tissues</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Mechanical stresses too substantial</i></li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• A free falling environment protects fragile tissues</li> </ul>
<b>Heart valves</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Complex shapes realizable</li> <li>• Possible application of a flow</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• <i>Insufficient mechanical stresses</i></li> </ul>

Mechanical stresses and strains are essential for the differentiation and the mechanical properties of every kind of tissue, but the magnitude and the type of these stresses and strains are specific to cultivated tissues. For example, important mechanical stresses are

beneficial for cartilage culture, but the same stresses would damage cardiac tissues. Also, pulsatile stresses and strains, such as blood flow induced ones, are favourable during the culture period of blood vessels and heart valves to improve their cohesion and their mechanical properties.

Oxygenation is favourable in every case, especially to increase cellular concentration in a culture medium. This characteristic allows for a high density culture of hepatocytes, which offers the possibility of making artificial livers, an external application of bioreactors.

But bioreactors still have some limitations. Even if they improve the properties of tissues, they don't allow the regeneration of completely native-like tissues. During the culture, there is always a moment when the properties stop improving, remain constant for a short period and begin to decrease. Evolutive culture conditions decrease this phenomenon, but optimal culture conditions have not yet been achieved because it is quasi impossible to reproduce precisely very complex intracorporeal conditions. Thus, dedifferentiation is one of the main obstacles to efficient tissue regeneration.

Another obstacle to complex tissue regeneration, not introduced in this review, is the reproduction of an adequate vascularization. Actually, the culture of normally vascularized tissues is limited because the tissue cannot grow efficiently over the maximal diffusion thickness of nutrients, gas and waste (for example, 20  $\mu\text{m}$  in heart tissues [30]). Thus, the maximal volume of regenerated, normally vascularized, tissues is around 3  $\text{mm}^3$  [52]. It is crucial to achieve tissue vascularization to reproduce more efficiently the human body and allow efficient cell alimentation. Two possible ways to promote vascularization would be to encourage the regeneration of new vessels from existing vessels with growth factors (angiogenesis) or to transplant cells able to differentiate into new vessels [53]. The ultimate goal is to be able to reproduce organs with blood vessels large enough to be connected to human blood vessels.

All studies presented here are very promising, but the road will be very long before we can regenerate every part of this wonderful mechanism that is the human body.

## 2.7. References

1. Guidoin R, Chakfé N, Maurel S, How T, Batt M, Marois M and Gosselin C. (1993). Expanded polytetrafluoroethylene arterial prosthesis in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. *Biomaterials*. **14**:678-93.
2. Arnst C. (2000, July 31). I Can See Clearly Now (Bioengineered corneas could become commonplace). *Business Week*.
3. Stock UA and Vacanti JP. (2001). Tissue engineering: current state and prospects. *Annu Rev Med*. **52**:443-51.
4. Nerem RM. (July 14-15, 2000). *Critical issues in tissue engineering*. Paper presented at the Tissue Engineering: Challenges and Opportunities, York, England.
5. Sodian R, Hoerstrup SP, Sperling JS, Daebritz S, Martin DP, Moran AM, Kim BS, Schoen FJ, Vacanti JP and Mayer JE, Jr. (2000). Early in vivo experience with tissue-engineered trileaflet heart valves. *Circulation*. **102**(19 Suppl 3):III22-9.
6. BoneTissueEngineeringCenter(BTEC). (2002). *Bone Tissue Engineering*. Carnegie Mellon. [http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone\\_tissue\\_engineering/bone\\_tissue\\_engineering.htm](http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone_tissue_engineering/bone_tissue_engineering.htm).
7. Griffith LG and Naughton G. (2002). Tissue engineering--current challenges and expanding opportunities. *Science*. **295**(5557):1009-14.
8. Weiss L. (2002). *Solid Freeform Fabrication of Scaffolds*. Bone Tissue Engineering Center (BTEC), Carnegie Mellon. <http://www.btec.cmu.edu/research/engineering/sff/sff.htm>.
9. Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ and Lee RC. (1988). Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res*. **6**(6):777-92.
10. Begley CM and Kleis SJ. (2000). The fluid dynamic and shear environment in the NASA/JSC rotating-wall perfused-vessel bioreactor. *Biotechnol Bioeng*. **70**(1):32-40.
11. Sodian R, Lemke T, Loebe M, Hoerstrup SP, Potapov EV, Hausmann H, Meyer R and Hetzer R. (2001). New pulsatile bioreactor for fabrication of tissue-engineered patches. *J Biomed Mater Res*. **58**(4):401-5.
12. Gooch KJ, Kwon JH, Blunk T, Langer R, Freed LE and Vunjak-Novakovic G. (2001). Effects of mixing intensity on tissue-engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng*. **72**(4):402-7.

13. Campbell NA and Mathieu R. (1995). *Biologie*. Saint-Laurent, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1190.
14. Buckwalter JA and Mankin HJ. (1998). Articular cartilage: tissue design and chondrocyte-matrix interactions. *Instr Course Lect.* **47**:477-86.
15. Pazzano D, Mercier KA, Moran JM, Fong SS, DiBiasio DD, Rulfs JX, Kohles SS and Bonassar LJ. (2000). Comparison of chondrogenesis in static and perfused bioreactor culture. *Biotechnol Prog.* **16**(5):893-6.
16. Obradovic B, Carrier RL, Vunjak-Novakovic G and Freed LE. (1999). Gas exchange is essential for bioreactor cultivation of tissue engineered cartilage. *Biotechnol Bioeng.* **63**(2):197-205.
17. Nishikori T, Ochi M, Uchio Y, Maniwa S, Kataoka H, Kawasaki K, Katsube K and Kuriwaka M. (2002). Effects of low-intensity pulsed ultrasound on proliferation and chondroitin sulfate synthesis of cultured chondrocytes embedded in Atelocollagen gel. *J Biomed Mater Res.* **59**(2):201-6.
18. Heckman JD, Ryaby JP, McCabe J, Frey JJ and Kilcoyne RF. (1994). Acceleration of tibial fracture-healing by non-invasive, low-intensity pulsed ultrasound. *J Bone Joint Surg Am.* **76**(1):26-34.
19. Kim YJ, Bonassar LJ and Grodzinsky AJ. (1995). The role of cartilage streaming potential, fluid flow and pressure in the stimulation of chondrocyte biosynthesis during dynamic compression. *J Biomech.* **28**(9):1055-66.
20. Kiviranta I, Tammi M, Jurvelin J, Saamanen AM and Helminen HJ. (1988). Moderate running exercise augments glycosaminoglycans and thickness of articular cartilage in the knee joint of young beagle dogs. *J Orthop Res.* **6**(2):188-95.
21. Freed LE, Langer R, Martin I, Pellis NR and Vunjak-Novakovic G. (1997). Tissue engineering of cartilage in space. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**(25):13885-90.
22. Papadaki M, Bursac N, Langer R, Merok J, Vunjak-Novakovic G and Freed LE. (2001). Tissue engineering of functional cardiac muscle: molecular, structural, and electrophysiological studies. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* **280**(1):H168-78.
23. Léger C. (2001). Du muscle dans le coeur. *Science actualités.* **85**. [http://www.cite-sciences.fr/actu/numeros/N85\\_dec00\\_jan1/kiosques/html/une6.html](http://www.cite-sciences.fr/actu/numeros/N85_dec00_jan1/kiosques/html/une6.html).
24. Kimball JW. (1965). *Biology*. Massachusetts, Addison-Wesley Publishing Company Inc., 704.
25. Zimmermann WH, Fink C, Kralisch D, Remmers U, Weil J and Eschenhagen T. (2000). Three-dimensional engineered heart tissue from neonatal rat cardiac myocytes. *Biotechnol Bioeng.* **68**(1):106-14.

26. Carrier RL, Papadaki M, Rupnick M, Schoen FJ, Bursac N, Langer R, Freed LE and Vunjak-Novakovic G. (1999). Cardiac tissue engineering: cell seeding, cultivation parameters, and tissue construct characterization. *Biotechnol Bioeng.* **64**(5):580-9.
27. Carrier RL, Rupnick M, Langer R, Schoen FJ, Freed LE and Vunjak-Novakovic G. (2002). Effects of oxygen on engineered cardiac muscle. *Biotechnol Bioeng.* **78**(6):617-25.
28. Radisic M, Euloth M, Yang L, Langer R, Freed LE and Vunjak-Novakovic G. (2003). High-density seeding of myocyte cells for cardiac tissue engineering. *Biotechnol Bioeng.* **82**(4):403-14.
29. Fink C, Ergun S, Kralisch D, Remmers U, Weil J and Eschenhagen T. (2000). Chronic stretch of engineered heart tissue induces hypertrophy and functional improvement. *Faseb J.* **14**(5):669-79.
30. Miller K and Phillips T. (2002). *Patches for a Broken Heart*. Science@NASA. [http://science.nasa.gov/headlines/y2002/14feb\\_heart.htm?friend](http://science.nasa.gov/headlines/y2002/14feb_heart.htm?friend).
31. Eroschenko VP. (2000). *Di Fiore's Atlas of histology with functional correlations*, 9 ed. Moscow, Lippincott Williams & Wilkins, 363.
32. Niklason LE. (1999). Techview: medical technology. Replacement arteries made to order. *Science.* **286**(5444):1493-4.
33. Leeson TS. (1988). *Text/Atlas of Histology*. Edmonton, W.B. Saunders Company, 745.
34. Silbernagl S and Despopoulos A. (1992). *Atlas de poche de physiologie: atlas commenté de physiologie humaine pour étudiants et praticiens*. Paris, Flammarion, 366.
35. Weinberg CB and Bell E. (1986). A Blood Vessel Model Constructed from Collagen and Cultured Vascular Cells. *Science.* **231**(4736):397-400.
36. Vorp DA, Rajagopal KR, Smolinsk PJ and Borovetz HS. (1994). Identification of elastic properties of homogeneous, orthotropic vascular segments in distension. *J Biomech.* **28**(5):501-12.
37. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R and Langer R. (1999). Functional arteries grown in vitro. *Science.* **284**(5413):489-93.
38. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L and Auger FA. (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J.* **12**(1):47-56.

39. Hoerstrup SP, Zünd G, Sodian R, Schnell AM, Grünenfelder J and Turina MI. (2001). Tissue engineering of small caliber vascular grafts. *Eur J Cardiothorac Surg.* **20**(1):164-9.
40. Vorp DA, Severyn DA, Steed DL and Webster MW. (1996). A device for the application of cyclic twist and extension on perfused vascular segments. *Am J Physiol.* **270**(2 Pt 2):H787-95.
41. Muluk SC, Vorp DA, Severyn DA, Gleixner S, Johnson PC and Webster MW. (1998). Enhancement of tissue factor expression by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics. *J Vasc Surg.* **27**(3):521-7.
42. Bellenir K. (2000). *Heart Diseases and Disorders Sourcebook*, 2 ed. Detroit, Omnigraphics, 612.
43. Schoen FJ and Levy RJ. (1999). Founder's Award, 25th Annual Meeting of the Society for Biomaterials, perspectives. Providence, RI, April 28-May 2, 1999. Tissue heart valves: current challenges and future research perspectives. *J Biomed Mater Res.* **47**(4):439-65.
44. Engelmayer GC, Jr., Hildebrand DK, Sutherland FW, Mayer JE, Jr. and Sacks MS. (2003). A novel bioreactor for the dynamic flexural stimulation of tissue engineered heart valve biomaterials. *Biomaterials.* **24**(14):2523-32.
45. Schenke-Layland K, Opitz F, Gross M, Doring C, Halbhuber KJ, Schirrmeister F, Wahlers T and Stock UA. (2003). Complete dynamic repopulation of decellularized heart valves by application of defined physical signals-an in vitro study. *Cardiovasc Res.* **60**(3):497-509.
46. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ and Mayer JE, Jr. (2000). Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation.* **102**(19 Suppl 3):III44-9.
47. Mol A, Bouten CV, Zund G, Gunter CI, Visjager JF, Turina MI, Baaijens FP and Hoerstrup SP. (2003). The relevance of large strains in functional tissue engineering of heart valves. *Thorac Cardiovasc Surg.* **51**(2):78-83.
48. Rábago G and Cooley DA. (1987). *Heart valve replacement & future trends in cardiac surgery*. Mount Kisco, Futura Publishing Company Inc., 515.
49. Strain AJ and Neuberger JM. (2002). A bioartificial liver--state of the art. *Science.* **295**(5557):1005-9.
50. Morsiani E, Brogli M, Galavotti D, Bellini T, Ricci D, Pazzi P and Puviani AC. (2001). Long-term expression of highly differentiated functions by isolated porcine hepatocytes perfused in a radial-flow bioreactor. *Artif Organs.* **25**(9):740-8.

51. Jasmund I and Bader A. (2002). Bioreactor developments for tissue engineering applications by the example of the bioartificial liver. *Adv Biochem Eng Biotechnol.* **74**:99-109.
52. Lalan S, Pomerantseva I and Vacanti JP. (2001). Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J Surg.* **25**(11):1458-66.
53. Peters MC, Polverini PJ and Mooney DJ. (2002). Engineering vascular networks in porous polymer matrices. *J Biomed Mater Res.* **60**(4):668-78.



## **Chapitre 3**

# **Design of a Perfusion Bioreactor Specific to the Regeneration of Vascular Tissues under Mechanical Stresses**

---

---

Katia Bilodeau, Frédéric Couet, Francesca Boccafoschi et Diego Mantovani

Soumis en novembre 2004 à *Artificial Organs*.

### 3.1. Résumé

L'ingénierie tissulaire présente une nouvelle voie vers une éventuelle solution aux problèmes actuels de pénurie d'organes et de défaillances des biomatériaux. L'un des défis de cette technique est la régénération de tissus organisés à géométrie tridimensionnelle, tels que les artères, qui est plus critique que la régénération des tissus à géométrie bidimensionnelle, telle que la peau qui peut généralement être implantée suite à une culture en feuillet. Pour y parvenir, un bioréacteur spécifique aux cellules cultivées est requis afin de reproduire et maintenir un environnement pseudo-physiologique. Des études précédentes ont souligné l'importance des contraintes mécaniques pendant la culture des tissus vasculaires tridimensionnels. Ici, une analyse par éléments finis a été réalisée afin de modéliser les contraintes appliquées et induites dans la paroi artérielle.

L'objectif du projet était de concevoir et de valider, avec une approche méthodique, un bioréacteur pour stimuler la régénération de tissus artériels tridimensionnels. Ce bioréacteur a été conçu pour la culture de vaisseaux sur une matrice d'échafaudage cylindrique ( $L=5\text{cm}$ ,  $D_{\text{in}}=6\text{mm}$ ). Cette structure est submergée dans un milieu de culture perfusé par deux systèmes séparés, l'un pour l'intérieur (lumière), imitant le débit sanguin, et l'autre pour l'extérieur du vaisseau. La position horizontale du vaisseau et sa rotation sont destinées à uniformiser la croissance de la structure ensemencée et l'étalement des cellules endothéliales. La quasi-totalité des paramètres de culture, notamment le débit interne et l'éirement du vaisseau, sont évolutifs de l'état fœtal à l'état adulte.

Le bioréacteur sera utile pour l'investigation de l'influence des contraintes mécaniques pendant la période de culture sur les propriétés des artères régénérées (rigidité, résistance à l'éclatement, adhésion des cellules endothéliales, etc.). À long terme, le bioréacteur pourra être peaufiné et éventuellement contribuer à la régénération *in vivo* d'une artère fonctionnelle et implantable.

*Il est à noter que le chapitre 4 présentera la méthodologie de conception de façon plus détaillée, alors qu'ici elle est plus condensée pour répondre davantage aux objectifs d'un article.*

### 3.2. Abstract

Tissue engineering provides a new insight to the current problem of organ shortage and biomaterial failures. Three-dimensional organized tissues, such as arteries, are much more difficult to regenerate than two-dimensional ones. In this context, a specific bioreactor is required in order to reproduce and maintain the appropriate environment essential for 3-D cell regeneration. Previous studies have underlined the importance of applying mechanical constraints during 3-D vascular cell culture. In this study, finite element analysis was carried out in order to estimate applied and induced stresses in the arterial wall.

The objective of this work was to design, with a methodological approach, a bioreactor to stimulate the regeneration of 3-D arterial tissues. The bioreactor was designed for the culture of vessels with a cylindrical scaffold. Culture medium in the internal and the external part of the seeded scaffold is perfused at different rates with two independent perfusion systems. The horizontal position and the rotation of the vessel ensure the uniformity of the arterial growth and endothelial cell spreading. Almost all the cell culture parameters, such as the internal flow and the stretching of the vessel, can evolve gradually from the foetal range to adult requirements. The bioreactor will also be useful for investigating the influence of mechanical stresses and strains on the properties of mature arteries (rigidity, burst strength, adhesion of endothelial cells, etc).

### 3.3. Introduction

Arteries have the role of connecting tissues and organs together by transporting blood from the heart to the entire body [1]. Abnormal pressures are often the cause or the effect of arterial diseases, such as thrombosis and aneurysm [2], which account for the implantation of one million arterial prostheses in the world each year [3]. The main complication governing the use of biomaterial prostheses is their duration of implantation. Only 50% of synthetic grafts are still patent after two years [4] and the *in vivo* life duration is up to 5 to 10 years [5], which is significantly inferior to the life expectancy for most of the patients.

These failures mainly occur due to thrombosis or material failure [6]. Generally, this is caused by a compliance mismatch between the native artery and the prosthesis that could be

considered as “inert” [4, 7]. Inert prostheses made of Dacron or Teflon show a Young modulus around 12 MPa [3], while arteries show a Young modulus (under normal blood pressures) around 1 MPa [8]. The maximal elastic elongation can reach almost 300% for arteries [8], while the prosthesis elastic elongation is limited to 10% [9]. This mechanical properties mismatch between arteries and inert prostheses is known to be one of the factors contributing to clinical complications which arise particularly in small blood vessels where blood flow is slower [10].

Although autologous saphenous veins could also be used as arterial grafts, their progressive degradation still remains a problem [11]. Because of this, a new strategy is required to address the problems that arise when treating arterial failure, especially for small diameter arteries, and tissue engineering could represent a valid long-term solution. In the future, it may offer a solution to the current problem of organ shortage and biomaterial failures and allow a more accurate treatment of tissue and organ diseases by limiting graft rejection and by increasing the patient’s quality of life.

In 1986, Weinberg *et al.* [12] reproduced the three-layered arterial structure shown in table 3.1 with separate annular castings with smooth muscle cells and adventitial fibroblasts and a seeding of endothelial cells in the lumen. After a period of static culture, a burst strength of 90 mmHg was obtained, which is less than the normal systolic blood pressure [2]. The main limitations were the lack of adequate mechanical, electrical and chemical signals that results in dedifferentiation, low cohesion and eventually death of cells [13].

**Table 3.1:** Three-layered arterial structure [1, 14, 15]

	<b>Intima</b> (Internal layer)	<b>Media</b> (Middle layer)	<b>Adventitia</b> (External layer)
<b>Main composition</b>	Monolayer of endothelial cells	Smooth muscle cells (SMC) and extracellular matrix (collagen, elastin and proteoglycans)	Connective tissue
<b>Primary function</b>	Hemocompatibility	<b>Contractile and mechanical properties</b>	Innervation, anchorage with surrounding tissues, vascularization (large diameter arteries)

Considering the actual techniques in cell culture, the stimulation of cellular proliferation and the formation of two-dimensional sheet tissues such as skin are widely performed and generally well controlled. Although native skin doesn't have a flat sheet geometry, it can be cultivated as such to obtain an implantable and functional tissue for this application [16]. The process becomes more complex for the formation of organized three-dimensional cohesive tissues, especially for a multiple layer structure like arteries. In this case, a special environment, specific to cultivated cells and tissues [17], is required to encourage cell proliferation and tissue regeneration. This environment can only be achieved and maintained in a bioreactor. Furthermore, bioreactors are useful for studying and understanding the mechanical factors influencing tissue regeneration.

Mechanical stresses during the culture period are beneficial, even essential, to vascular tissues because cells adapt to surrounding functional demands [18]. An improvement in mechanical properties occurs if tissues are submitted to adequate mechanical stimuli. Thus, to regenerate an artery with appropriate mechanical properties, the artery's media has to be cohesive (see table 3.1). For example, Niklason *et al.* [19] seeded a biodegradable scaffold with SMC and cultivated it in a perfusion bioreactor under a pulsatile radial stress of 165 beats/minute. After eight weeks, the arteries had a burst strength greater than 2000 mmHg instead of 300 mmHg for arteries cultivated under static flow. L'Heureux *et al.* [20] also obtained a regenerated artery with a burst strength of 2000 mmHg by separately wrapping sheets of SMC and fibroblasts and seeding endothelial cells in the lumen. The native-like burst strength was achieved thanks to multiple growing periods in a bioreactor after each wrapping or seeding step. Therefore, it is clear that mechanical pseudo-physiological culture conditions are essential to obtain cohesive regenerated tissues. This implies that a flow, in particular a pulsatile one, is required in order to obtain regenerated vascular tissues showing physiological mechanical properties.

In this context, the objective of the project was to design a bioreactor to mechanically stimulate arterial tissues during the regeneration. In addition, the bioreactor will allow for the study of the influence of culture parameters, such as mechanical stress and strain, on the properties of mature arteries (rigidity, burst strength, adhesion of endothelial cells, etc).

From our perspective, bioreactors are too often presented like home-made bench tests, for which assumptions and methodologies for the validation and considerations for the design are omitted. For example, in the scientific literature search engine Medline from 1970 to 2003, there are 153 indexed references containing the keywords “bioreactor” and “tissue engineering”, but only a few focus on or present the bioreactor design. Thus, the objective was not only to design a bioreactor, but also to present the methodology behind this design.

### **3.4. Strategy**

Physiological mechanical constraints present in an artery could be divided into five classes: internal pressure, internal flow, axial strain, axial stress and torsion. Both induced by blood flow, the first two are isolated because the application of an internal pressure without a flow, thus minimizing shear stresses, is possible and vice versa. Their separation allows for the study of their respective effects.

Axial stress and strain represent the constraints applied on an artery section by the artery itself which is in tension. Torsion, generally induced by the beats of the heart, is specific only to coronary arteries. Thus, considering femoral artery conditions, the main goal was to design a multi-task apparatus capable of mimicking various combinations of the first four parameters as shown in table 3.2. Since internal pressure was not isolated yet in an arterial regeneration study, this constraint class is combined here with the flow in the lumen.

**Table 3.2:** Mechanical conditions and suited results

	<b>Flow in the lumen</b>	<b>Axial stress or strain on the seeded scaffold</b>	<b>Suited mechanical properties of the regenerated tissues</b>
<b>a)</b>	None	None	Burst strength inferior to normal systolic pressure as in Weinberg <i>et al.</i> [12]
<b>b)</b>	Continuous	None	Superior than above, but inferior than native arteries as in Niklason <i>et al.</i> [19]
<b>c)</b>	Pulsatile	None	Mechanical properties similar to native arteries as in Niklason <i>et al.</i> [19]
<b>d)</b>	Pulsatile	Constant strain	Cells adapt to surrounding functional demands [18], so a higher rigidity or strength would be expected in the axial direction.
<b>e)</b>	Pulsatile	Pulsatile	The pressure wave in phase with pulsatile flow pressure in arteries [8] could be reproduced to study the impact on mechanical properties. An interesting subject to study would be to evaluate if the pressure wave in the arterial wall would be better approximated by stress or strain.
<b>f)</b>	Continuous	Pulsatile stress equal or higher than stresses induced by the flow	SMC orientation is usually circumferential to provide maximal rigidity in the maximal stress direction [21]. It would be interesting to study the effect of a higher axial stress on the orientation of SMC which would probably be more axial than circumferential, considering that culture conditions can change the structure of regenerated vessels [22].

Even if it could be logic trying to reproduce all gradients constantly applied in the biological environment (concentration, chemical, electric, etc.), in this work we decided to focus only on the mechanical environment. In fact, although mass transport is also important, effects of the complex mechanical environment on the cells, known as mechanotransduction, is essential, and very often neglected.

### **3.4.1. Mechanotransduction**

Ideally, a blood vessel substitute should possess the functional attributes of the native vessel it will replace. To reduce thrombogenicity, an “endothelial-like” lining, responsive to its mechanical environment, in a manner similar to that of the normal vascular endothelium, is required.

If vasoactivity is a requisite, then this lining must also serve as a signal transduction interface, thereby communicating with the underlying smooth muscle cells, which themselves must be of a contractile phenotype, in order to carry out their biomechanical

function resulting in vessel contraction and dilatation. In each of these cases, mechanics plays a key role.

Vascular endothelial cells, which constitute the lumen of all blood vessels, serve as a barrier between perfused tissues and flowing blood. They are believed to act as sensors, detecting local changes in blood flow [23, 24]. In vivo studies indicate that endothelial cells are sensitive to the magnitude of applied shear stresses and respond by changing their morphology and function [23, 25]. In fact, it is already demonstrated that shear stresses induce morphological changes in cell orientation, reflecting the direction of flow in the immediate vicinity of the arterial wall [26, 27].

However, it is not possible to accurately measure hemodynamic forces and monitor all physical and biochemical variables in animals. For this reason, in vitro studies are performed, in which cultured cells are subjected to well-controlled mechanical stresses for various intervals, allowing a better comprehension of the consequences induced by mechanical stress on cells.

In vitro studies, performed with cells cultured under pulsatile flow, show that cells change shape, becoming more elongated, and are also able to discriminate between different types of pulsatile flow environments, changing shape more or less rapidly [28]. Furthermore, changes in actin filament localization have been observed, with actin stress fibers aligned with the direction of flow in high shear regions, while in low shear regions the actin is mostly present in dense peripheral bands [29].

Reorientation of cell axis induced by cyclic stretching is an early response to mechanical forces in vitro. Cell orientation may be defined by the orientation of actin fibers. Reported literature has shown that actin cabling, initially present uniformly throughout the cell body, becomes aligned perpendicular to the stretch direction when submitted to cyclic stretching [30].

Changes in cell shape and orientation and cytoskeletal localization are not the only factors influenced by mechanical stresses. Beyond the structural modifications incurred,



mechanical forces can thus initiate complex signal transduction cascades leading to functional changes within the cell.

Data reported in the literature show that cell-matrix and cell-cell junction molecules are capable of converting mechanical stimuli into biochemical signals [31]. Studies with cultured cells have demonstrated that integrins, membrane proteins involved in cells attachment and inside-out and outside-in signaling [32], play a key role in the activation of intracellular pathways by shear stresses [33]. Others membrane protein receptors are involved as mechanoreceptors, for instance G-proteins [34], tyrosine kinase [35-37] or ion channels [38].

All of these receptors induce the protein synthesis via different complex mechanotransduction intracellular cascades, involving the activation of cytoplasmic second messengers, the phosphorylation of intracellular proteins and finally the transduction of nuclear mRNA (for more detailed review about this subject see [39-42]). mRNA can be up-regulated, down-regulated, or may not be affected at all. Shear stress responsive genes are involved in cell proliferation, cell differentiation, maintenance of vascular tone, thrombosis, cell-matrix and cell-cell adhesion, and modulation of the inflammatory/immune system [43]. Table 3.3 shows the main in vitro findings on mechanical stress regulation of vascular cells functions and behaviour. These findings underline the close interaction between endothelial cells and neighbouring smooth muscle cells and also the relationship between these cells and mechanical stresses.

**Table 3.3:** Summary of main *in vitro* findings on mechanical stress regulation of vascular cells functions

<b>Vascular Cells Function</b>	<b>References</b>
antioxidants	McCormick et al., 2001 [43]; Ohura et al., 2003 [44]
proliferation/differentiation	Passerini et al., 2003 [45]; Davis et al., 2004 [46]; Dimmeler et al., 1999 [47]; Okahara et al., 1998 [48]
vascular tone	Passerini et al., 2003 [45]; Davis et al., 2004 [46]; Lehoux et al., 2003 [42]; Tronc et al., 1996 [49]; Tronc et al., 2000 [50]; Okahara et al., 1998 [48]
ECM/cytoskeleton	McCormick et al., 2001 [43]; Dekker et al., 2002 [51]; Passerini et al., 2003 [45]
immune/inflammation	McCormick et al., 2001 [43]; Ohura et al., 2003; Dekker et al., 2002 [51]
transport system	Passerini et al., 2003 [45]; Dekker et al., 2002 [51]; Ohura et al., 2003 [44]
thrombosis	Okahara et al., 1998 [48]; Dekker et al., 2002 [51]; Ohura et al., 2003 [44]

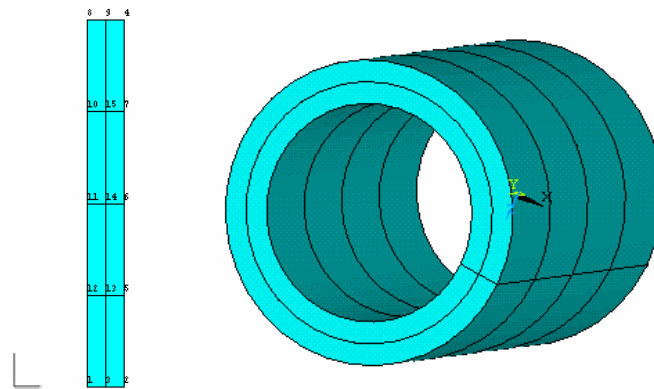
Considering future applications of vascular substitutes, all these evidences are fundamental during *in vitro* speculation, focusing the attention on changes in cells reactions following mechanical stresses. This knowledge, of how mechanical stresses influence cell behaviour function at a fundamental level, fully justifies the importance to consider mechanotransduction phenomena during the growth and the regeneration of cellular tissue. Moreover, it provides the means for designing a bioreactor capable of mimicking the dynamic physiological cell environment.

### **3.4.2. Modeling of the stresses in the arterial wall**

Several studies were carried out in order to investigate and measure mechanical constraints existing in an artery [8,52]. However, any significant conclusion can be outlined, and the variability of human parameters makes difficult to estimate the real value of the mechanical constraints applied to arteries. Therefore, numerical simulation could be successfully used to approximate specific mechanical parameters such as these induced in the arterial wall with significant confidence level.

Finite element analysis was realized in order to model the stresses in the arterial wall, thus to have a better understanding of the magnitude of the constraints that must be applied on the seeded scaffold to reproduce physiological conditions. The problem was mathematically treated with the finite elements software Ansys 6.1 using FLEXlm v 8.0d and dynamically analysed with a time step of 0.02 seconds.

The arterial wall was modelled as being a perfect cylinder 10 mm long with an average radius at rest of 3 mm and a wall thickness of 1 mm. These parameters approach those of the human femoral artery [53]. The arterial wall properties were separated into two regions, the media and the adventitia, with the same thickness but distinct physical properties as shown by Von Maltzahn *et al* [54]. Intima contribution was considered as negligible [54]. The model was made of two-dimensional axisymmetric elements, as done by Mosora *et al.* [52], to generate a two-wall cylindrical geometry (figure 3.1).



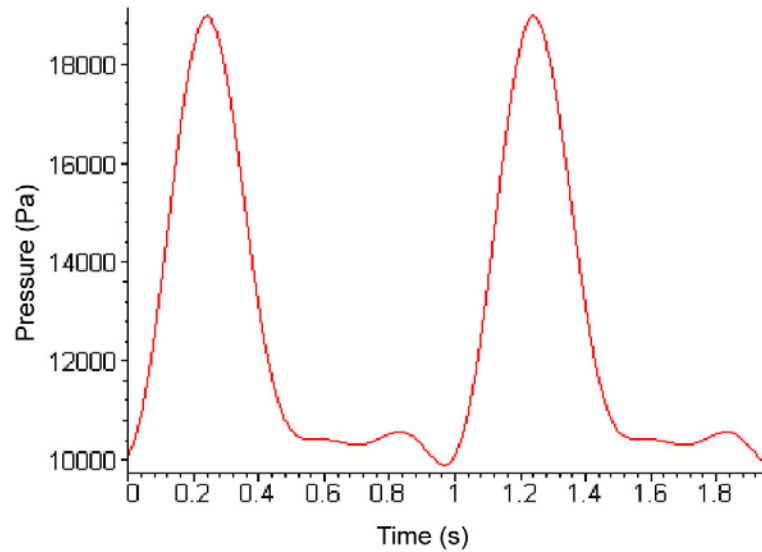
**Figure 3.1 :** Axisymmetric elements producing a two layer arterial model

Starting from this geometry, physical properties were assigned to the model. The arterial wall density was assumed of  $1100 \text{ kg/m}^3$  [53] and considered incompressible [55]. The longitudinal elastic modulus of the media and adventitia was considered similar around 978 kPa [56]. The circumferential elastic modulus of arteries varied from 1300 to 1700 kPa [57] with the media being 3 or 4 times stiffer than the adventitia [58]. Finally, in the radial direction, the artery had an elastic modulus of about 118 kPa, as proposed by Blondel *et al.* [59]. It has to be underlined that in arterial walls, stress-strain relation is nonlinear.

However, for small deformations occurring in physiological conditions, it is acceptable to estimate the elastic modulus as being linear and thus to work with an incremental elastic modulus [60].

First, an analysis was carried out to evaluate the order of magnitude of the shear stress caused by a blood flow of around 200 ml/min in the femoral artery [61]. Simulating a laminar, fully-developed and pulsated flow inside the artery model, shear stresses varying from 0 to 2.48 Pa were calculated using a viscosity of 0.0035 Pa.s and a density of 1050 kg/m<sup>3</sup>, as suggested by Ghalichi [62]. These results are in agreement with estimations of around 10 dynes/cm<sup>2</sup> (1 Pa) made by Fung [63]. Considering that shear stresses are significantly lower than tensile stresses in the arterial wall, they may be neglected in wall stress calculations [64].

The numerical model described below was subjected to the following constraints in order to estimate stresses sustained by arteries under physiological conditions. The arterial wall was longitudinally stretched to approach its natural length as described by Blondel *et al.* [59]. Then, a blood pressure profile varying from 80 mm Hg (diastole) to 140 mm Hg (systole), as in a normal femoral artery, was applied to the numerical model. The pressure profile was approximated using a Fourier series with a frequency of 1 Hz ( $12500+3600\sin(2\pi t)+2160\sin(4\pi t+1.5)+720\sin(6\pi t+3.5)$ , figure 3.2). The pressure existing on the external side of the arterial wall was neglected because it is significantly lower than the internal pressure in the lumen.



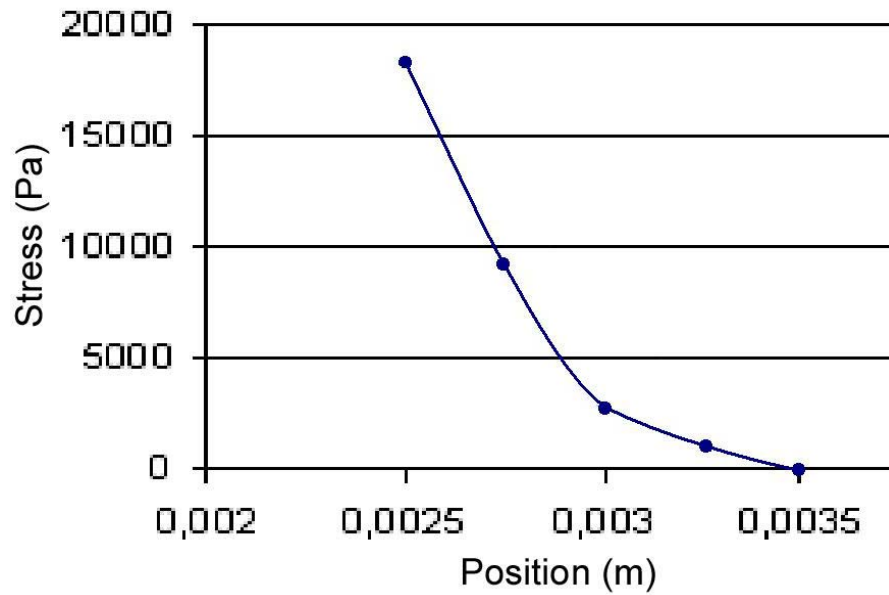
**Figure 3.2 :** Pressure profile applied on artery model

Most dynamic systems present an attenuation phenomenon because of their viscoelasticity. As pressure waves progress through the arteries, they are attenuated, reflected and dispersed. For a frequency of 1 Hz, as in this model, a 4% per centimetre attenuation was applied [65].

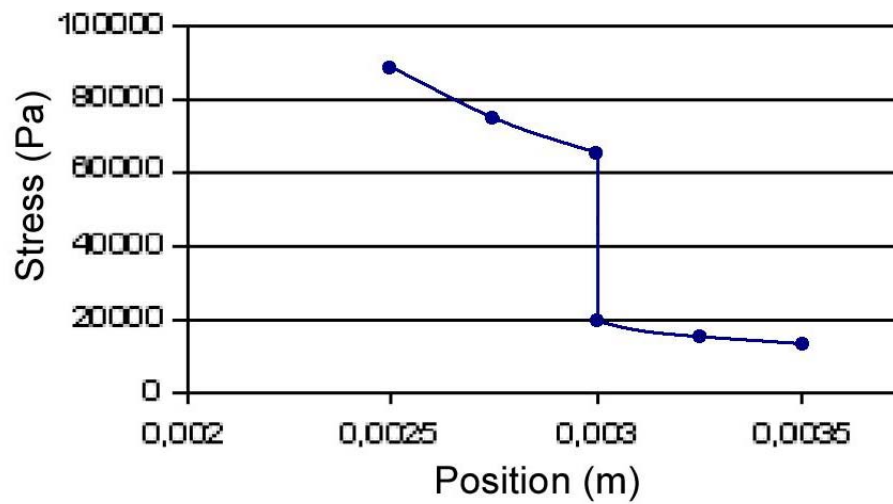
At the end of the numerical analysis, the stress distribution inside the arterial wall was approximated. It appears that, in the radial direction, the maximal stress is around 18 kPa during systole and is located on the internal arterial surface. On the external side of the arterial wall, the level of radial stress tends towards zero. The radial stress distribution is shown in figure 3.3. In the longitudinal direction, the stress level is roughly uniform around 65 kPa. These stresses are in agreement with experimental measurements made by Blondel *et al.* [59] which vary from 46 kPa to 67 kPa.

Furthermore, it is observed that the stress distribution is not uniform in the circumferential direction, because there is a discontinuity at the media-adventitia interface as observed by Xie *et al.* [58]. Numerical results presented in figure 3.4 show that the maximal stress is about 90 kPa near the arterial lumen, which is in agreement with stress distributions described by Burton [8]. Finally, the strongest stresses are obtained in the circumferential

direction inside the media, mostly because of the blood pressure. This is in agreement with the circumferential orientation of the smooth muscle cells that have to resist this stress [21].



**Figure 3.3 :** Radial stress distribution in the artery



**Figure 3.4 :** Circumferential stress distribution in the artery

Physiological mechanical constraints ranges in the femoral artery were evaluated in this section. It provided an order of magnitude of what to apply to growing vessels in the bioreactor in order to minimize tissue dedifferentiation.

### **3.5. Bioreactor Design**

The design was focused on the identification of the requirements of the bioreactor, such as the main growth parameters that cells need to proliferate and to regenerate tissue efficiently. These needs were converted in specifications the model has to respect. The computer-aided design was realized according to these criteria. Then the prototype was built and a general validation was carried out.

#### **3.5.1. Requirements and specifications**

Even if an entirely biological approach is possible for the regeneration of an implantable vessel, as shown by L'Heureux *et al.* [20], a structural support, or scaffold, has the benefit of providing mechanical support to fragile young tissues while allowing cell proliferation and tissue regeneration [66]. Also, some of the mechanical constraints enumerated before cannot be applied directly to cells, especially axial stretching. Thus, the bioreactor was designed for the *in vitro* culture of vessels from seeded scaffolds with femoral artery dimensions as enumerated in the finite elements section (average radius of 3 mm, wall thickness of 1 mm [53]). A 5 cm length was chosen to be sufficient to reproduce physiological movement and to allow an eventual *in vivo* implantation, while minimizing the required quantity of cells.

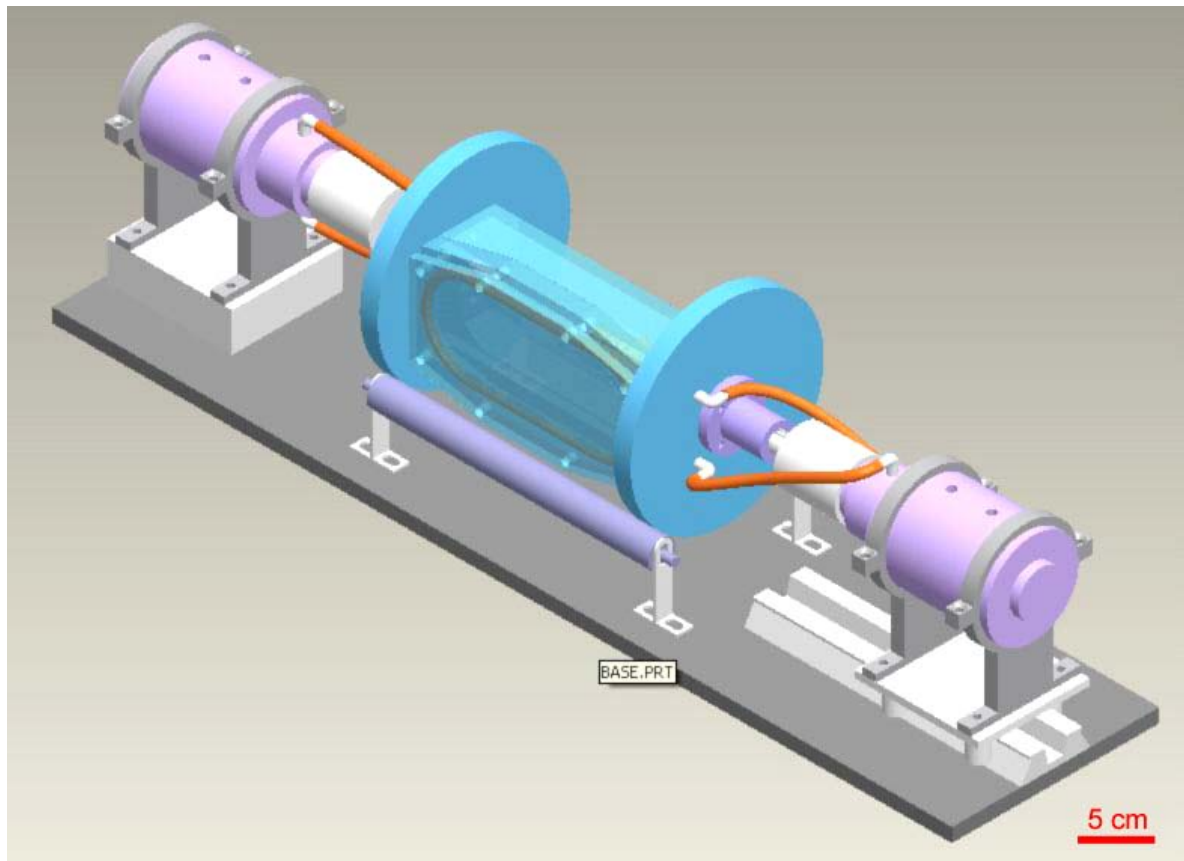
The materials used in the bioreactor fabrication had to be sterilisable and biocompatible. Biocompatibility is a qualitative notion that can be better qualified as “biomaterial performance” [16]. Thus, it can be defined as the materials’ ability to perform appropriately in contact with a living system in a specific application [67]. It is not only qualitative, but it also depends on surrounding tissues. In this case, biocompatibility would be considered as “a material that does not harm vascular cell proliferation and tissue regeneration”.

As mentioned before, the design was focused on the application of native-like mechanical stresses and strains on cultivated tissues by the way of flows, pressures and mechanical

stretching. Normal strains in the axial direction are around 25 to 40 % [65] and corresponding axial stresses are around 65 kPa (see finite element analysis). Normal pressure in the lumen is around 80 to 140 mmHg and induced stresses in the arterial wall are pulsatile because of the pulsation of blood flow [68].

### 3.5.2. Modeling

The following model was designed using Pro/Engineer Wildfire software. The culture chamber in acrylic is shown in blue. FDA compatible polymer parts are in orange, aluminium base in dark grey and stainless steel elements in light grey and mauve. Following sections explain perfusion characteristics, inducible mechanical stresses and strains and evolutive culture parameters.



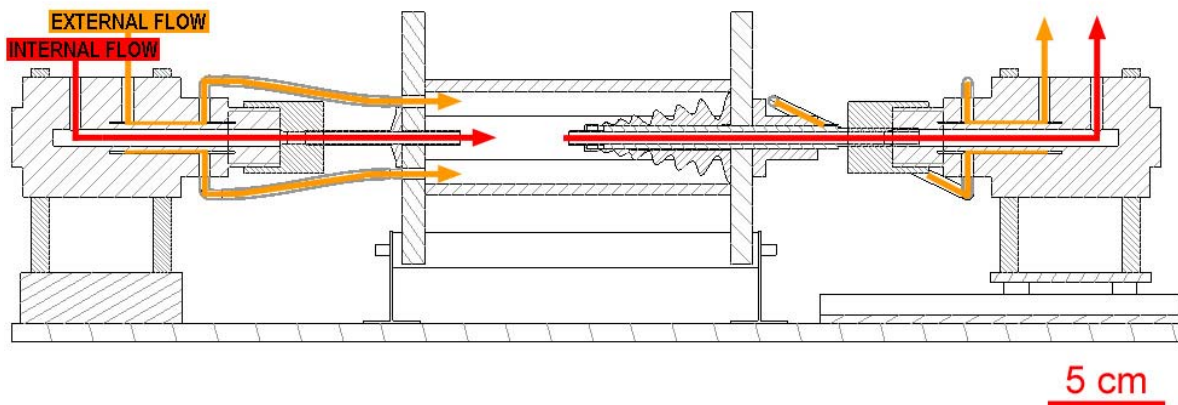
**Figure 3.5 :** Isometric view of the bioreactor



### 3.5.2.1 Perfusion characteristics

The internal and external parts of the seeded scaffold are surrounded by culture medium to feed cultivated cells. Both perfusions are kept separate to avoid contamination between different cell types. Thus, the bioreactor is designed to be a part of a double flow perfusion system maintained at a temperature of 37°C. The pump provides an adjustable flow that can be continuous or pulsatile with a frequency range of 50 to 200 beats/minute to cover the range from foetal to adult cardiac frequencies [2, 69].

The external medium is perfused at a slow and continuous rate to minimise shear stress on the outside of the artery. The perfusion of the internal medium is laminar and pulsatile in order to reproduce the physiological flow. Two double-flow rotary unions (9300 Rotary Union, Stainless steel series, Talco), in mauve in figure 3.5, allow the separation of the perfusions and the rotation of the middle part of the bioreactor (figure 3.6).



**Figure 3.6 :** Section of the bioreactor (front view)

### 3.5.2.2 Mechanical stresses and strains

The bioreactor, while allowing isolation of every type of constraint, was especially designed for the application of various combinations of these constraints. As shown in the finite element analysis, an internal flow induces shear stresses on the internal surface of the

artery. Also, an internal pressure induces tension in the arterial wall, mostly in the circumferential direction. It will be possible to apply an internal pressure without a flow, thereby isolating tension in arterial wall from shear stresses.

The middle part of the bioreactor (in blue in figure 3.5) is rotated by an electric motor at about 1 rpm to decrease the influence of gravity and to encourage uniform growth of the artery and the spreading of endothelial cells [14]. The bellow side rotary union is on an open v-groove track roller guide block, which sits on a rail (Mc-Master Carr), allowing translation of the bellow side tube. This allows for the application of a force (stress) or a displacement (strain) on the scaffold during regeneration. A force could be applied with a variable load pulley device, or an oscillatory or constant strain could be applied with a pneumatic cylinder controlled by a microcontroller.

The bellow side tube glides along a linear ball bearing (in mauve in figure 3.5, #5 in figure 3.8) that allows for linear motion while transmitting axial torque. This element is necessary to avoid any torsion on cultivated vessels that would occur during rotation or with a non-axial displacement. The torsion was removed from culture parameters in order to isolate the influence of axial constraints. The replacement of this bearing by one allowing rotation would permit the application of a torque or a rotation on the scaffold. Torsion was previously studied by Muluk et al. [11, 70] to mimic heart beating effects on coronary arteries.

The effect of the application of other culture parameters could be also studied, such as the application of a low electric current through the seeded scaffold, as experimented in previous studies [71, 72], that would be possible thanks to the stainless steel construction of support tubing.

### **3.5.2.3 Evolutive application of mechanical constraints**

All culture parameters can be modified. Some parameters, such as diameter and presence or absence of torsion, can be easily modified between cultures. The internal flow, the internal pressure, the axial force and the stretching of the vessel can evolve during the culture process. For example, at the beginning of the culture period, the pulsation frequency could

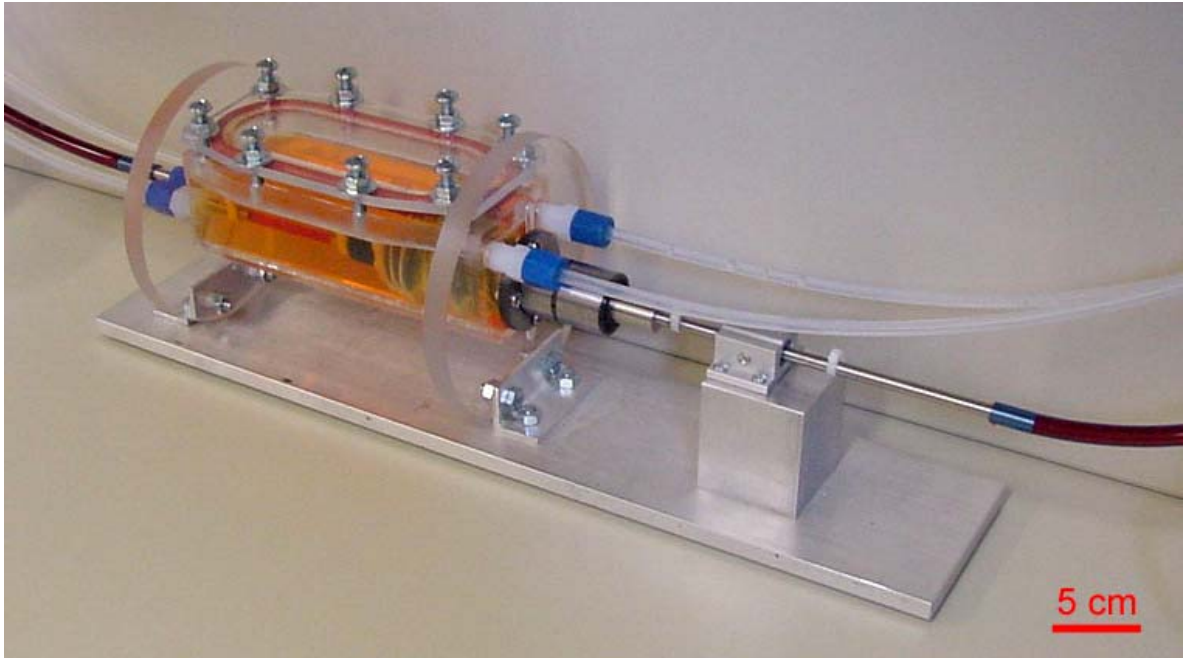
be similar to a foetal cardiac frequency, and the flow rate and the stretching could be in the foetal range. These parameters could gradually progress towards adult requirements during the culture period.

The design process was inspired by the phenomena occurring during the pre-natal development of the foetus in order to reproduce the organogenesis process in the uterus. Niklason *et al.* [19] already regenerated a vessel under flow and pressure in the foetal range. Here, the foetal inspiration was extended to the horizontal position of the vessel and the evolution of the magnitude of axial stretching.

This evolution is crucial because beneficial stresses on a mature tissue can be destructive on a newly seeded scaffold. Also, beneficial stresses at the beginning of the maturation process could be too low or inadequate to have an effect after a few weeks maturation, resulting in a plateau phenomenon: the properties of the tissue stop improving, remain constant for a while and begin to decrease, as observed by S.P. Hoerstrup *et al.* [73] In their case, they observed an increase of mechanical properties after the *in vivo* implantation of their tissues, showing that the plateau phenomenon can be overcome by native conditions.

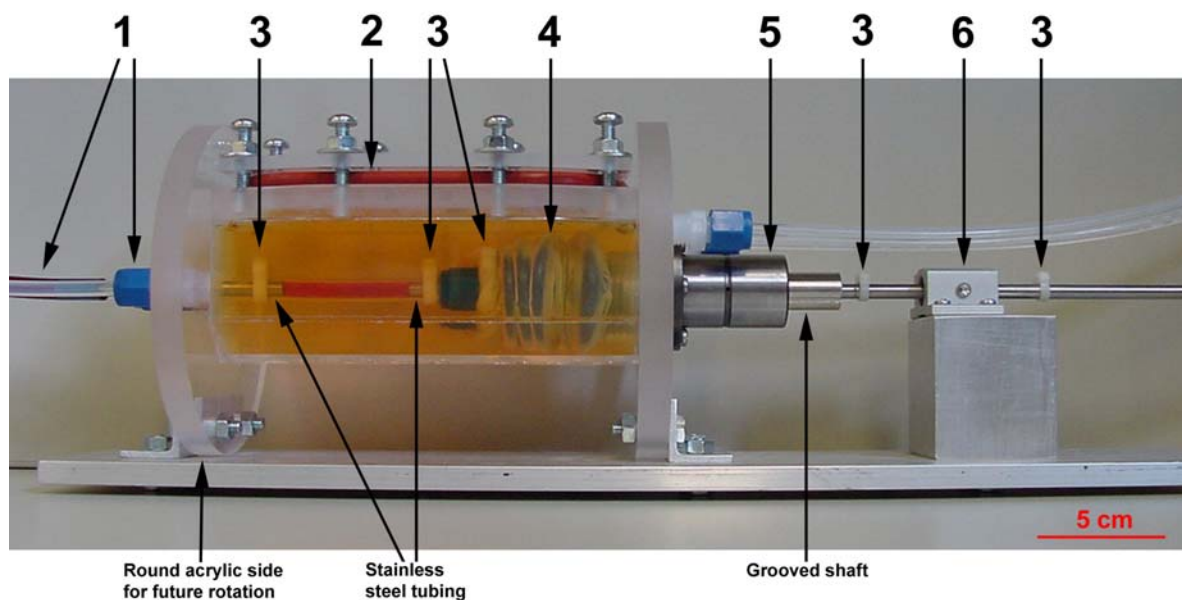
### **3.5.3. Prototype**

The central part of bioreactor was fabricated in order to validate the design and to start the study of the influence of mechanical stresses and strains. Any leakage was observed when the prototype was filled with coloured water (figures 3.7 and 3.8).



**Figure 3.7 :** Prototype of the bioreactor (isometric view)

As described in the modeling section, the bioreactor consists of a culture chamber in which a stainless steel tube can translate thanks to a linear ball bearing (#5, figure 3.8) to apply axial constraints on the construct. The tubing connexions are FDA compatible fittings (#1, figure 3.8) and other parts are sealed by FDA compatible o-rings (#2, figure 3.8).



**Figure 3.8 :** Prototype of the bioreactor (front view)

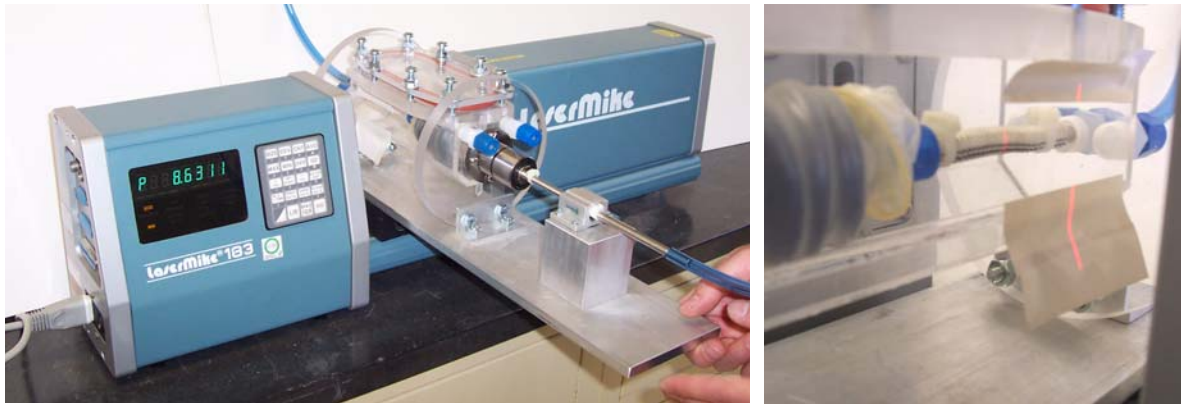
**Table 3.4:** Listing of bioreactor parts and supplier

	<b>Part</b>	<b>Use</b>	<b>Supplier</b>
<b>1</b>	PFA Tube Fittings and tubing	Connexion with perfusion systems and sealing	Swagelok, Quebec FST, Quebec, QC, Canada
<b>2</b>	FDA o-rings	Sealing	Motion Industries, Quebec, QC, Canada
<b>3</b>	Hose clamps	Sealing, fixing the seeding structure, stop blocks for the linear bearing (#6)	Cole-Palmer, Vernon Hills, IL, USA
<b>4</b>	Bellows (recovered by a latex membrane)	Sealing while allowing translation of the stainless steel tube	Mc-Master Carr, Atlanta, GA, USA
<b>5</b>	Flanged ball spline (16mm splined shaft)	Linear motion and torque transmission	ND Linear System, Wood Dale, IL, USA
<b>6</b>	Stainless steel linear bearing (1/4" shaft)	Alignment of the stainless steel tube	Kinecor Inc., Quebec, QC, Canada

The sterilisation potential of various seals was tested. A thin latex membrane was chosen because it resisted to 20 minutes of autoclaving at 121°C. A critical point of the design was the watertight nature of this seal (#4, figure 3.8) because it is directly linked to the culture

chamber sterility and the life duration of the linear bearing (#6, figure 3.8). Tests were made to verify the watertightness of the latex membrane o-ring seal. The seal resisted to a 140 cm water column (13.7 kPa, 103 mmHg) without any trace of leakage. Thus, even if submitted to negligible external pressures, it will be able to support the internal pressure should prosthesis failure occur.

A Dacron prosthesis was installed in the bioreactor to validate the use of a laser interferometer (Lasermike) to observe the real-time evolution of the vessel diameter during the culture period. Diameter variations caused by stretching were observed and measured (figure 3.9).



**Figure 3.9:** Diameter variation measurement with the Lasermike

*In the right figure, the laser ray is clearly visible.  
The tape is required to avoid distortion caused by non-parallel walls.*

### 3.6. Conclusion

A multi-task bioreactor was designed with a rational approach in order to apply various combinations of constraints such as internal flow, internal pressure, axial stress, axial strain and torsion. Physiological stresses present in the arterial wall were approximated using finite element analysis. Focus was addressed on mechanical constraints because cells adapt to surrounding stresses with a resulting increasing in the mechanical properties of the engineered scaffold-based new tissue. Thus, these forces are essential for cell differentiation, tissue cohesion and strength.

In order to ensure the functionality of the young seeded-scaffold, the resistance of the non-seeded scaffold under a pulsatile flow and a continuous and low axial constraint will be tested in the bioreactor. This is essential since cells would not support any constraint because of a lack of extracellular matrix in newly seeded scaffolds.

The rotating components are essential for further engineering of scaffold-based new tissues in order to allow a uniform seeding of an endothelium which is essential for vessel hemocompatibility. Also, further studies focused on tissue engineering will be carried out on the effects of mechanical stresses, during the maturation, on the properties of regenerated arteries (such as rigidity, burst strength and adhesion of endothelial cells) in order to determine the optimal constraints at each stage of maturation.

### **3.7. Acknowledgments**

We would like to acknowledge Richard Janvier and Stéphanie Coulombe for their expertise in cellular regeneration, Sébastien Blanchet and Jean Ruel in mechanics, Marie-Anne Lavoie and Louis Gauthier in modeling and simulation, and Jason Habermehl for English corrections. This work was realized thanks to NSERC (Canada) and FQRNT (Quebec) grants.

### 3.8. References

1. Eroschenko VP. (2000). *Di Fiore's Atlas of histology with functional correlations*, 9 ed. Moscow, Lippincott Williams & Wilkins, 363.
2. Silbernagl S and Despopoulos A. (1992). *Atlas de poche de physiologie: atlas commenté de physiologie humaine pour étudiants et praticiens*. Paris, Flammarion, 366.
3. Szycher M, Siciliano AA and Reed AM. (1991). Polyurethanes in medical devices. *Med Des Mater.* **1**(2):18-25.
4. Chandran KB, Gao D, Han G, Baraniewski H and Corson JD. (1992). Finite-element analysis of arterial anastomoses with vein, Dacron and PTFE grafts. *Med Biol Eng Comput.* **30**(4):413-8.
5. Guidoin R, Chakfé N, Maurel S, How T, Batt M, Marois M and Gosselin C. (1993). Expanded polytetrafluoroethylene arterial prosthesis in humans: histopathological study of 298 surgically excised grafts. *Biomaterials.* **14**:678-93.
6. Peppas NA and Langer R. (1994). New challenges in biomaterials. *Science.* **263**(5154):1715-20.
7. Weston MW, Rhee K and Tarbell JM. (1996). Compliance and diameter mismatch affect the wall shear rate distribution near an end-to-end anastomosis. *J Biomech.* **29**(2):187-98.
8. Burton AC. (1974). *Physiologie et biophysique de la circulation*, 2 ed. Paris, Masson et cie, 249.
9. Bloch B and Hastings GW. (1972). *Plastics materials in surgery*, 2nd ed. Springfield, IL, Thomas, 273.
10. Snyder RW. (2002). Cardiovascular Biomaterials. *Biomaterials Forum.* **24**(2):8-9.
11. Muluk SC, Vorp DA, Severyn DA, Gleixner S, Johnson PC and Webster MW. (1998). Enhancement of tissue factor expression by vein segments exposed to coronary arterial hemodynamics. *J Vasc Surg.* **27**(3):521-7.
12. Niklason LE. (1999). Techview: medical technology. Replacement arteries made to order. *Science.* **286**(5444):1493-4.
13. Leeson TS. (1988). *Text/Atlas of Histology*. Edmonton, W.B. Saunders Company, 745.
14. Weinberg CB and Bell E. (1986). A Blood Vessel Model Constructed from Collagen and Cultured Vascular Cells. *Science.* **231**(4736):397-400.



15. Bone Tissue Engineering Center (BTEC). (2002). *Bone Tissue Engineering*. Carnegie Mellon, [http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone\\_tissue\\_engineering/bone\\_tissue\\_engineering.htm](http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone_tissue_engineering/bone_tissue_engineering.htm).
16. *Handbook of biomaterials evaluation: Scientific, Technical, and Clinical Testing of Implant Materials*. (1999). 2nd ed. Philadelphia, PA, Taylor & Francis, 915.
17. Lalan S, Pomerantseva I and Vacanti JP. (2001). Tissue engineering and its potential impact on surgery. *World J Surg*. **25**(11):1458-66.
18. Gray ML, Pizzanelli AM, Grodzinsky AJ and Lee RC. (1988). Mechanical and physiochemical determinants of the chondrocyte biosynthetic response. *J Orthop Res*. **6**(6):777-92.
19. Niklason LE, Gao J, Abbott WM, Hirschi KK, Houser S, Marini R and Langer R. (1999). Functional arteries grown in vitro. *Science*. **284**(5413):489-93.
20. L'Heureux N, Paquet S, Labbe R, Germain L and Auger FA. (1998). A completely biological tissue-engineered human blood vessel. *Faseb J*. **12**(1):47-56.
21. Vorp DA, Rajagopal KR, Smolinsk PJ and Borovetz HS. (1994). Identification of elastic properties of homogeneous, orthotropic vascular segments in distension. *J Biomech*. **28**(5):501-12.
22. Edelman ER. (1999). Vascular tissue engineering: designer arteries. *Circ Res*. **85**(12):1115-7.
23. Davies PF. (1995). Flow-mediated endothelial mechanotransduction. *Physiol Rev*. **75**(3):519-60.
24. Patrick CW, Jr. and McIntire LV. (1995). Shear stress and cyclic strain modulation of gene expression in vascular endothelial cells. *Blood Purif*. **13**(3-4):112-24.
25. Langille BL and Adamson SL. (1981). Relationship between blood flow direction and endothelial cell orientation at arterial branch sites in rabbits and mice. *Circ Res*. **48**(4):481-8.
26. Nerem RM, Levesque MJ and Cornhill JF. (1981). Vascular endothelial morphology as an indicator of the pattern of blood flow. *J Biomech Eng*. **103**(3):172-6.
27. Levesque MJ, Liepsch D, Moravec S and Nerem RM. (1986). Correlation of endothelial cell shape and wall shear stress in a stenosed dog aorta. *Arteriosclerosis*. **6**(2):220-9.

28. Helmlinger G, Geiger RV, Schreck S and Nerem RM. (1991). Effects of pulsatile flow on cultured vascular endothelial cell morphology. *J Biomech Eng.* **113**(2):123-31.
29. Kim DW, Langille BL, Wong MK and Gotlieb AI. (1989). Patterns of endothelial microfilament distribution in the rabbit aorta in situ. *Circ Res.* **64**(1):21-31.
30. Yoshigi M, Clark EB and Yost HJ. (2003). Quantification of stretch-induced cytoskeletal remodeling in vascular endothelial cells by image processing. *Cytometry.* **55A**(2):109-18.
31. Ingber D. (1998). In search of cellular control: signal transduction in context. *J Cell Biochem Suppl.* **30-31**:232-7.
32. Coppolino MG and Dedhar S. (2000). Bi-directional signal transduction by integrin receptors. *IJBCB.* **32**:171-88.
33. Bhullar IS, Li YS, Miao H, Zandi E, Kim M, Shyy JY and Chien S. (1998). Fluid shear stress activation of I $\kappa$ B kinase is integrin-dependent. *J Biol Chem.* **273**(46):30544-9.
34. Hsieh HJ, Li NQ and Frangos JA. (1992). Shear-induced platelet-derived growth factor gene expression in human endothelial cells. *J Cell Physiol.* **150**:552-8.
35. Hu Y, Wick G and Xy Q. (1998). Activation of PDGF receptor alpha in vascular smooth muscle cells by mechanical stress. *Faseb Journal.* **12**:1135-42.
36. Iwasaki H, Eguchi S, Ueno H, Maruma F and Hirata F. (2000). Mechanical stress stimulates growth of vascular smooth muscle cells via epidermal growth factor receptor. *American Journal of Physiology and Heart Circulation Physiology.* **278**:H521-29.
37. Chen KD, Li YS, Kim M, Li S, Yuan S, Chien S and Shyy JY. (1999). Mechanotransduction in response to shear stress. Roles of receptor tyrosine kinases, integrins, and Shc. *J Biol Chem.* **274**(26):18393-400.
38. Sackin VP. (1995). Stretch-activated ion channels. *Kidney International.* **48**:1134-47.
39. Papadaki M and Eskin SG. (1997). Effects of fluid shear stress on gene regulation of vascular cells. *Biotechnol Prog.* **13**:209-21.
40. Chiquet M. (1999). Regulation of extracellular matrix gene expression by mechanical stress. *Matrix Biology.* **18**:417-26.
41. Chaohong L and Qingbo X. (2000). Mechanical stress-induced signal transduction in vascular smooth muscle cells. *Cellular Signalling.* **12**:435-45.

42. Lehoux S and Tedgui A. (2003). Cellular mechanics and gene expression in blood vessels. *J Biomech.* **36**:631-43.
43. McCormick SM, Eskin SG, McIntire LV, Teng CL, Lu CM, Russell CG and Chittur KK. (2001). DNA microarray reveals changes in gene expression of shear stressed human umbilical vein endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **98**(16):8955-60.
44. Ohura N, Yamamoto K, Ichioka S, Sokabe T, Nakatsuka H, Baba A, Shibata M, Nakatsuka T, Harii K, Wada Y, Kohro T, Kodama T and Ando J. (2003). Global analysis of shear stress-responsive genes in vascular endothelial cells. *J Atheroscler Throm.* **10**:304-13.
45. Passerini AG, Milsted A and Rittgers SE. (2003). Shear stress magnitude and directionality modulate growth factor gene expression in preconditioned vascular endothelial cells. *J Vasc Surg.* **37**(1):182-90.
46. Davis ME, Grumbach IM, Fukai T, Cutchins A and Harrison DG. (2004). Shear stress regulates endothelial nitric-oxide synthase promoter activity through nuclear factor kappaB binding. *J Biol Chem.* **279**(1):163-8.
47. Dimmeler S, Fleming I, Fisslthaler B, Hermann C, Busse R and Zeiher AM. (1999). Activation of nitric oxide synthase in endothelial cells by Akt-dependent phosphorylation. *Nature.* **399**:601-5.
48. Okahara K, Sun B and Kambayashi J. (1998). Upregulation of prostacyclin synthesis-related genes expression by shear stress in vascular endothelial cells. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* **18**:1922-6.
49. Tronc F, Wassef M, Esposito B, Henrion D, Glagov S and Tedgui A. (1996). Role of NO in flow-induced remodelling of the rabbit common carotid artery. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* **16**:1256-62.
50. Tronc F, Mallat Z, Lehoux S, Wassef M, Esposito B and Tedgui A. (2000). Role of matrix metalloproteinases in blood flow-induced arterial enlargement. *Arterioscler Throm Vasc Biol.* **20**:e120-6.
51. Dekker RJ, van Soest S, Fontijn RD, Salamanca S, de Groot OG, vanBavel E, Pannekoek H and Horrevoets AJG. (2002). Prolonged fluid shear stress induces a distinct set of endothelial cell genes, most specifically lung Kruppel-like factor (KLF2). *Blood Purif.* **100**(5):1689-98.
52. Mosora F, Harmant A, Bernard C, Fossion A, Pochet T, Juchmes J and Cescotto S. (1993). Modelling the arterial wall by finite elements. *Arch Int Physiol Biochim Biophys.* **101**(3):185-91.

53. Megerman J and Abbott WM. (1983). Compliance in vascular grafts. In Wright CB (Ed.), *Vascular Grafting: Clinical Applications and Techniques*, John Wright PSG: Boston. p. 344–64.
54. von Maltzahn WW, Warriyar RG and Keitzer WF. (1984). Experimental measurements of elastic properties of media and adventitia of bovine carotid arteries. *J Biomech.* **17**(11):839-47.
55. Hôpital Cardiovasculaire et Pneumologique de Lyon. (2003). *Biomecanique Coeur-Vaisseaux*. Hémodynamique Diagnostique et Thérapeutique, [http://imagerie-cv.univ-lyon1.fr/WEB\\_CARDIO/documents/Documents\\_references/poly-biomeca/biomec.htm](http://imagerie-cv.univ-lyon1.fr/WEB_CARDIO/documents/Documents_references/poly-biomeca/biomec.htm).
56. Tsangaris S and Drikakis D. (1989). Pulsating blood flow in an initially stressed, anisotropic elastic tube: linear approximation of pressure waves. *Med Biol Eng Comput.* **27**(1):82-8.
57. Lee JM and Wilson GJ. (1986). Anisotropic tensile viscoelastic properties of vascular graft materials tested at low strain rates. *Biomaterials.* **7**(6):423-31.
58. Xie J, Zhou J and Fung YC. (1995). Bending of blood vessel wall: stress-strain laws of the intima-media and adventitial layers. *J Biomech Eng.* **117**(1):136-45.
59. Blondel WCPM, Lehalle B, Maurice G, Wang X and Stoltz JF. (2000). Rheological properties of fresh and cryopreserved human arteries tested in vitro. *Rheol Acta.* **39**:461-8.
60. Hayashi K, Stergiopoulos N, Meister J-J, Greenwald SE and Rachev A. (2001). Techniques in the Determination of the Mechanical Properties and Constitutive Laws of Arterial Walls. In Leondes CT (Ed.), *Cardiovascular Techniques (Biomechanical Systems: Techniques and Applications)*, CRC Press LLC: Boca Raton. p. 1-61.
61. Hussain ST, Smith RE, Wood RF and Bland M. (1996). Observer variability in volumetric blood flow measurements in leg arteries using duplex ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* **22**(3):287-91.
62. Ghalichi F. (1998). *Pulsatile laminar and turbulent blood flow simulation in large stenosed arteries and stenosed carotid artery bifurcation*. Ph.D., Université Laval, Sainte-Foy, Québec.
63. Fung YC. (1990). *Biomechanics: motion, flow, stress, and growth*. New York, Springer-Verlag, 569.
64. Manak JJ. (1980). The two-dimensional in vitro passive stress-strain elasticity relationships for the steer thoracic aorta blood vessel tissue. *J Biomech.* **13**(8):637-46.

65. Li J. (2000). *The Arterial Circulation: Physical Principles and Clinical Applications*. New Jersey, Humana Press, 275.
66. Ratcliffe A. (2000). Tissue engineering of vascular grafts. *Matrix Biol.* **19**(4):353-7.
67. von Recum AF and LaBerge M. (1995). Educational goals for biomaterials science and engineering: prospective view. *J Appl Biomater.* **6**(2):137-44.
68. Redmond EM, Cahill PA and Sitzmann JV. (1998). Flow-mediated regulation of G-protein expression in cocultured vascular smooth muscle and endothelial cells. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* **18**(1):75-83.
69. Campbell NA and Mathieu R. (1995). *Biologie*. Saint-Laurent, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1190.
70. Vorp DA, Severyn DA, Steed DL and Webster MW. (1996). A device for the application of cyclic twist and extension on perfused vascular segments. *Am J Physiol.* **270**(2 Pt 2):H787-95.
71. Potvliege PR and Bourgain RH. (1977). Thrombosis induced in vivo in the mesenteric artery of normal and thrombocytopenic rats, an electron-microscopic study of the early arterial wall reaction. *Br J Exp Pathol.* **58**(6):670-7.
72. Carmeliet P, Moons L, Stassen JM, De Mol M, Bouche A, van den Oord JJ, Kockx M and Collen D. (1997). Vascular wound healing and neointima formation induced by perivascular electric injury in mice. *Am J Pathol.* **150**(2):761-76.
73. Hoerstrup SP, Sodian R, Daebritz S, Wang J, Bacha EA, Martin DP, Moran AM, Guleserian KJ, Sperling JS, Kaushal S, Vacanti JP, Schoen FJ and Mayer JE, Jr. (2000). Functional living trileaflet heart valves grown in vitro. *Circulation.* **102**(19 Suppl 3):III44-9.

## **Chapitre 4**

### **Processus de conception détaillé**



## **4.1. Nécessité de la méthodologie de conception**

Le succès d'un projet en ingénierie dépend de l'habileté de l'entreprise à répondre aux besoins des clients dans un minimum de temps et de coûts. Pour y parvenir efficacement, l'entreprise usera généralement de méthodologies de conception éprouvées [1].

Au-delà de la réalisation d'un bioréacteur, le but du présent projet était de le concevoir de façon structurée en mettant les connaissances en ingénierie au service de la culture cellulaire. Ceci voulait répondre à un besoin de structure et de méthodologie puisque la recherche actuelle présente rarement un travail méthodique de conception, mais considère plutôt un bioréacteur comme une boîte noire dont le fonctionnement reste nébuleux. La conception a donc été faite en suivant rigoureusement les étapes suivantes.

## **4.2. Identification des besoins**

Afin de concevoir un appareil répondant aux objectifs du projet, l'étape d'identification des besoins était cruciale, particulièrement en raison de la complexité du corps humain. Il importait d'identifier les différents paramètres et contraintes mécaniques auxquels sont soumises les artères lors de leur croissance et d'isoler ce qui semblait primordial et utile pour favoriser la régénération du tissu artériel.

Les premiers besoins à combler étaient propres à toute forme de culture cellulaire. Parmi ceux-ci, il y avait le maintien de la température à 37°C, la biocompatibilité des matériaux, l'utilisation d'un milieu de culture pseudo physiologique et la stérilité.

L'intérêt a surtout été porté sur l'évolution de l'état fœtal à l'état adulte puisque c'est précisément ce à quoi sont soumises les artères qui évoluent jusqu'à leur maturation. Le concept d'évolution des contraintes est d'autant plus important qu'une matrice nouvellementensemencée, tout comme une artère fœtale, ne pourrait résister à d'aussi grandes sollicitations qu'une artère mature.

L'emphase a été mise sur les contraintes mécaniques causées par le débit, la pression interne et la tension permanente dans les artères pour les raisons énumérées au chapitre 3. Les contraintes causées par les mouvements du corps ont été négligées principalement

parce qu'elles sont aléatoires et non quantifiables, mais aussi parce qu'elles sont faibles à l'état fœtal.

Afin de mieux quantifier les contraintes dans la paroi artérielle causées par ces paramètres, une étude par éléments finis a été réalisée. Il en ressort principalement que la contrainte maximale est dans la direction circonférentielle, ce qui est en accord avec l'alignement des cellules musculaires lisses [2]. Aussi, les forces de cisaillement causées par le débit sont négligeables par rapport aux forces causées par la pression interne au niveau des contraintes dans la paroi. Par contre, ces forces de cisaillement sont indispensables au niveau de l'adhésion des cellules endothéliales et de la régulation du diamètre artériel.

Une fois les besoins isolés, ces derniers ont été convertis et ordonnés en critères à respecter lors de la conception. Ces critères sont présentés ci-dessous, divisés en spécifications du bioréacteur et en spécifications du système à perfusion dont il fera partie.

### 4.3. Spécifications du bioréacteur

#### 4.3.1. Dimensions

- Le bioréacteur devra avoir un **volume total minimal** pour le maintenir plus facilement à 37°C et minimiser la quantité de milieu de culture requise (raison économique).
- Le bioréacteur devra être conçu en fonction de la **longueur** désirée du vaisseau.
  - Cette longueur doit être en fonction de minimiser la quantité de cellules requises et d'éviter l'affaissement.
  - Elle devra tout de même permettre un mouvement pseudo-physiologique.
  - La longueur devra aussi être suffisante pour une implantation éventuelle et aussi pour que la partie centrale ne soit pas influencée par les ancrages à chaque bout du vaisseau.
  - Un compromis respectable serait de l'ordre de 5 cm.



- Le bioréacteur devra être conçu en fonction du **diamètre** désiré du vaisseau sanguin.
  - Un diamètre variable pourrait être envisageable dans une version future du bioréacteur. Ce diamètre pourrait alors varier de 4 à 8 mm.
  - Un diamètre interne de 6 mm a été choisi puisque c'est le diamètre des artères fémorales chez les animaux de taille moyenne [3]. Ceci permettra d'éventuelles expérimentations à ce niveau.
- Le vaisseau devra être positionné de façon horizontale pour imiter la **position fœtale** qui est majoritairement couchée, notamment lorsque la mère est étendue. Ceci va également permettre l'uniformité longitudinale, indispensable notamment lors de l'ensemencement des cellules endothéliales.
- Le bioréacteur devra pouvoir tenir en position verticale pour la maturation finale (imitation de l'alternance de la position debout et couchée).
- La **porte** du bioréacteur devra être suffisamment grande pour faciliter l'installation et le retrait d'une structure d'échafaudage dans un contexte stérile (sous une hotte avec les mains gantées).

#### 4.3.2. Matériaux

- Les matériaux qui seront en contact avec le milieu de culture et/ou les cellules cultivées et/ou la matrice d'échafaudage devront être le plus « **inertes** » et « **biocompatibles** » possible. En somme, ils devront minimalement interagir avec le milieu de culture et les cellules durant toute la durée de l'étude afin de ne pas nuire à la prolifération cellulaire et à la régénération tissulaire.
- La chambre de culture devra permettre la quantification de l'évolution du diamètre externe de la matriceensemencée à l'aide d'un interféromètre laser (Lasermike), donc **les côtés de la chambre devront être parallèles et transparents**.

- Les matériaux en contact avec le milieu de culture devront pouvoir être **stérilisés**, idéalement à l'autoclave ou à l'éthanol.
- Tous les matériaux employés devront être **résistants à la corrosion** dans un environnement à 37°C possiblement humide.
- Le cas échéant, des matériaux compatibles avec les normes de la Food and Drug Administration (**FDA**) seront considérés convenables.

### 4.3.3. Débit

- Le **débit intérieur** est indispensable pour la maturation.
- La conception du bioréacteur devra permettre l'installation et le retrait d'un support dans le vaisseau. Ce support est requis en début de culture pour conserver la lumière (l'intérieur du vaisseau) ouverte. Il pourrait être sous la forme d'une tige, d'un ballonnet, d'une tige poreuse, d'une prothèse en Dacron renforcée, etc. *Ce critère a été retiré, car il n'était pas indispensable et occasionnait des problèmes de stérilité.*
- Le débit interne du vaisseau devra pouvoir être **pulsatif**. Pour des fins de comparaison, ce même débit pourra être continu. La pulsation devra pouvoir varier en rythme et en amplitude selon la croissance du vaisseau.
- Le débit interne devra être **laminaire** puisqu'il en est ainsi dans les vaisseaux droits humains [4].
  - Bien qu'il y ait certaines turbulences dans les bifurcations, seul le débit laminaire sera considéré ici.
  - Les variations du diamètre interne de l'écoulement devront être minimisées et la jonction entre le vaisseau et le bioréacteur devra être suffisamment lisse pour ne pas induire de perturbations dans l'écoulement.
  - La zone d'entrée de l'écoulement avant le vaisseau devra être assez longue pour que l'écoulement soit pleinement développé et uniforme sur toute la

longueur du vaisseau sanguin. Dans ce cas, cette zone devra avoir une longueur d'au moins 30 fois le diamètre interne des tuyaux et du vaisseau.

- Un **débit minime à l'extérieur** du vaisseau sera requis pour un renouvellement continu du milieu.
- Le circuit du débit extérieur devra être **indépendant** de celui du débit interne pour ne pas qu'il y ait de contamination entre l'intérieur et l'extérieur du vaisseau, par exemple entre les cellules endothéliales et les fibroblastes.
- Le milieu externe à l'artère devra avoir une certaine **zone d'expansion**, c'est-à-dire ne pas être totalement plein ou hermétique, pour compenser le caractère incompressible du milieu de culture. Ceci permettra à l'artère de s'étirer radialement lors de la pulsation. Sinon, la pression interne serait reprise par le milieu externe plutôt que seulement par l'artère et ça ne représenterait plus la pression externe intracorporelle qui est quasi nulle.

#### 4.3.4. Rotation

- La **rotation axiale** du vaisseau sera requise :
  - Lors de l'ensemencement des cellules endothéliales, elle assurera leur **étalement uniforme** en diminuant l'effet de la gravité. Une vitesse convenable pour une distribution uniforme serait d'environ une rotation par minute [5].
  - Lors de la croissance du vaisseau, il serait bon de vérifier si l'**asymétrie des contraintes mécaniques causée par la gravité** est négligeable ou si une rotation axiale permettrait une meilleure axisymétrie. Le cas échéant, il faudrait évaluer la vitesse de rotation requise.
  - Il n'est pas question de rotation verticale puisque l'uniformité longitudinale est déjà assurée par la position horizontale du vaisseau sanguin.

- Divers types de rotation sont envisageables.
  - La rotation du vaisseau seulement permettrait une variation de sa position et causerait des forces de cisaillement sur l'extérieur de celui-ci.
  - La rotation de la coquille seulement ne causerait que des forces de cisaillement sur l'extérieur du vaisseau. Cette option ne peut être considérée seule puisqu'une rotation du vaisseau sera indispensable pour l'ensemencement de l'endothélium.
  - La rotation de l'ensemble du bioréacteur est probablement le concept le plus simple. Ceci permettrait la variation de la position du vaisseau et moins de forces de cisaillement sur l'extérieur du vaisseau. Cette option sera privilégiée.

#### 4.3.5. Contraintes mécaniques

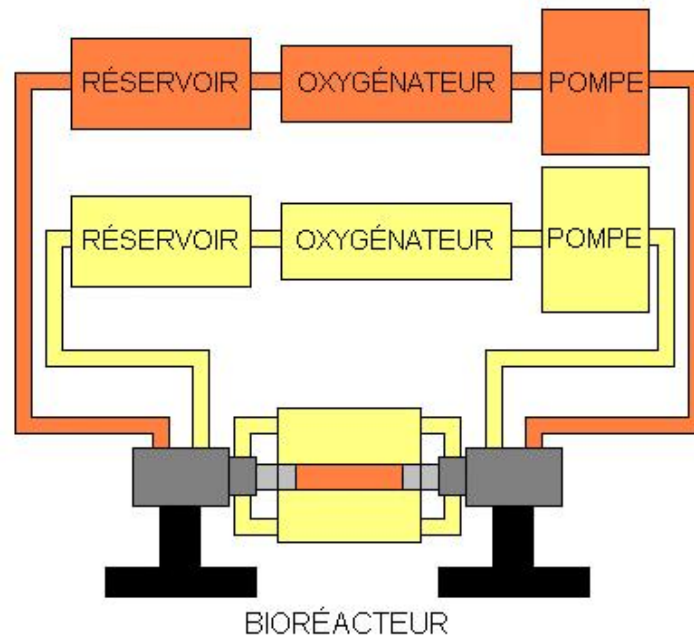
- Chacune des contraintes applicables devra être **variable** et **contrôlable**.
- Celles-ci devront être en mesure d'**évoluer** avec la maturation du vaisseau sanguin.
- Le bioréacteur devra pouvoir appliquer une contrainte de **traction** sur la structure ensemencée.
  - Il devra être possible d'appliquer une force axiale (contrainte axiale  $\sigma_T$  imposée, déformation axiale de la structure variable) ou un étirement axial (déformation axiale  $\epsilon$  imposée, contrainte axiale variable).
  - Cette contrainte pourrait être **pulsative ou constante**.
  - La valeur de la contrainte de traction devra pouvoir être **mesurée** pour permettre d'évaluer la réticulation cellulaire qui augmenterait la traction dans le vaisseau.
  - L'**amplitude** d'étirement du vaisseau devra être d'au moins **50%** de sa longueur pour imiter la tension interne intracorporelle.

- Une **pression interne**, pulsative ou non, sera possible avec ou sans débit.
- Des contraintes de **cisaillement** seront appliquées à l'intérieur du vaisseau en raison du débit interne.
- Des contraintes de cisaillement seront appliquées si le milieu de culture extérieur au vaisseau est en mouvement par rapport à ce dernier ou à l'espace.
- Pour imiter davantage les mouvements physiologiques, les divers mouvements du vaisseau et ses pulsations pourraient être en « spirales » [5]. *De tels mouvements seraient difficiles à caractériser et seront donc à considérer dans une version future du bioréacteur. Il serait alors possible de tester les vaisseaux dans des conditions plus spécifiques aux artères matures avec des tractions, repliements et torsions variables. D'ici là, un changement du roulement linéaire pour qu'il ne soit pas bloqué en rotation permettrait l'application d'une contrainte de torsion uniaxiale dans la direction longitudinale.*

#### **4.4. Spécifications du système à perfusion**

- Le bioréacteur devra être conçu pour faire partie d'un système constitué d'au moins un réservoir de milieu de culture et une pompe. Un réservoir de milieu usé et un système d'oxygénation pourraient être ajoutés.
- Le système devra être maintenu à une température de 37°C, du moins le bioréacteur et le milieu de culture avant qu'il n'y entre, pour qu'il soit à une température uniforme.
- Le système devra minimiser la longueur des tuyaux et les bifurcations pour :
  - minimiser les pertes de charges,
  - maintenir le caractère pulsatif du débit et
  - minimiser la quantité de milieu de culture requise.

- Étant donné la séparation des milieux de culture interne et externe, le système à perfusion devra posséder deux circulations séparées telles que schématisées ci-dessous.



**Figure 4.1 :** Système à perfusion à double circulation

#### 4.4.1. Dimensions

- Le volume total du système sera minimisé pour réduire l'espace à maintenir à 37°C.

#### 4.4.2. Pompe

- Le débit de la pompe devra être pulsatif et ajustable en amplitude et en fréquence. Il devra pouvoir fournir une plage d'environ 50 à 200 pulsations/minute, pour couvrir les fréquences de l'âge fœtal (130 à 160 pulsations/minute [6]) à l'âge adulte (70 à 75 pulsations/minute en moyenne au repos [6,7]).
- Le débit dans l'artère fémorale superficielle humaine est d'environ 0,2 l/min [8]. Le débit dans le système à perfusion devra pouvoir être fixé à des valeurs entre 0,1 et 0,5 l/min pour être en mesure d'en étudier l'effet des variations.

- Divers types de pompes sont envisageables dont une pompe péristaltique ou une pompe à piston pulsatif, telle la Harvard Pulsatile Blood Pump (Harvard Apparatus, Massachusetts).

#### 4.4.3. Oxygénation

- L'oxygénateur devra permettre le débit pulsatif ou être positionné avant la pompe.
- Divers types d'oxygénateurs sont envisageables :
  - Oxygénateur à membrane (un tel oxygénateur, utilisant le principe des gradients de concentration et des membranes semi-perméables, doit être placé après la pompe pour vaincre la résistance, mais transmet mal le débit pulsatif, donc une autre pompe est requise après l'oxygénateur)
  - Oxygénateur « à bulles » (oxygénation dans le réservoir à l'aide d'un système semblable à ceux utilisés pour oxygéner l'eau des aquariums)

### 4.5. Modélisation et prototype

La modélisation du bioréacteur a été réalisée en quasi totalité à l'aide du logiciel Pro/Engineer, en respectant le plus possible les critères établis dans le cahier des charges ci-dessus. La conception a été décrite plus en détails au chapitre précédent. Des plans supplémentaires sont fournis à l'annexe A.

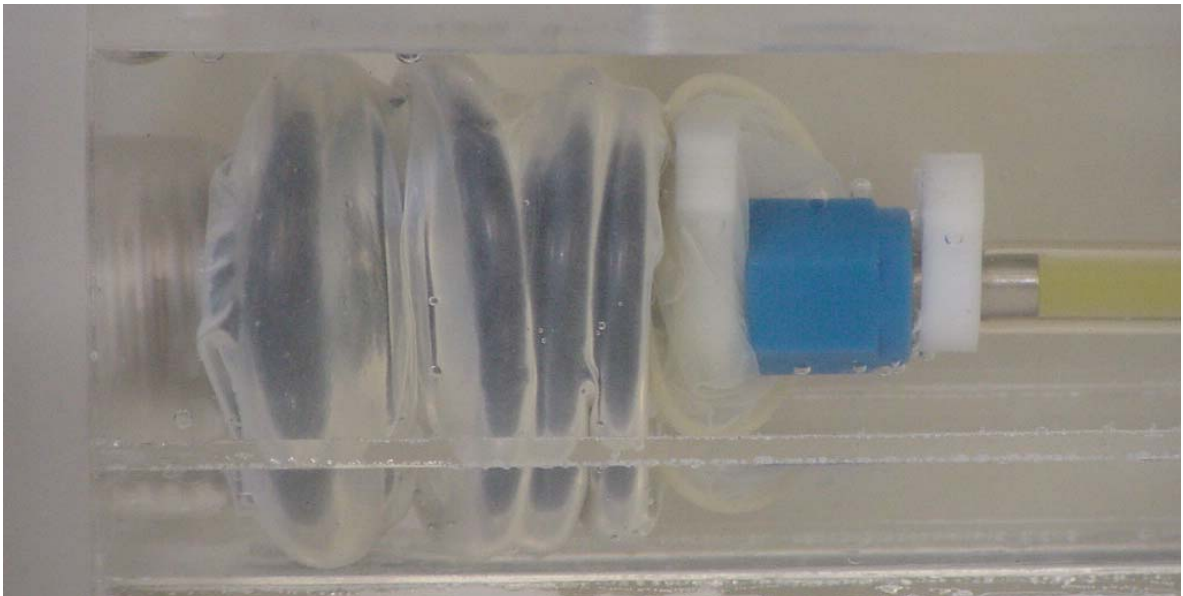
La partie centrale du bioréacteur a ensuite été fabriquée pour évaluer la faisabilité. Les composantes permettant la rotation et le système à perfusion seront réalisés subséquentement.

### 4.6. Précisions sur la validation

Comme il a été mentionné au chapitre précédent, un point critique pour la stérilisation s'est révélé être le joint d'étanchéité. Le soufflet devant être utilisé au départ s'est montré toxique pour des fibroblastes 3T3 [Erreur ! Source du renvoi introuvable.] suite à une stérilisation à l'éthanol (voir tableau 4.1 à la fin de ce chapitre). Des tests supplémentaires

ont été effectués avec des cellules sur des préservatifs de latex et de polyuréthane (tableau 4.1). Le latex a été choisi puisqu'il a résisté à l'autoclave et qu'il a modérément influencé la survie des cellules mises en sa présence.

Le défaut de la membrane de latex, contrairement au soufflet en néoprène/latex, est qu'elle ne supporte pas de contrainte en compression. Ainsi, l'ajout de liquide dans le bioréacteur avec seulement la membrane comme joint crée un effet de succion qui nuit à la translation de l'arbre rainuré et induit des contraintes pouvant être destructrices pour la membrane. Le soufflet a donc été placé sous celle-ci pour la supporter sans être en contact avec le milieu de culture.



**Figure 4.2 :** Soufflet recouvert

L'étanchéité de cette membrane supportée est d'autant plus critique qu'elle est directement reliée à la stérilité du milieu de culture et au bon fonctionnement du roulement linéaire bloqué en translation qui, au moment d'écrire ces lignes, n'a pu être obtenu en acier inoxydable. De plus, cette étanchéité doit être atteinte à l'aide d'éléments faciles à installer dans un climat stérile, mais aussi pouvant être stérilisés.



Divers montages ont été expérimentés pour étanchéifier adéquatement le joint le plus à risque, soit celui de droite sur la figure 4.2. Celui s'étant révélé le plus efficace a été un anneau de polymère compatible avec les normes FDA, placé dans une rainure et comprimé par un collet de serrage. Tel que mentionné au chapitre précédent, ce dernier a résisté à une colonne d'eau de 140 cm (13,7 kPa, 103 mmHg). Cette résistance en pression a été jugée suffisante puisqu'en temps normal, la pression dans le milieu externe sera négligeable, correspondant à la hauteur du milieu de culture par-dessus le joint, soit moins de trois centimètres. Par contre, advenant l'éventuel bris de la matrice ou de la prothèse installée, le joint sera suffisant pour supporter la pression correspondant à la pression interne.

**Tableau 4.1** : Résumé des tests de compatibilité avec des cellules

<b>Membrane</b>	<b>Lavage</b>	<b>Séchage</b>	<b>Stérilisation</b>	<b>Rinçage</b>	<b>Observation des cellules 3T3 et commentaires généraux</b>
<b>Soufflet en néoprène recouvert de latex</b>			Éthanol 70% pendant 10 minutes	Milieu de culture	Le matériel devient très collant suite à la stérilisation à l'éthanol. L'élasticité semble inchangée. Le soufflet ne fait pas varier le pH du milieu de culture seul. Après trois jours de contact avec le milieu, ce dernier est utilisé pour nourrir une culture de cellules en phase exponentielle. Les cellules meurent en moins de 24h.
<b>Latex Trojan non-lubrifié</b>					Le latex est recouvert de poudre qui ne semble pas déranger les cellules. Les cellules croissent très bien malgré le pH bas (milieu jaune). Par contre, il y a apparition de moisissures après trois jours en culture, ce qui explique l'acidité du milieu.
<b>Latex Trojan non-lubrifié</b>			Éthanol 70% pendant 10 minutes	Solution de Hank's et milieu de culture	Le latex devient collant suite au trempage dans l'éthanol. L'élasticité semble la même. Les cellules meurent en moins de 24 heures suite à l'ajout de la membrane de latex au milieu de culture.
<b>Latex Trojan non-lubrifié</b>	Solution de Hank's			Hank's	La poudre ne dérange pas la croissance cellulaire. Le pH est acide (milieu jaune) dès 24 heures après l'ajout de la membrane. Il y a encore une fois une apparition de moisissures après quelques jours en culture, ceci expliquant l'acidité du milieu.
<b>Polyuréthane Trojan Supra lubrifié avec spermicide</b>	Solution de Hank's		Éthanol 70% pendant 10 minutes	Solution de Hank's et milieu de culture	Les cellules meurent en moins de 24 heures suite à l'ajout de la membrane de polyuréthane.
<b>Polyuréthane Trojan Supra lubrifié avec spermicide</b>	Eau	Air	Autoclave pendant 20 minutes à 121°C		Le polyuréthane ne supporte pas la stérilisation à l'autoclave.
<b>Latex Trojan non-lubrifié</b>	Eau	Air	Autoclave pendant 20 minutes à 121°C		Le latex supporte très bien l'autoclave. Il garde son élasticité et ne devient pas collant comme lorsqu'il a été mis en présence d'éthanol à 70%. Les cellules se comportent très bien quoiqu'elles soient un peu affectées par la présence du latex. Elle présentent une apparence plus granuleuse et contiennent quelques fois des

					vacuoles. En général, leur état est très acceptable.
--	--	--	--	--	--

## 4.7. Références

1. Ulrich KT and Eppinger SD. (1995). *Product design and development*, 1e éd. Boston, Irwin/McGraw-Hill, 289.
2. Vorp DA, Rajagopal KR, Smolinsk PJ and Borovetz HS. (1994). Identification of elastic properties of homogeneous, orthotropic vascular segments in distension. *J Biomech.* **28**(5):501-12.
3. Megerman J and Abbott WM. (1983). Compliance in vascular grafts. In Wright CB (Ed.), *Vascular Grafting: Clinical Applications and Techniques*, John Wright PSG: Boston. p. 344–64.
4. Burton AC. (1974). *Physiologie et biophysique de la circulation*, 2e éd. Paris, Masson et cie, 249.
5. Weinberg CB and Bell E. (1986). A Blood Vessel Model Constructed from Collagen and Cultured Vascular Cells. *Science.* **231**(4736):397-400.
6. Silbernagl S and Despopoulos A. (1992). *Atlas de poche de physiologie: atlas commenté de physiologie humaine pour étudiants et praticiens*. Paris, Flammarion, 366.
7. Campbell NA and Mathieu R. (1995). *Biologie*. Saint-Laurent, Éditions du Renouveau Pédagogique Inc., 1190.
8. Hussain ST, Smith RE, Wood RF and Bland M. (1996). Observer variability in volumetric blood flow measurements in leg arteries using duplex ultrasound. *Ultrasound Med Biol.* **22**(3):287-91.
9. Hill M. (2004). *Tissue Culture- 3T3 cells*. Cell Biology Laboratory, Faculty of medicine, School of Anatomy, The University of New South Wales (UNSW, [http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone\\_tissue\\_engineering/bone\\_tissue\\_engineering.htm](http://www.btec.cmu.edu/tutorial/bone_tissue_engineering/bone_tissue_engineering.htm)).

## **Conclusion**



L'objectif du projet de maîtrise était de concevoir un bioréacteur le plus polyvalent possible pour la régénération du tissu artériel sous des contraintes pseudo-physiologiques spécifiques à ce type de tissus. Une introduction à l'ingénierie tissulaire et aux bioréacteurs a été présentée comme prélude à la conception du bioréacteur.

Ainsi, le présent travail a premièrement fait état des recherches actuelles dans le domaine qui utilisent les bioréacteurs pour encourager la prolifération cellulaire et étudier l'effet de certains paramètres sur les propriétés finales des tissus régénérés. Une revue de la littérature a ainsi fait l'étalage des principaux bioréacteurs employés pour la régénération de tissus fonctionnels à partir de cellulesensemencées, la plupart du temps, sur des structures d'échafaudage. Il a été montré que des facteurs tels que les contraintes mécaniques et le niveau d'oxygénation influencent la régénération tissulaire et que leur impact varie selon le type de cellules et le tissu en cause. Des contraintes mécaniques bénéfiques à la culture du cartilage ont des effets très différents si elles sont appliquées sur d'autres tissus, étant notamment destructrices pour le tissu cardiaque. Actuellement, l'influence de ces paramètres de culture est relativement connue et maîtrisée, mais les mécanismes les régissant sont plus ou moins compris.

Le projet voulait se différencier de la recherche actuelle par la rationalité de sa méthodologie de conception. Il n'était pas seulement souhaité d'encourager la croissance du tissu vasculaire, mais aussi de l'optimiser. Il fallait ainsi pouvoir isoler et étudier les effets des diverses contraintes mécaniques pendant la période de culture sur les propriétés finales des tissus régénérés. Le bioréacteur a donc été réalisé en suivant des étapes préétablies dans le domaine de l'ingénierie. Ainsi, l'identification des objectifs et des besoins a précédé la réalisation du cahier des charges où les spécifications à respecter ont été énumérées. La modélisation a été réalisée par ordinateur en respectant ces spécifications. Ensuite, une première partie du bioréacteur a été fabriquée et son fonctionnement a été validé, particulièrement au niveau de l'étanchéité.

L'emphase mise sur les conditions mécaniques a été justifiée par une revue des mécanismes de mécanotransduction. Les contraintes principales auxquelles les artères sont soumises ont été isolées et divisées en cinq catégories :

- La pression interne
- Le cisaillement sur la paroi interne causée par le débit sanguin
- La tension dans la direction axiale
- L'étirement dans la direction axiale
- La torsion (notamment dans la direction axiale)

Puisque la torsion est plutôt présente au niveau des artères coronariennes dans le cœur et qu'il était ici question de reproduire les conditions intracorporelles propres à l'artère fémorale, les quatre premières catégories de contraintes ont été retenues pour être applicables, seules ou combinées, dans le bioréacteur.

L'ordre de grandeur des contraintes mécaniques auxquelles sont soumises les parois artérielles a été évalué par une modélisation par éléments finis. Les contraintes calculées sont de l'ordre de 18 kPa dans la direction radiale, 65 kPa dans la direction longitudinale et 90 kPa dans la direction circonférentielle. Cette dernière direction, correspondant d'ailleurs à l'alignement des cellules musculaires lisses, est la plus élevée puisqu'elle doit notamment soutenir la pression interne dans la lumière.

## **Développements futurs**

Tels que survolés dans l'article au chapitre 3, les premiers tests effectués dans le prototype serviront à évaluer la résistance des matrices à ensemercer sous un débit pulsatif et une faible tension constante. Ceci permettra de s'assurer que les matricesensemencées pourront résister à un minimum de contraintes en début de culture et constituera une validation plus poussée du bioréacteur. Ensuite, des études plus poussées seront réalisées sur l'influence des diverses contraintes mécaniques applicables pendant la période de culture sur les propriétés finales du vaisseau telles la résistance à l'éclatement, le module de Young, l'orientation des fibres musculaires lisses, etc. Il s'agira en somme de trouver le niveau

optimal des contraintes mécaniques qui améliorera les propriétés du tissu sans le blesser et ce, à chaque stade de la maturation.

En parallèle, la seconde partie du montage sera réalisée afin d'ajouter la rotation au procédé et permettre l'ensemencement uniforme d'un endothélium, étape indispensable à l'hémocompatibilité du vaisseau. Des recherches seront aussi réalisées sur l'optimisation de la méthodologie de culture des cellules vasculaires et de la matrice d'échafaudage. D'autres éléments de culture pourraient éventuellement être ajoutés, notamment une torsion, en installant un roulement linéaire non bloqué en rotation, ou un courant électrique, puisque les tubes où la matrice est ancrée sont en acier inoxydable.

Bien que très polyvalent, le bioréacteur a tout de même certaines limitations. La quantité de milieu de culture requise est assez importante (environ un demi-litre), mais cet inconvénient est en quelque sorte inhérent à la grande amplitude de translation possible. Aussi, il est évident qu'il est impossible d'imiter parfaitement les contraintes intracorporelles. Bien que tentant de les reproduire le plus efficacement possible, le phénomène de plateau décrit aux chapitres 2 et 3 se produira probablement toujours à un moment ou à un autre de la régénération tissulaire. Ainsi, l'objectif ne sera pas de l'éviter, mais plutôt de pouvoir le repousser après l'obtention d'un tissu ayant des propriétés suffisantes pour être implanté. Pour ce faire, le bioréacteur et sa méthodologie d'utilisation pourront être peaufinés et éventuellement contribuer à la régénération *in vivo* d'une artère fonctionnelle et implantable.

## **Quelques considérations éthiques**

Cet état de fait soulève un questionnement qui ne devrait pas être passé sous silence. Il est indispensable de se demander si le fait de trouver une solution quasi idéale à l'un des problèmes de santé les plus fréquents dans le monde actuellement ne risque pas de déresponsabiliser les individus et d'encourager les mauvaises habitudes de vie. Bien que ce risque soit présent, les défaillances artérielles ne sont pas toujours synonymes de responsabilité individuelle et, considérant toutes les vies pouvant être sauvées, les recherches dans le domaine sont, à mon point de vue, pleinement justifiées.

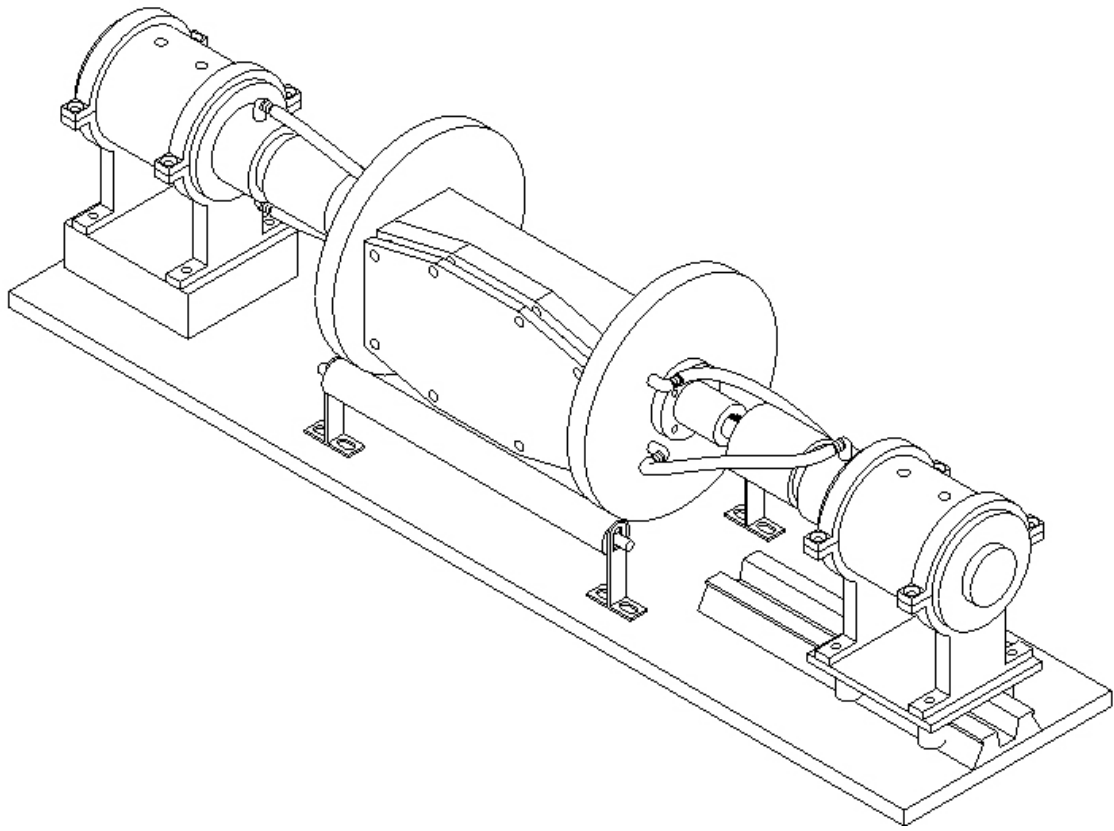


## **Annexe A**

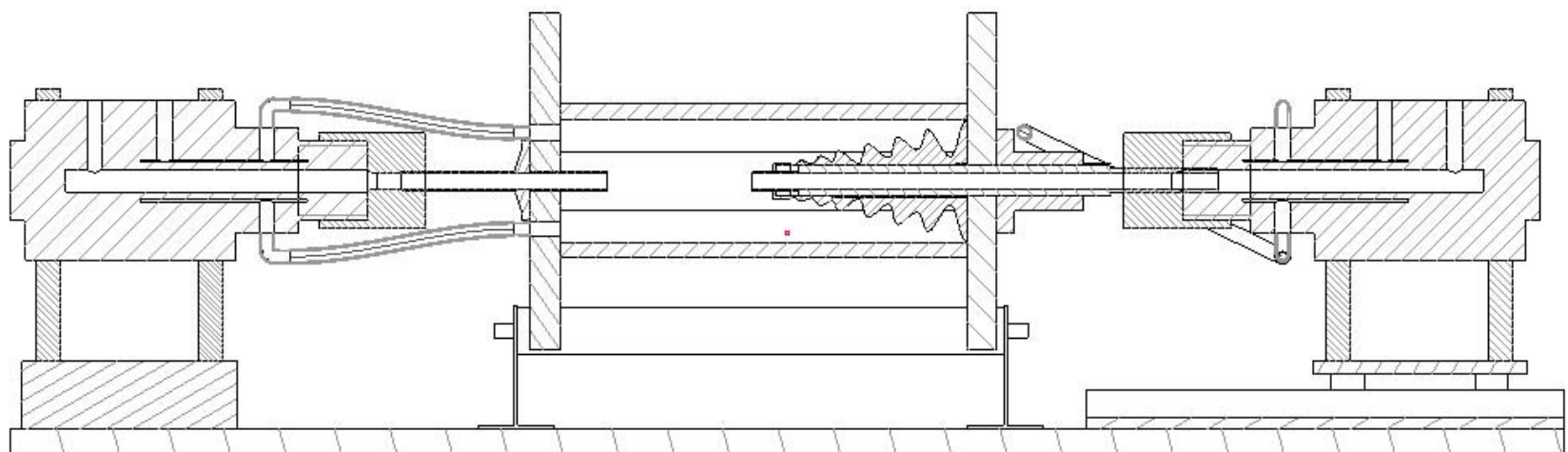
### **Plans supplémentaires du bioréacteur**



## A.1. Bioréacteur complet

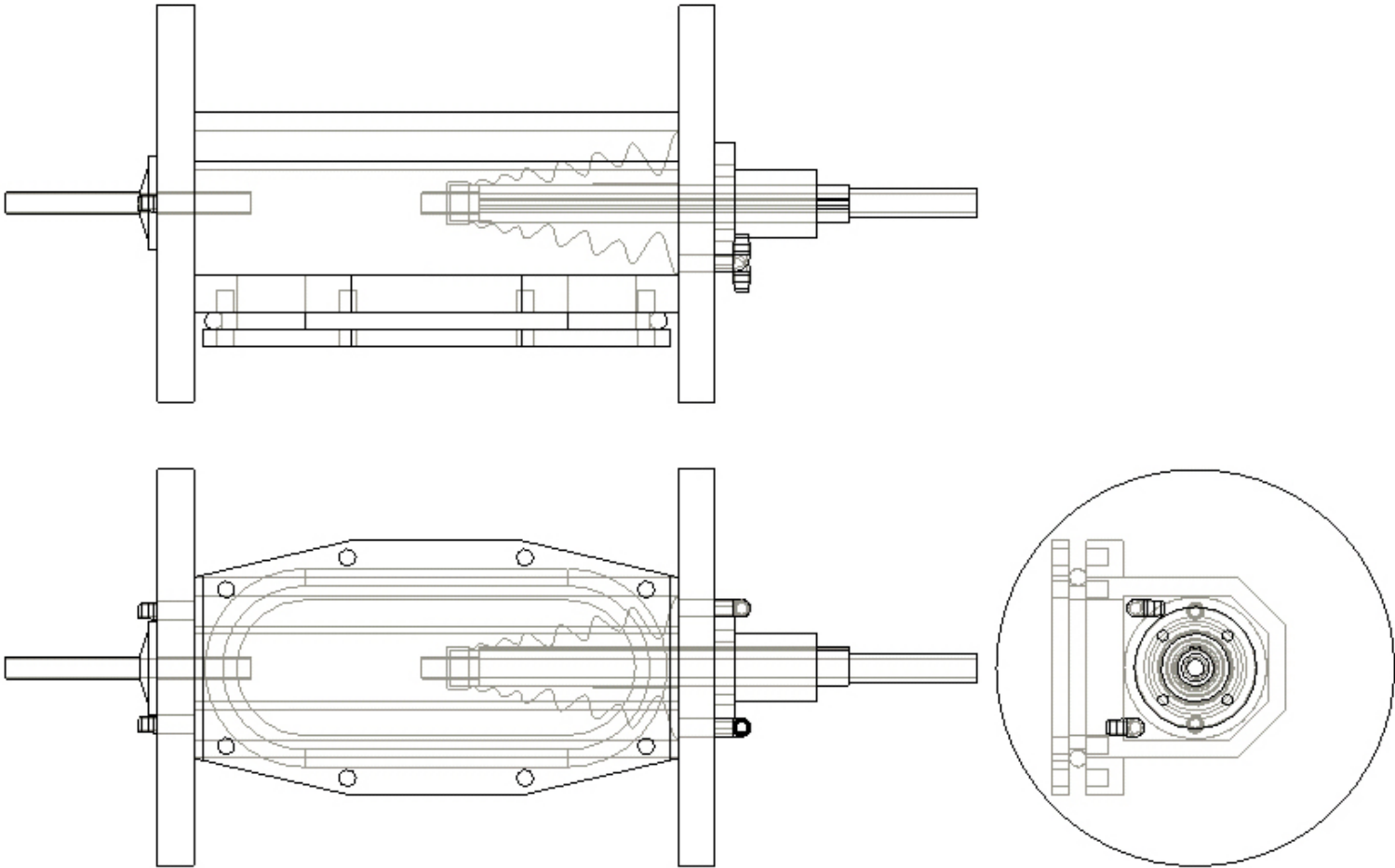


**Figure A.1 :** Vue isométrique du bioréacteur complet

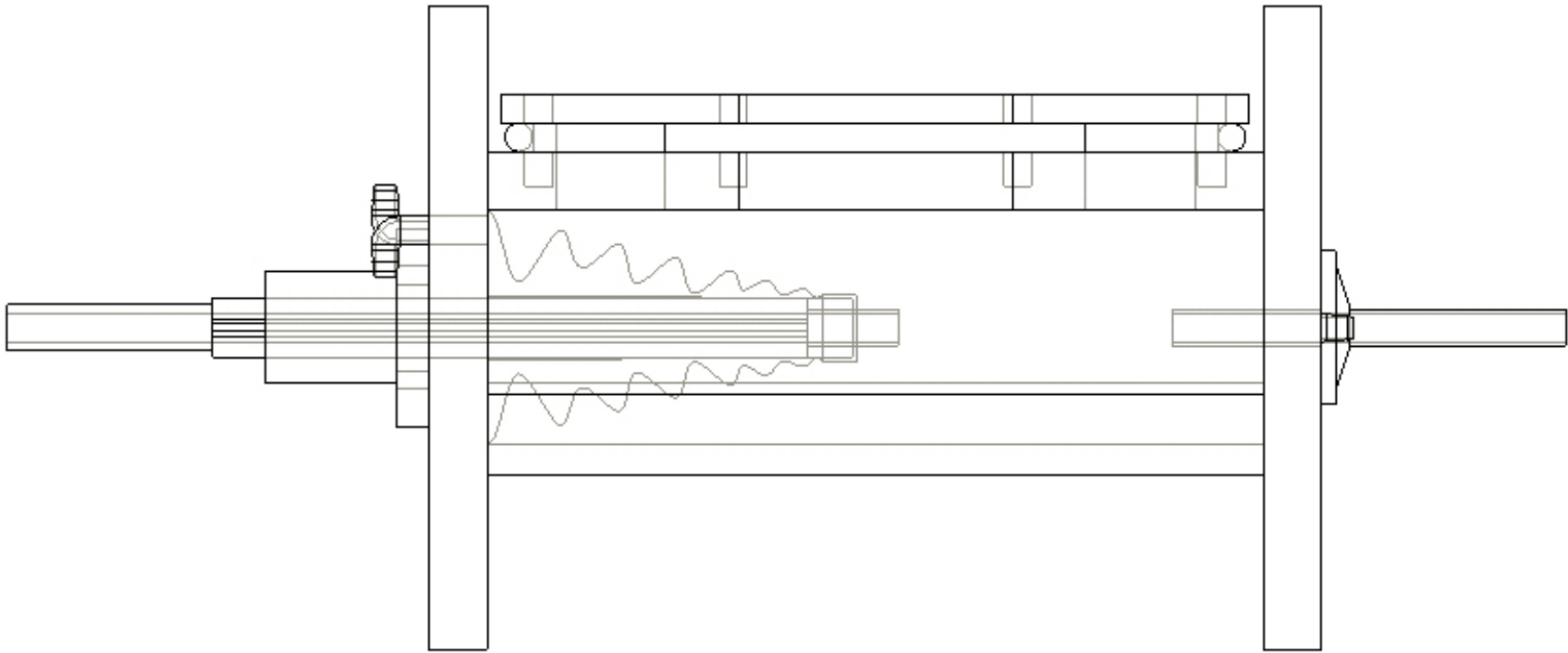


**Figure A.2 :** Vue en coupe du bioréacteur complet

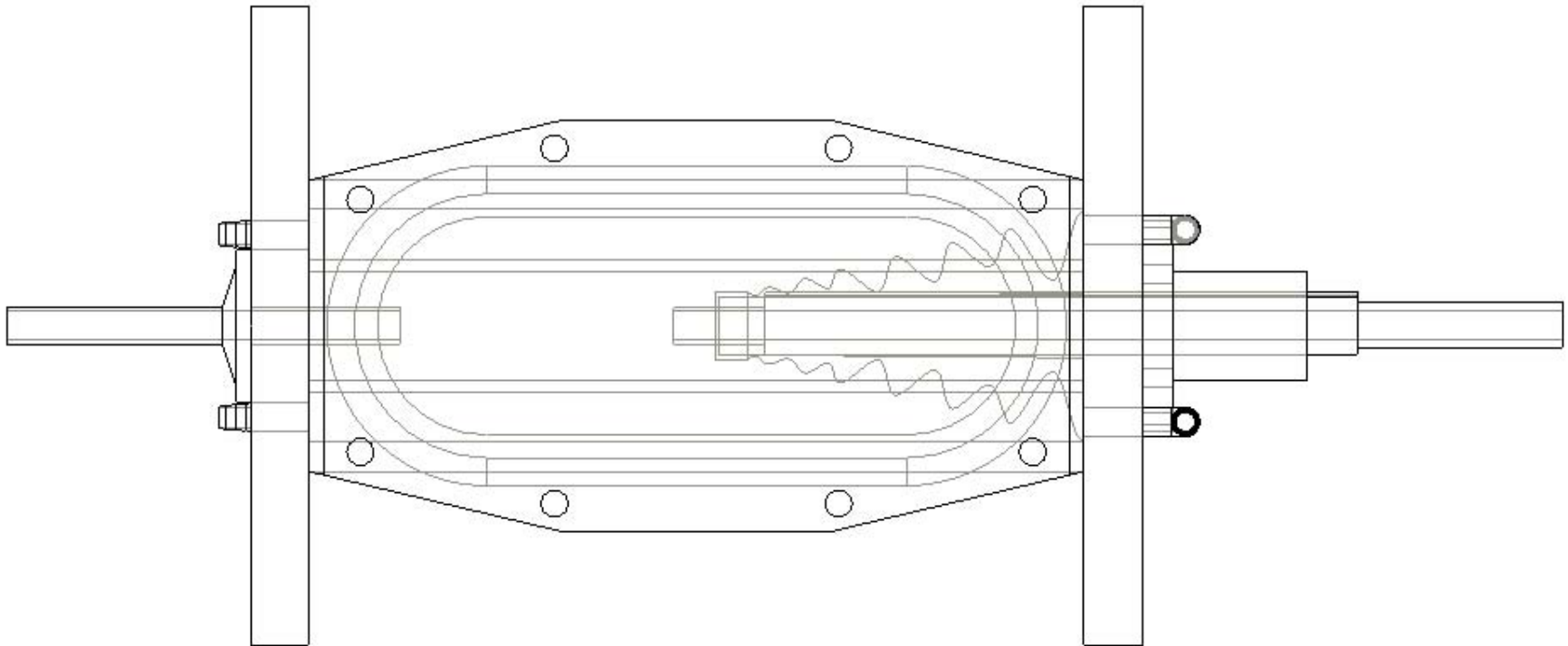
**A.2. Partie rotative**



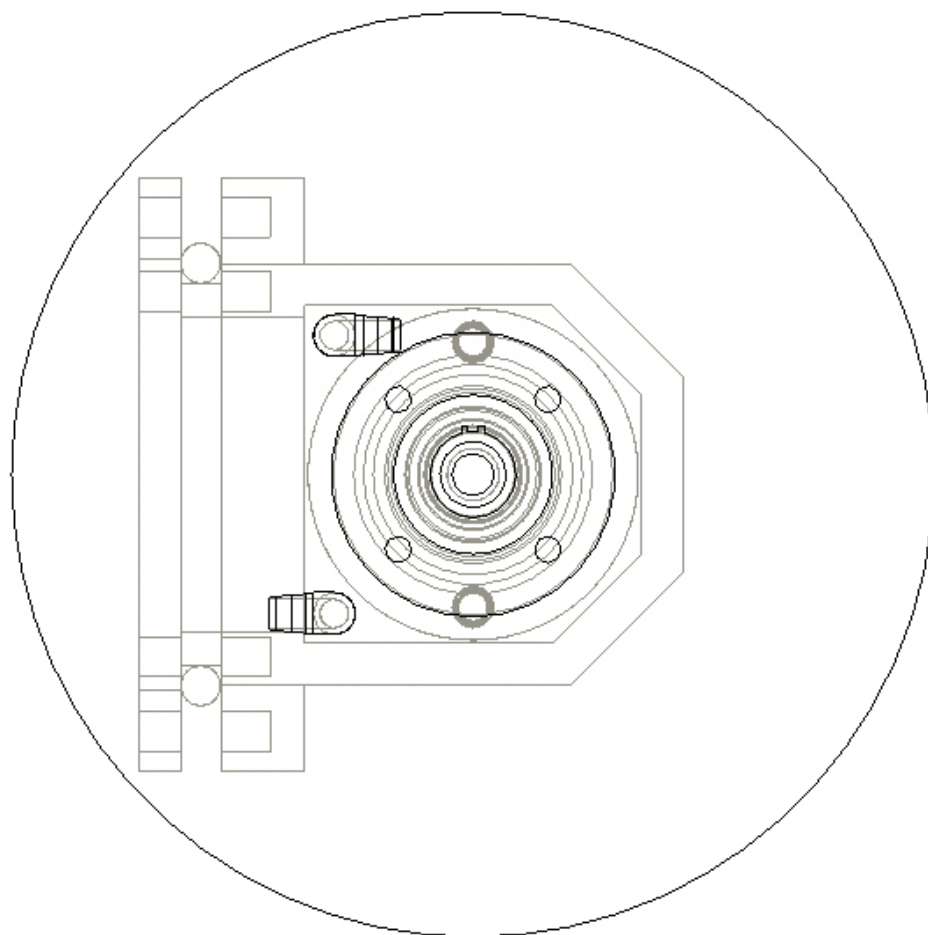
**Figure A.3 :** Vues combinées de la partie rotative



**Figure A.4 :** Vue de face de la partie rotative



**Figure A.5 :** Vue de dessus de la partie rotative



**Figure A.6 :** Vue de côté de la partie rotative