



# **Fabrication par génie tissulaire d'un substitut de valve aortique**

**Mémoire**

**Morgane Claire Hélène Jaguenaud**

**Maîtrise en génie mécanique - avec mémoire**  
Maître ès sciences (M. Sc.)

Québec, Canada

# **Fabrication par génie tissulaire d'un substitut de valve aortique**

**Mémoire**

**Morgane Jaguenaud**

Sous la direction de :

Jean Ruel, directeur de recherche  
Julie Fradette, codirectrice de recherche  
André Bégin-Drolet, codirecteur de recherche

# Résumé

Les maladies valvulaires sont un problème de santé majeur et grandissant. Les substituts pour remplacer les valves cardiaques disponibles présentement comportent plusieurs inconvénients, dont la prise de médicaments antirejets ou anticoagulants, ainsi que la calcification. De plus, ils ne sont pas adaptés pour les jeunes patients à cause de leur taille inadéquate et de l'impossibilité de croissance. L'objectif est de fabriquer une valve aortique vivante grâce une technique innovante de moulage de tissus biologiques produits par génie tissulaire, pour remédier à ces problèmes. Un moule en sucre vitrifié sous la forme de valve cardiaque à trois feuillets est fabriqué par impression 3D. Un mélange d'alginate (hydrogel biocompatible) et de cellules est coulé dans le moule et se gélifie. Le moule est ensuite dissout dans une solution aqueuse laissant place à la valve. Les objectifs du projet étaient de produire une valve fonctionnelle et de géométrie optimale mais exempte de cellules et d'étudier l'impact de l'alginate sur la viabilité cellulaire. Des modifications à la conception, l'impression et la recette d'alginate sans cellules ont été réalisées afin d'obtenir une valve avec peu de défauts et dont la résistance fut testée en bioréacteur. La littérature suggère qu'un haut pourcentage d'alginate est nocif pour les cellules. Une étude sur des disques d'alginate avec cellules fut réalisée pour évaluer cet impact. Ces disques ont été fabriqués en conditions stériles et cultivés pendant 24h ou sept jours. Des tests de viabilité ont montré que les pourcentages d'alginate étudiés n'avaient pas d'influence sur la viabilité cellulaire, validant l'utilisation de la concentration d'alginate pour la fabrication d'un substitut de valve aortique par génie tissulaire. À terme, l'alginate servira d'échafaudage pour les cellules qui produiront leurs propres tissus biologiques. Ces derniers remplaceront l'alginate qui se dégradera avec le temps, laissant place à une valve uniquement composée de tissus biologiques.

# Abstract

Heart valve disease is a major and growing health problem. The currently available heart valve substitutes have several drawbacks, including the use of immune-suppressors or anticoagulant medication, as well as calcification. In addition, they are not suitable for young patients because of their inadequate size and their inability to grow. The objective is to create a living aortic valve using an innovative tissue-engineering molding technique of biological tissue to address these issues. A vitrified sugar mold in the shape of a trileaflet heart valve is 3D printed. A mixture of alginate (a biocompatible hydrogel) and cells is poured and cast into the mold. Upon gelling of the alginate scaffold, the mold is then dissolved in an aqueous solution, leaving the alginate valve. The objectives of this project were to produce a perfect cell-free but functional and geometrically adequate aortic valve and to study the impact of alginate on cell viability. Modifications to the design, printing and recipe of the cell-free alginate were made to obtain a valve with few defects and which resistance was tested in a bioreactor. The literature suggests that a high percentage of alginate can be harmful to the cells. A study on cellular alginate discs was performed to evaluate this impact. These discs were produced under sterile conditions and were cultured for 24 hours or seven days. Viability tests showed that the alginate percentages tested had no influence on cell viability, validating the use of the alginate concentration to produce a tissue-engineered aortic valve substitute. Eventually, the alginate will be used as a scaffold for cells that will produce their own biological tissues. The latter will replace the alginate which will degrade over time, leaving a valve only composed of biological tissue.

# Table des matières

Résumé.....	ii
Abstract.....	iii
Table des matières .....	iv
Liste des figures .....	vi
Liste des tableaux.....	ix
Liste des abréviations, sigles et acronymes .....	x
Remerciements .....	xiii
Introduction.....	1
Chapitre 1 Revue de littérature.....	5
1.1 Système cardiovasculaire.....	5
1.1.1 Système cardiaque .....	5
1.1.2 Structure macroscopique de la valve aortique .....	7
1.1.3 Structure microscopique de la valve aortique .....	8
1.2 Maladies cardiovasculaires.....	10
1.3 Remplacement de la valve aortique .....	11
1.3.1 Procédés existants.....	11
1.3.2 Le génie tissulaire et les types de tissus pour remplacer des valves cardiaques.....	12
1.3.3 L'utilisation de cellules en génie tissulaire pour remplacer une valve aortique .....	14
1.3.4 Procédés de génie tissulaire pour remplacer des valves cardiaques .....	15
1.4 Procédé choisi par le groupe de recherche pour produire une valve aortique .....	19
1.4.1 Impression 3D avec du sucre vitrifié .....	19
1.4.2 Alginate .....	22
1.4.3 Cellules stromales issues du tissu adipeux .....	23
1.5 Résumé des principaux types de substituts de valves cardiaques en génie tissulaire .....	24
Chapitre 2 Essais préliminaires .....	26
2.1 Introduction à la culture cellulaire.....	26
2.2 Essais préliminaires avec des cubes d'alginate .....	28
2.2.1 Expériences antécédentes .....	28
2.2.2 Expérience avec des cubes d'alginate sans cellule pour contrôle négatif .....	29
2.3 Analyses sur les cubes d'alginate .....	35
2.3.1 Introduction sur l'immunofluorescence .....	35
2.3.2 Résumé des analyses d'immunofluorescence sur les cubes d'alginate .....	36

Chapitre 3	Fabrication d'un moule en sucre vitrifié pour reproduire une valve aortique .....	41
3.1	Introduction à l'impression 3D de sucre vitrifié.....	41
3.2	Conception et impression du moule .....	43
3.2.1	Premiers essais .....	43
3.2.2	Modifications dans la conception et l'impression du moule .....	46
3.2.3	Design final du moule et paramètres finaux d'impression .....	51
3.3	Conclusion et perspectives.....	53
Chapitre 4	Fabrication d'une valve aortique en alginate et essais en bioréacteur .....	54
4.1	Moulage à l'alginate .....	54
4.1.1	Fabrication du gel d'alginate.....	55
4.1.2	Recette finale.....	58
4.2	Essais en bioréacteur .....	59
4.2.1	Introduction sur les bioréacteurs .....	59
4.2.2	Fabrication d'un support personnalisé pour la valve .....	61
4.2.3	Essais en bioréacteurs .....	62
4.3	Conclusion et perspectives.....	66
Chapitre 5	Étude de l'impact de la concentration d'alginate sur des cellules souches/stromales issues du tissu adipeux 67	
5.1	Introduction.....	67
5.2	Matériel et méthode.....	70
5.2.1	Culture cellulaire .....	70
5.2.2	Fabrication des disques en alginate.....	71
5.2.3	Biopsie pour analyses .....	72
5.3	Résultats et discussion.....	72
5.3.1	Conditions de culture et disques d'alginate .....	72
5.3.2	Test de viabilité ( <i>Live/Dead</i> ) .....	73
5.4	Conclusion.....	75
Conclusion	.....	76
Retour sur les objectifs initiaux.....		76
Perspectives.....		78
Bibliographie.....		80
Annexe A: Recette du sirop de sucre.....		87
Annexe B : Recette de fabrication d'un gel à 4% d'alginate .....		89
Annexe C : Calcul de concentration.....		90

## Liste des figures

Figure 1.1 : Schéma de la structure anatomique du cœur, issu de [13].	6
Figure 1.2 : Valves cardiaques vue de haut, issu de [12].	6
Figure 1.3 : Schéma de la constitution anatomique d'une valve aortique, issu de [17].	7
Figure 1.4 : Schéma d'une racine aortique ouverte longitudinalement, issu de [20].	8
Figure 1.5 : Section histologique d'une valve aortique porcine normale colorée avec de l'hématoxyline et de l'éosine, adaptée de [28].	9
Figure 1.6 : Image d'une valve fabriquée par auto-assemblage de feuillets de cellules en tubes, issu de [67].	16
Figure 1.7 : Photographie de la tête d'impression, adaptée de [86].	20
Figure 1.8 : Photographie de l'imprimante 3D utilisée au laboratoire de l'Université Laval, issue de [86].	21
Figure 1.9 : Perfusion du réseau de canaux dans un cube de PDMS.	21
Figure 2.1 : Exemple de boîtes de culture en plastique (des flacons T75 à gauche, des pétris et une plaque 6 puits à droite).	26
Figure 2.2 : Image au microscope optique d'ASC avant la trypsination (confluence 90%), Objectif 10x.	27
Figure 2.3 : Schéma d'un hématimètre (zones grises : zones de comptage du nombre de cellules).	27
Figure 2.4 : A) Moule en sucre vitrifié du cube perfusé. B) Cube d'alginate. C) Chambre de culture du bioréacteur dans lequel est cultivé le cube d'alginate.	28
Figure 2.5 : A) Exemple d'une image au microscope confocal d'un spécimen du groupe A (1.5 million cellules/mL). B) Evolution de la viabilité cellulaire de 24h à 8 semaines, adapté de [103].	29
Figure 2.6 : A) Modèle tridimensionnel généré par ordinateur à l'aide du logiciel Creo, issu de [103]. B) Photographie de l'impression 3D du moule en sucre.	29
Figure 2.7 : A) Dispositif du bioréacteur dans un incubateur. B) Chambre d'un bioréacteur QS avec le cube d'alginate à l'intérieur.	30
Figure 2.8 : Image de microscopie confocale d'un échantillon d'alginate avec des cellules induites mortes, densité de $3.65 \times 10^5$ cellules/mL.	32
Figure 2.9 : Image au microscope confocal d'un échantillon d'alginate après 20h de culture quasi statique A) à 3 millions de cellules, B) à 10 millions de cellules et C) Viabilité cellulaire après 20h de culture QS pour les alginates à 3 millions de cellules et à 10 millions de cellules.	32
Figure 2.10 : Densité cellulaire après 20h de culture quasi statique pour les alginates à 3 millions de cellules et à 10 millions de cellules.	33
Figure 2.11 : Densité de cellules vivantes après 20h de culture quasi statique pour les alginates à 3 millions de cellules et à 10 millions de cellules.	33
Figure 2.12 : A) Viabilité cellulaire après 20h de culture quasi statique pour les alginates avec cellules. B) Évolution de la viabilité de la semaine 0 à la semaine 8 de l'expérience de Simon Collin, issue de [103]. Groupe A : 3 millions de cellules ; Groupe B : 10 millions de cellules.	34
Figure 2.13 : Image de peau normale humaine obtenue par microscopie à fluorescence A) Témoin négatif et B) Marquage du collagène I.	37
Figure 2.14 : Image au microscope à fluorescence d'un échantillon d'alginate à 10 millions de cellules après 6 semaines de culture quasi statique A) Témoin négatif B) Marquage du collagène I. Objectif 10x.	37
Figure 2.15 : Image au microscope confocal d'échantillons d'alginate à 3 millions de cellules après A) 24h, B) 3 semaines, C) 6 semaines et D) 8 semaines de culture quasi statique. Objectif 10x.	38
Figure 2.16 : Image au confocal d'échantillons d'alginate à 10 millions de cellules après A) 24h, B) 3 semaines, C) 6 semaines et D) 8 semaines de culture quasi statique. Objectif 10x.	39
Figure 3.1 : Image d'une impression en cours d'un moule de valve aortique en sucre vitrifié.	42
Figure 3.2 : Étapes de fabrication d'une valve aortique par moulage dans un moule en sucre vitrifié.	43
Figure 3.3 : Image du premier moule conçu par l'équipe.	44

Figure 3.4 : Image de la valve aortique conçue sur Solidworks A) vue de dessous et B) vue de côté C) vue en coupe et D) image du moule avec la valve aortique vus en coupe. ....	45
Figure 3.5 : Image A) du moule avec la valve sur Solidworks, B) du moule imprimé en sucre vitrifié et C) de la valve après dissolution du sucre dans un bécher, vue de dessous. ....	45
Figure 3.6 : Capture d'écran de Repetier Host avec le déplacement de la tête d'impression en bleu clair. ....	46
Figure 3.7 : Capture d'écran de la fenêtre de Repetier Host avec la valve tranchée en bleu, le déplacement de la tête d'impression en bleu clair. ....	47
Figure 3.8 : Moule en format STL. ....	47
Figure 3.9 : Images A) du moule avec la recette glucose + sucrose + $\text{CaCl}_2$ et la valve en alginate résultante, B) vue de dessus et C) vue de côté. ....	48
Figure 3.10 : A) et B) Images du nouveau moule vue en coupe sur Solidworks. Image de la première valve moulée avec le nouveau moule C) vue de côté et D) vue de dessous. E) et F) Images vue de dessous d'autres valves produites avec ce moule. ....	49
Figure 3.11 : Image du moule avec un entonnoir A) conçu sur Solidworks B) imprimé en sucre vitrifié, C) du versement de l'alginate avec un bécher et de la valve moulée D) vue de côté, E) vue de dessous et F) vue de dessus. ....	50
Figure 3.12 : Image du moule sans cône A) conçu sur Solidworks B) imprimé en sucre vitrifié, et de la valve moulée C) vue de dessus et D) vue de dessous. ....	51
Figure 3.13 : A) Image du moule initial, B) du moule modifié, C) de la valve modifiée. D) Image de la valve et du moule modifiés sur Solidworks. ....	52
Figure 3.14 : Images A) et D) du moule en sucre de la géométrie finale et de la valve moulée avec la recette d'alginate finale B) et E) vue de côté et C) vue de dessus et F) vue de dessous. ....	53
Figure 4.1 : Hydrogel d'alginate formé par réticulation avec les ions calcium, structure en forme de "boîte d'œufs", issu de [110]. ....	54
Figure 4.2 : Images d'une valve moulée à 4% d'alginate A) vue de côté B) vue de dessus et C) vue de dessous. ....	55
Figure 4.3 : Images de valves à 4% d'alginate avec présence de trous A) et C) vues de dessus et B) et D) vues de dessous. ....	56
Figure 4.4 : Images A) du moule en sucre avec l'alginate à l'intérieur et de la valve en alginate à 4% colorée en rouge B) vue de côté et C) vue de dessous. ....	56
Figure 4.5 : Image d'une valve à 4% d'alginate avec 0.28% de GDL et 0.96% de $\text{CaCO}_3$ A) vue de côté, B) vue de dessus et C) vue de dessous. ....	57
Figure 4.6 : Image des différentes recettes d'alginate réalisées. ....	57
Figure 4.7 : Image de valves à 3.5% d'alginate A) et D) vues de côté, B) et E) vues de dessus et C) et F) vues de dessous. ....	58
Figure 4.8 : Images de valves à 3% d'alginate avec la dernière version du moule (Chapitre 3.2.3) A) et C) vues de côté, B) et E) vues de dessous et D) vue de dessus. ....	59
Figure 4.9 : Bioréacteur cardiaque conçu par notre équipe. ....	60
Figure 4.10 : Graphique de comparaison des dimensions de la valve théoriques et réelles, $n = 11$ . ....	61
Figure 4.11 : Graphique de comparaison des épaisseurs de la valve d'alginate théoriques et réelles, $n = 11$ . ....	62
Figure 4.12 : Image du support de valve pour le bioréacteur conçu sur PTC Creo. ....	62
Figure 4.13 : Courbe physiologique typique de débit chez un humain adulte au repos, issue de [117]. ....	63
Figure 4.14 : Courbe physiologique typique de pressions chez un adulte humain au repos, issue de [117]. Pression aortique (en noir) et pression ventriculaire (en rouge). ....	63
Figure 4.15 : Image de la valve à 3% d'alginate A) avant d'être placée dans le bioréacteur et B) après rupture dans le bioréacteur. ....	64
Figure 4.16 : Image d'une valve dans le support du bioréacteur A) vue de dessus et B) vue de dessous. C) Image de la valve vue de dessous dans le bioréacteur. ....	64

Figure 4.17 : Courbe de débit (débit moyen sur 15 cycles) obtenue avec le débitmètre pour une valve à 3% d'alginate.....	65
Figure 4.18 : Courbe de pressions (pressions moyennes sur 15 cycles) obtenues avec les capteurs de pression pour une valve à 3% d'alginate. Pression aortique (en noir) et pression ventriculaire (en rouge). ....	65
Figure 5.1 : Transfert d'un disque d'alginate dans une plaque 6 puits remplie de milieu.....	71
Figure 5.2 : A) Photographie d'un disque d'alginate à 3% après 24h de culture. Images prise au microscope confocal pour un disque à 3% d'alginate B) après 24h de culture et C) après 7 jours de culture. ....	73
Figure 5.3 : A) Viabilité (pourcentage de cellules vivantes), B) Densité cellulaire (% de la valeur initiale) et C) Densité de cellules totale (% de la valeur initiale) en fonction du pourcentage d'alginate après 24h et 7 jours de culture (test Anova à deux facteurs, * représente $p < 0.05$ , ** représente $p < 0.01$ et *** représente $p < 0.001$ ). .....	75
Figure 5.4 : Images de la valve conçue par Yannick Rioux A) vue de dessous et B) vue de dessus. Images de la valve résultante en alginate A) vue de dessous et B) vue de côté. ....	78

## Liste des tableaux

Tableau 1.1 : Tableau comparatif des principaux types de substituts de valves cardiaques en génie tissulaire .....	24
Tableau 5.1 : Comparaison des concentrations des cellules utilisées dans les échafaudages dans la littérature. ....	68
Tableau 5.2 : Tableau de la consistance des disques d'alginate selon le temps de culture et le pourcentage en alginate (1 : liquide, 2 : fluide visqueux, 3 : gel ; 4 : solide élastique ; 5 : rigide).....	72

## Liste des abréviations, sigles et acronymes

$\lambda$	Longueur d'onde
ASC	Cellules souches/stromales du tissu adipeux ( <i>Adipose derived Stromal/Stem Cells</i> )
CAVD	Maladie de la valve aortique calcifiée ( <i>Calcific Aortic Valve Disease</i> )
CaCl <sub>2</sub>	Chlorure de calcium
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
GDL	D glucono 1,5 lactone
IF	Immunofluorescence
LOEX	Centre de recherche en organogénèse expérimentale
MEC	Matrice extracellulaire
MOPS	Solution tampon acide 3-morpholino-1-propanesulfonique
OCT	<i>Optimal Cutting Temperature compound</i>
PBS	Solution tampon phosphate saline ( <i>Phosphate-buffered saline</i> )
PDMS	Polydimethylsiloxane
QS	Quasi statique
TEHV	Valve cardiaque en tissu biologique ( <i>Tissue Engineered Heart Valve</i> )
VEC	Cellule endothéliale valvulaire ( <i>Valvular Endothelial Cell</i> )
VIC	Cellule interstitielle valvulaire ( <i>Valvular Interstitial Cell</i> )

*A ma famille*

*« Espérer le meilleur sans perdre la lucidité  
du pire, c'est une intime sagesse. » John Joos*

# Remerciements

Je tiens à remercier Jean Ruel, mon directeur de recherche qui a su me guider tout en me laissant la liberté de réaliser mon projet. Tous ses mots d'encouragement m'ont permis de rester optimiste et d'avoir envie de surmonter les obstacles de ma maîtrise. Merci pour ces réunions hebdomadaires simples, efficaces et toujours utiles. Un grand merci à mon co-directeur André Bégin-Drolet pour m'avoir épaulée tout au long de ce travail, pour son soutien et ses précieux conseils et idées.

Je tiens à remercier ma co-directrice Julie Fradette qui m'a beaucoup appris sur la biologie cellulaire. Merci pour ton enthousiasme entraînant, ta rigueur et pour le temps que tu m'as accordé malgré tes nombreux projets. Je tiens aussi à remercier Cindy pour sa précieuse aide pour les manipulations au LOEX, pour ses conseils et sa gentillesse. Un grand merci aux autres membres du LOEX qui m'ont accompagnée lors de mes expériences, merci notamment à Alyssa et Luis pour m'avoir prêté main forte en salle de culture, c'est un très grand plaisir de vous avoir rencontrés. Merci aussi à Dominique pour les différentes formations.

Je tiens à remercier tous les membres du bureau de design à l'Université Laval. En particulier, merci à Simon qui m'a transmis tout son savoir sur le projet valve, merci à Alexandre pour la formation à l'impression 3D de sucre et pour ses astuces, merci à Roxanne pour son aide avec l'impression de sucre et l'alginate, merci à Jérôme pour m'avoir formée sur le bioréacteur cardiaque, et merci aux techniciens des ateliers de génie mécanique pour leur aide précieuse tout au long de mon projet. Je tiens aussi à remercier Yannick qui reprend le flambeau du projet. Avec ta curiosité et ta volonté, je sais qu'il est entre de bonnes mains.

Enfin, j'aimerais remercier toute ma famille qui m'a toujours soutenue depuis la France et qui m'a toujours encouragée dans mes choix de projets. Une attention particulière à ma mère, Anne, pour sa participation à la relecture de mon mémoire. Je tiens aussi à remercier mes amis que j'ai rencontrés au Québec, en particulier les membres de l'UFL et le Crew 217, sans qui je n'aurais pas vécu une si belle aventure.

Dans un contexte particulier de pandémie mondiale, période pendant laquelle il y avait beaucoup d'incertitudes et de contraintes, j'ai pu effectuer mes travaux de recherche sur place grâce à la persévérance du personnel de l'université et garder la motivation grâce au soutien de mes professeurs et de mon entourage. Cette maîtrise m'a permis de développer de nombreuses connaissances et de prendre confiance en moi. La première fois que Jean m'a parlé ce projet ambitieux, il m'avait précisé qu'une des qualités recherchées était la débrouillardise. J'avais de l'appréhension quant à cette qualité que je ne pensais pas avoir mais j'ai accepté le projet car il était très intéressant et en accord avec mes valeurs. J'ai découvert qu'en réalité j'aimais bien la débrouillardise et ce projet m'a permis de la développer dans de nombreux domaines. Je n'ai aucun regret à avoir accepté ce *challenge*, au contraire je suis fière du travail accompli et reconnaissante de la confiance que l'on m'a accordée.

# Introduction

« Le progrès ne vaut que s'il est partagé par tous »<sup>1</sup>. La médecine a progressé de manière exponentielle ces dernières années avec la montée des nouvelles technologies. Le but étant d'améliorer les conditions de vie de tous. Ainsi, que ce soit les vaccins, les médicaments ou bien les tests sur les produits que nous utilisons tous les jours, les scientifiques se démènent pour comprendre les causes et les traitements de maladies. Cependant, avec l'augmentation de l'espérance de vie, de nouvelles maladies apparaissent et certaines demeurent incurables. Aujourd'hui, le besoin de chercheurs en génie biomédical, en biomécanique ou en biologie cellulaire est éminent.

Le nombre de patients présentant des maladies cardiovasculaires ne cesse de croître, en particulier chez les personnes âgées. Ce nombre devrait tripler d'ici 2050 [1]. Ainsi, les maladies valvulaires cardiaques sont au centre de la recherche. La sténose aortique atteint approximativement 1.5 million de personnes aux États-Unis. Le taux de survie de patients avec une sténose aortique sévère est inférieur à 50% après deux ans et 20% après cinq ans [2, 3]. Cette maladie touche la valve aortique, qui est sténosée, c'est-à-dire que son ouverture est plus petite que la normale. Une autre maladie valvulaire touchant cette valve est l'insuffisance aortique, lorsqu'elle ne se referme pas de façon étanche [4]. Il existe déjà des manières de remplacer les valves par des dispositifs mécaniques, mais ils se calcifient dans le temps [5]. Ainsi, ces derniers doivent être changés régulièrement, nécessitant d'opérer le patient plusieurs fois. De plus, un traitement à vie d'anticoagulant est obligatoire. En particulier, pour les jeunes patients, ces valves mécaniques ne sont pas adaptées étant donné qu'elles ne peuvent pas croître, ni se régénérer [6].

De nombreux scientifiques ont essayé de trouver des alternatives pour fabriquer une valve durable avec des tissus biologiques afin de contrer ce problème, la plupart sur la base de tissus animaux décellularisés. La décellularisation permet de retirer tous les éléments cellulaires d'un tissu grâce à différentes méthodes (chimiques, physiques, etc.) [7]. Les valves décellularisées ont pour avantage de contenir les protéines nécessaires pour leur bon fonctionnement mais les risques infectieux sont importants. Il est aussi possible de fabriquer des tissus avec les avancées en bio-impression 3D. Cette dernière permet la construction de tissus, couche par couche, jusqu'à obtenir la forme désirée. Il existe plusieurs techniques qui seront décrites dans la revue de littérature, la plus répandue est l'extrusion directe : un hydrogel contenant des cellules est directement imprimé avec une forme voulue. Cependant, les inconvénients de ces techniques sont que l'impression peut être longue et que les cellules peuvent subir des contraintes mécaniques.

---

<sup>1</sup> Citation d'Aristote

Un autre problème majeur est la vascularisation du tissu qui est importante, surtout pour des tissus épais. Ainsi, d'autres méthodes ont été trouvées pour contrer ce problème : la réalisation d'un moule en sucre vitrifié. L'équipe de Miller a réussi à développer des réseaux vasculaires artificiels en imprimant en 3D une structure de sucre [8]. L'hydrogel contenant des cellules est ensuite versé dans le moule et ce dernier est dissous avec un milieu aqueux. La structure est ainsi réalisée et peut contenir des canaux sans que les cellules aient subi des contraintes mécaniques importantes, un avantage majeur pour la viabilité de ces dernières.

## **Contexte et description du projet**

Mon projet de recherche, proposé par les professeurs en génie mécanique Jean Ruel et André Bégin-Drolet de l'Université Laval, en collaboration avec la professeure du département de chirurgie Julie Fradette, a pour objet la fabrication d'une valve aortique par génie tissulaire. Il s'inscrit dans le domaine biomédical, univers dans lequel des chercheurs de l'ingénierie et de la médecine travaillent conjointement afin de trouver des systèmes, procédés, etc. pour contribuer à l'amélioration de la santé des patients. Il a pour atout d'être multidisciplinaire avec une dimension anthropologique car le but ultime est de développer un dispositif permettant d'aider les personnes atteintes d'une malformation de leur valve aortique.

Ces travaux font partie d'un programme de plus grande ampleur financé par *New Frontiers* combinant génie tissulaire et connaissances en biologie cellulaire et en mécanique. Le but est de produire une valve biologique avec les mêmes propriétés anatomiques, biologiques et mécaniques qu'une valve native humaine en santé. Les deux objectifs principaux du programme de recherche sont : 1) Développer un procédé de fabrication innovant pour la reconstruction d'une valve aortique en utilisant des technologies et des outils de pointe, 2) Utiliser les cellules souches mésenchymateuses pour la valve de substitution et vérifier si la modification génétique de ces cellules pourrait empêcher leur minéralisation et leur calcification, un phénomène connu pour contribuer à la détérioration de la valve *in vivo*<sup>2</sup>. La fabrication par génie tissulaire d'un substitut de valve aortique fait partie du premier objectif. Le deuxième objectif est réalisé en parallèle par Alyssa Brodeur, étudiante au doctorat à l'Université Laval.

L'étude est réalisée en collaboration avec le Laboratoire d'Organogénèse Expérimentale (LOEX) regroupant des chercheurs et des professionnels de recherche experts en génie tissulaire. Les expériences comportant l'utilisation de cellules ainsi que les analyses ont été réalisées dans ce laboratoire. L'équipe du Pr. Jean Ruel travaille depuis longtemps sur ce projet, plusieurs techniques ont été testées. La plus prometteuse est la fabrication d'un moule en sucre vitrifié par impression 3D. Un hydrogel comportant des cellules est ensuite coulé dans le moule. Une fois que l'hydrogel est gélifié, le moule est dissous dans une solution aqueuse laissant place à la structure.

---

<sup>2</sup> *Dans un être vivant*

Dans l'objectif de produire des tissus biologiques pour l'application de génie tissulaire telle que la valve aortique, l'étudiant à la maîtrise Simon Collin a développé des protocoles pour fabriquer du tissu contenant des cellules stromales dérivées du tissu adipeux (en anglais *Adipose derived Stem/Stromal Cell* ; ASC) et assurer leur viabilité. Pour ce faire, il a conçu un moule en sucre vitrifié permettant de fabriquer un cube d'alginate avec des canaux internes, dans lequel les cellules étaient incorporées. Le cube a ensuite été mis dans un bioréacteur avec un flux constant de milieu de culture. Tout le système était en conditions stériles dans un incubateur à 37°C et 8% de dioxyde de carbone afin de reproduire l'environnement du corps humain. Différents tests ont été réalisés sur plusieurs semaines de culture en bioréacteur, afin de voir lesquels étaient les plus pertinents pour observer la viabilité des cellules dans l'alginate. Des essais de viabilité ont été effectués et il en a été conclu que la viabilité des cellules était élevée même si elle n'est pas proche des 100% désirés [9].

A la suite de ces résultats, l'objectif de mes travaux de maîtrise a été de fabriquer une valve aortique avec des tissus biologiques. Pour ce faire, deux objectifs principaux ont été définis. Le premier était de fabriquer une valve aortique avec une résistance mécanique suffisamment importante avec la méthode élaborée par l'équipe de recherche, sans utiliser de cellules dans un premier temps. Le deuxième objectif, dans la perspective d'incorporer des ASC dans la valve, était d'étudier l'impact de la concentration d'alginate sur la viabilité cellulaire. La section suivante décrit plus en détails la structure du mémoire.

## **Structure du mémoire**

Le mémoire est divisé en cinq grandes parties afin de répondre aux objectifs décrits ci-dessus. Dans un premier temps, une revue de littérature permet de contextualiser et de comprendre les enjeux du projet. Le système cardiovasculaire ainsi que la structure de la valve aortique sont expliqués. Puis, les maladies cardiovasculaires et les remplacements possibles de la valve aortique sont présentés. Enfin, les éléments du procédé de fabrication choisi par notre équipe sont détaillés, c'est-à-dire l'impression 3D de sucre vitrifié, l'alginate et les cellules souches/stromales issues du tissu adipeux (ASC). Le deuxième chapitre résume les différents essais préliminaires réalisés avant de pouvoir répondre aux objectifs. Ils consistent en la présentation des bases de la culture cellulaire, des essais similaires à l'expérience réalisée par Simon Collin mais sans cellule, et des analyses d'immunofluorescence sur les cubes d'alginate pour détecter les protéines produites par les cellules. Afin de répondre au premier objectif, le troisième chapitre montre les différents essais réalisés pour fabriquer un moule en sucre vitrifié en forme de valve aortique. Il témoigne des défis rencontrés pour imprimer avec du sucre une géométrie complexe et une description des paramètres d'impression et de la géométrie finale du moule. Puis, le quatrième chapitre présente les différents essais réalisés avec l'hydrogel d'alginate afin de mouler une valve aortique sans défaut et les différents essais en bioréacteur cardiaque afin d'évaluer le comportement de la valve dans des conditions de débit et de pression similaires aux conditions physiologiques.

Afin de répondre au deuxième objectif, une expérience réalisée au LOEX pour voir l'influence de la concentration d'alginate sur la viabilité des ASC est décrite dans le dernier chapitre. La viabilité est évaluée sur des disques d'alginate contenant des cellules pour trois concentrations différentes d'alginate. En conclusion, les objectifs ont été atteints avec des résultats encourageants pour l'influence de la concentration d'alginate sur les cellules. Des avancées ont été faites quant à la fabrication d'une valve aortique en alginate par moulage dans un moule en sucre fabriqué par impression 3D. Néanmoins, encore trop de valves présentent des défauts de moulage. Des pistes d'amélioration sont envisagées et l'étudiant qui poursuit le projet a obtenu des résultats encourageants. Les perspectives sont nombreuses et chaque découverte est un pas vers l'objectif final : fabriquer une valve aortique biologique avec les mêmes propriétés qu'une valve aortique saine.

# Chapitre 1 Revue de littérature

L'objectif principal du projet est de fabriquer un substitut de valve aortique par génie tissulaire. Pour ce faire, des généralités sur le système cardiovasculaire et l'anatomie de la valve aortique seront détaillées afin de comprendre les caractéristiques et les propriétés de cette dernière. Ensuite, une analyse des technologies existantes ainsi que des recherches effectuées pour fabriquer des substituts de valves cardiaques seront présentées. Enfin, une description plus détaillée sur les choix effectués par l'équipe de recherche pour la fabrication de ce substitut sera établie, c'est-à-dire l'impression 3D d'un moule en sucre vitrifié, dans lequel est coulé une solution d'alginate, à laquelle des cellules stromales issues du tissu adipeux ont été incorporées.

## 1.1 Système cardiovasculaire

### 1.1.1 Système cardiaque

Le but du système cardiovasculaire est de maintenir l'homéostasie dans un corps qui contient des milliards de cellules proches les unes des autres. L'homéostasie est un « processus physiologique selon lequel les systèmes internes du corps (pression sanguine, température du corps, etc.) sont maintenus à l'équilibre, malgré les variations des conditions externes ». (traduction personnelle, [10]).

Le cœur est une pompe qui se situe au centre de la cavité thoracique et qui est rattachée à des vaisseaux dans une enveloppe fibreuse, appelée péricarde. Une petite quantité de fluide est présente dans le péricarde afin de lubrifier la surface du cœur et lui permettre de bouger pendant la contraction et la relaxation. Le cœur est composé de quatre parties, appelées cavités. Les deux cavités supérieures sont les oreillettes et les cavités inférieures sont les ventricules (**Figure 1.1**). Le cœur droit (oreillette droite et ventricule droit) donne la force nécessaire pour envoyer le sang dans les vaisseaux pulmonaires et le cœur gauche (oreillette gauche et ventricule gauche) donne la force nécessaire pour l'envoyer aux organes du corps humain [11]. Quatre valves régulent le flux sanguin, elles sont divisées en deux catégories : les valves semi-lunaires (valve pulmonaire et aortique) et les valves atrio-ventriculaires (valve mitrale et tricuspide) [12] (**Figure 1.2**).

Le système cardiovasculaire fonctionne en cycle pendant lequel le sang passe dans les différentes parties du cœur (**Figure 1.1**). Le sang veineux, déficient en oxygène, revient des organes vers l'oreillette droite via la veine cave. Il passe par la valve tricuspide dans le ventricule droit et est pompé à travers la valve pulmonaire dans le système pulmonaire via les artères pulmonaires. Le sang est « réoxygéné » dans les capillaires du poumon. Le flux de sang oxygéné passe dans les veines pulmonaires vers l'oreillette gauche, et passe à travers la valve mitrale dans le ventricule gauche. Il est ensuite pompé à travers la valve aortique dans l'aorte pour être distribué aux différents organes. Puis, le cycle recommence [11].

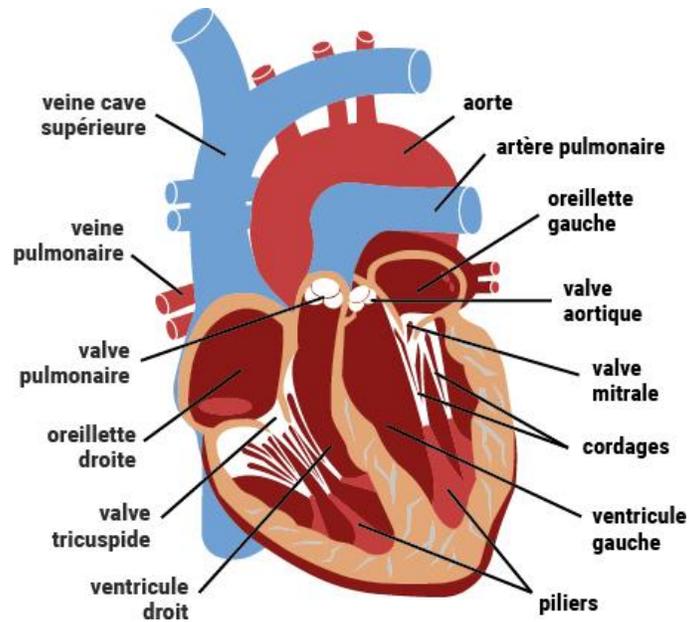


Figure 1.1 : Schéma de la structure anatomique du cœur, issu de [13].

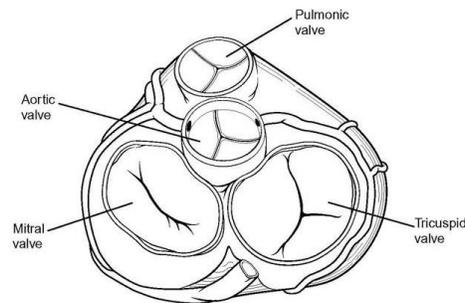


Figure 1.2 : Valves cardiaques vue de haut, issu de [12].

Le cycle cardiaque peut être décrit en deux temps :

- La systole : les cellules musculaires du ventricule se contractent, la pression est plus haute dans le ventricule que dans l'oreillette, les valves atrio-ventriculaires se ferment.
- La diastole : Les cellules musculaires du ventricule se relâchent, la pression est plus basse dans le ventricule que dans l'oreillette, les valves atrio-ventriculaires s'ouvrent.

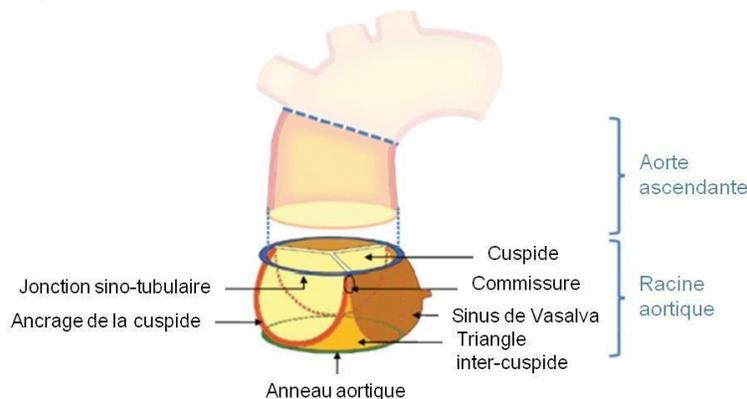
Afin de s'assurer d'un pompage efficace, le cœur doit répondre à plusieurs critères :

- Les contractions des cellules cardiaques musculaires doivent avoir lieu à des intervalles réguliers et être synchronisées.
- Les valves doivent s'ouvrir complètement (pas de sténose) et ne pas fuir (pas d'insuffisance).
- Les contractions du muscle cardiaque doivent être énergiques.
- Les ventricules doivent se remplir de manière adéquate pendant la diastole [14].

### 1.1.2 Structure macroscopique de la valve aortique

Toutes les valves, sauf la mitrale, sont composées de trois feuillets entourés de tissus fibreux qui forment des anneaux valvulaires. Les valves auriculo-ventriculaires diffèrent des valves semi-lunaires par la présence de cordage tendineux qui attachent ces dernières aux muscles papillaires des ventricules. En effet, si toutes les valves avaient la même structure anatomique, la pression exercée sur le sang lors de la systole ventriculaire permettrait le reflux sanguin vers l'oreillette. Ainsi, le réseau de cordage tendineux contre ce problème.

La valve aortique se situe entre le ventricule gauche et l'aorte (**Figure 1.1**), et permet le transfert du sang oxygéné vers les différents organes du corps humain. Elle s'ouvre passivement un peu plus de 100 000 fois par jour [15]. Celle-ci doit avoir des propriétés mécaniques lui permettant de résister aux contraintes s'exerçant sur elle et assurer le transfert unidirectionnel du sang. Elle est composée de six éléments : les cuspidés ou feuillets, le site d'ancrage des cuspidés, les triangles inter-cuspidés, les sinus de Valsalva, la jonction sino-tubulaire et l'anneau aortique [16] (**Figure 1.3**).

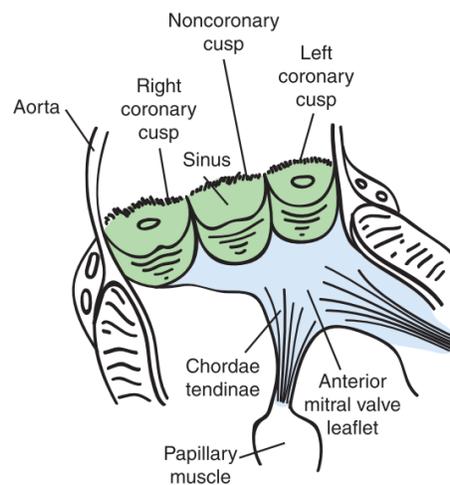


**Figure 1.3 : Schéma de la constitution anatomique d'une valve aortique, issu de [17].**

L'anneau aortique est la jonction entre la valve aortique et le septum ventriculaire. Il est composé principalement de collagènes et sert de support à la valve aortique. Les trois parties supérieures de l'anneau sont les commissures. Elles représentent les points d'attache des feuillets à la valve [12]. Elles ont une structure fibreuse, soutiennent les feuillets et sont situées au-dessus des triangles inter-cuspidés. Ces derniers sont une extension de la voie d'éjection du ventricule gauche et présentent une zone de fragilité [14].

Les sinus de Valsalva sont des renflements de la racine aortique, chacun fait face à un feuillet. Deux de ces sinus donnent naissance aux artères coronaires, ils sont nommés sinus coronaire droit et sinus coronaire gauche. Le dernier sinus est appelé sinus non-coronaire et est souvent un peu plus gros que les deux autres (**Figure 1.4**). Les sinus n'ont pas d'effet de performance sur la valve mais diminuent les contraintes mécaniques sur les cuspidés aortiques pendant le cycle cardiaque en créant des tourbillons entre eux et les feuillets [18].

Les sinus sont composés de collagène à la base et la concentration d'élastine augmente progressivement à l'approche de la jonction sino-tubulaire. Cette dernière est la transition entre la racine aortique et l'aorte ascendante [16]. Les feuillets (ou cuspidés) sont les éléments principaux de la valve aortique. Ils assurent le flux unidirectionnel du sang étant donné qu'ils s'ouvrent uniquement à haute pression, c'est-à-dire lorsque le ventricule atteint 120 mmHg [19]. Comme les sinus, ils sont en nombre de trois et sont appelés feuillet coronaire droit, feuillet coronaire gauche et feuillet non-coronaire, ce dernier étant plus gros que les deux autres. Néanmoins, aucune signification clinique n'a été trouvée pour expliquer cette différence de taille. Chaque feuillet a deux côtés libres partagés chacun avec le feuillet adjacent. Au centre de chaque côté libre se trouve le nodule d'Arantius, ces derniers se touchent lors de la fermeture de la valve. L'extrémité de chaque feuillet est un peu plus épaisse et est appelée lunule. Les lunules de feuillets adjacents se chevauchent quand la valve se ferme, elles ont un rôle de support supplémentaire à la valve [12].



**Figure 1.4 : Schéma d'une racine aortique ouverte longitudinalement, issu de [20].**

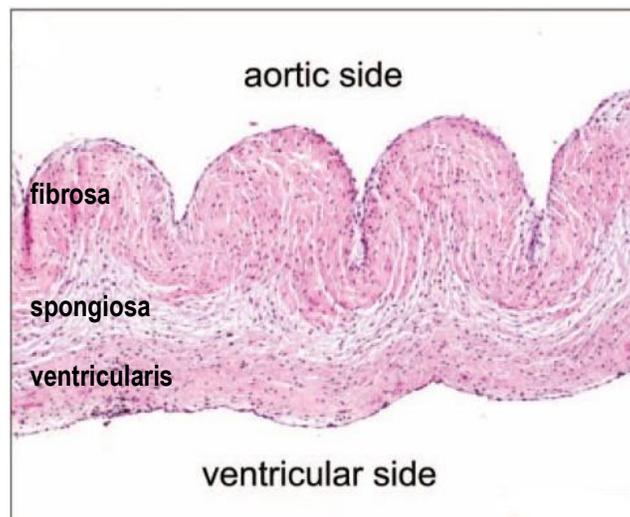
### 1.1.3 Structure microscopique de la valve aortique

La valve aortique a pour objectif de faciliter un flux unidirectionnel du sang en maximisant le débit du flux et en minimisant sa résistance [21].

Une matrice extracellulaire (MEC) représente l'ensemble des molécules structurales et fonctionnelles sécrétées par les cellules d'un tissu. La MEC d'une valve aortique est composée principalement de collagène, d'élastine et de glycosaminoglycanes. Ces protéines encouragent la survie des cellules ainsi que leur fonctionnement. Les fibres de collagènes (type I et III) représentent 90% de la MEC [12, 22, 23]. Cette dernière peut être remodelée par les métalloprotéinases matricielles, des protéases qui permettent la dégradation de l'ensemble des composants de la MEC. Leur activité est régulée par des inhibiteurs, nommés les protéines inhibitrices de métalloprotéases matricielles.

La valve aortique a une composition trilaminaire lorsque visualisée en coupe transversale (**Figure 1.5**) :

- La fibrosa (couche externe) est une couche de support la plus proche du sinus, deux fois plus épaisse que le ventricularis. Elle est riche en collagène, ce qui permet de résister aux contraintes mécaniques en diastole. Les fibres de collagène sont ondulées et alignées circonférentiellement. Il y a des traces d'élastine mais cette protéine joue un rôle mineur.
- La spongiosa a une grande concentration de glycosaminoglycanes hydratés et de protéoglycanes pour lubrifier la fibrosa et le ventricularis afin d'éviter la délamination. Elle participe à l'absorption des chocs mécaniques et à une meilleure diffusion des nutriments et de l'oxygène dans le tissu valvulaire. Selon *Latif et al.*, les glycosaminoglycanes et les protéoglycanes serviraient aussi à réguler la séquestration de médiateurs solubles tels que les facteurs de croissance. En somme, c'est un réseau lâche de collagène reliant la fibrosa et le ventricularis [24, 25].
- Le ventricularis (couche interne) est élastique et fait face au ventricule gauche. Il est principalement composé d'élastine car il subit une extension plus grande que la fibrosa, ceci évite une fatigue au long terme. En effet, pendant la diastole, les feuillets sont en position fermée et présentent une certaine courbure ; le ventricularis étant à l'extérieur de la courbure, il subit une bien plus grande déformation que la fibrosa. Les fibres d'élastine sont alignées radialement afin de diminuer les efforts radiaux quand le flux sanguin est maximal, soit lorsque la valve est complètement ouverte [21, 26, 27].



**Figure 1.5 : Section histologique d'une valve aortique porcine normale colorée avec de l'hématoxyline et de l'éosine, adaptée de [28].**

Les cellules principales de la valve aortique sont les cellules endothéliales valvulaires (en anglais *Valvular Endothelial Cells*, VEC) et les cellules interstitielles valvulaires (en anglais *Valvular Interstitial Cells*, VIC). Ces cellules participent à la synthèse et au maintien des éléments de la MEC permettant le maintien de l'homéostasie

du tissu lors d'un fonctionnement quotidien de la valve cardiaque. Elles pourraient être à l'origine de certains évènements pathologiques comme la calcification [25, 29].

Les VIC sont présentes dans toutes les couches de la valve et sont cruciales pour le fonctionnement valvulaire et la synthèse de la MEC. Elles organisent et remodelent les protéines de cette dernière pour résister aux pressions dynamiques du tissu. Uniquement les cellules interstitielles activées peuvent se différencier en une variété d'autres types de cellules tels que les myofibroblastes ou les fibroblastes [19, 21, 22, 30]. Elles ont un comportement plastique et, en condition normale, ont un phénotype proche des fibroblastes. Chez le fœtus humain et dans certaines pathologies comme la dégénérescence myxomateuse, maladie où les cordages de la valve perdent progressivement leur force et leur résistance [31], la majorité des VIC sont des myofibroblastes activés de phénotype positif à l'alpha actine du muscle lisse [32]. Les fibroblastes produisent et sécrètent la majorité de la MEC environnante et les cellules musculaires lisses sécrètent des enzymes protéolytiques (métalloprotéases matricielles) et des protéines inhibitrices de métalloprotéases matricielles pour aider à la régénération des valves [20].

Les feuillets valvulaires sont recouverts d'une monocouche de cellules endothéliales. Ces dernières sont responsables du maintien de cette surface de contact avec le sang en s'assurant d'avoir un sang non thrombogène, en transmettant les nutriments et en envoyant des signaux biochimiques aux cellules interstitielles [19, 22]. Les VEC régulent la vasoconstriction, l'inflammation et la régénération. Elles sont alignées avec l'orientation circonférentielle des fibres de collagène [33].

En résumé, les cellules constituant la valve aortique sont les cellules interstitielles valvulaires (cellules musculaires lisses, fibroblastes et myofibroblastes) et les cellules endothéliales valvulaires. Les cellules musculaires lisses et les myofibroblastes sont essentiellement présents dans la fibrosa. Les fibroblastes sont majoritairement dans le ventricularis. La spongiosa recueille peu de cellules [29].

## 1.2 Maladies cardiovasculaires

Le nombre de patients présentant des maladies cardiovasculaires ne cesse de croître, en particulier chez les personnes âgées. Ce nombre devrait tripler d'ici 2050 [1]. Elles peuvent toucher les jeunes patients qui présentent une malformation cardiaque. La bicuspidie aortique, par exemple, est une déformation de la valve aortique qui est constituée de deux feuillets valvulaires au lieu de trois et touche 1% de la population [34]. Ces maladies, comme les maladies valvulaires cardiaques, font l'objet de nombreux sujets de recherche visant à prolonger l'espérance de vie des patients. Une maladie valvulaire est présente lorsqu'une valve est sténosée, c'est-à-dire que l'ouverture de cette dernière est plus petite que la normale, ou bien quand la valve ne se referme pas de façon étanche [4]. La majorité de ces pathologies sont des maladies de valves aortiques calcifiées (en anglais *Calcific Aortic Valve Disease* ; CAVD). La calcification de la valve se manifeste en premier par un endommagement de la couche endothéliale, usuellement du côté aortique des feuillets. Ensuite, la matrice de la valve subit une réorganisation lente via une mauvaise régulation de métalloprotéases matricielles entraînant

un épaississement de la valve (sclérose). Les cellules inflammatoires pénètrent les feuillets en même temps que se passe l'angiogenèse avec un dépôt de lipides, de protéoglycanes et de débris cellulaires qui déforment le feuillet. Pendant ce processus, la matrice de la valve se calcifie et les feuillets aortiques se rigidifient causant la sténose aortique [35].

Les causes de la calcification sont multifactorielles : inflammation, stress oxydatif, surcharge de lipides, atteinte de l'endothélium, etc. L'apparition de myofibroblastes est un indicateur de CAVD précoce [25]. En effet, les VIC des valves pathologiques se différencient en myofibroblastes au lieu de fibroblastes dans les valves saines pour réparer les tissus. L'augmentation de cellules inflammatoires induit l'activation de myofibroblastes. Leur sécrétion de métalloprotéases matricielles et de cathepsine peut détruire la structure de la matrice contenant des protéines tels que le collagène et l'élastine, les agrégats de cellules présents dans cette dernière subissent l'apoptose entraînant la sédimentation de sels de calcium autour des protéines (nucléation) : ce phénomène est appelé la calcification dystrophique [19]. Un autre mécanisme responsable de la calcification serait la différenciation ostéogénique. Il a été montré que les valves calcifiées contiennent des cellules interstitielles exprimant un ensemble de gènes liés aux ostéoblastes, qui sont les cellules responsables de la formation de l'os. La galectine-3, une molécule pro-inflammatoire, participerait à l'ostéogenèse vasculaire. Elle est exprimée spontanément dans les VIC de la valve aortique mais de manière plus importante dans les valves sténosées. Cette molécule pourrait promouvoir la calcification des valves aortiques en modulant l'ostéogenèse des VIC [36].

## 1.3 Remplacement de la valve aortique

### 1.3.1 Procédés existants

Quatre-vingt-dix pour cent des patients avec une sténose aortique sévère ont une espérance de vie inférieure à 10 ans et 50% de ces patients présentant un autre problème cardiaque mourront en un an, d'où la nécessité de trouver des traitements efficaces pour contrer ce problème [19]. Les substituts mécaniques disponibles présentent plusieurs inconvénients, dont la prise de médicaments anticoagulants ainsi que la calcification [5]. De plus, ces dispositifs ne sont pas adaptés pour les jeunes patients à cause de leur taille inadéquate et de leur absence d'expansion [6]. La valve mécanique la plus standard utilisée depuis des décennies est la *Starr-Edwards silastic ball valve* en raison de sa durabilité et sa fiabilité [18]. D'autres valves sont développées présentement, comme, la valve aortique *Tria LifePolymer* [37] de Folax en siloxane poly(urethane-uea) qui, comparé aux autres valves en polymère, ne présente pas de calcification. Des études cliniques sont en prévision. Néanmoins, il reste des difficultés à s'assurer que le polymère aura les mêmes performances au long terme *in vivo*.

Les scientifiques ont développé des bioprothèses de valves à partir de valves aortiques porcines ou de péricarde bovin monté dans un stent avec du polyester qui sont implantées chez les patients. *Perseval S*, par exemple, est une bioprothèse de valve composée d'un péricarde bovin fixé par du glutaraldéhyde et traité avec de l'acide homocystéique pour retirer les résidus d'aldéhydes libres et minimiser la calcification. Le péricarde bovin est fixé dans une cage faite d'un alliage de métal super élastique, le nitinol [38, 39]. Ainsi, cette valve est capable d'accepter de grandes déformations et de retourner à sa forme initiale en absence de pression. L'inconvénient de cette technologie est sa dégénération due à la fatigue du tissu et à la calcification. Les valves deviennent sténosées, incompetentes ou les deux. Leur durabilité dépend beaucoup de l'âge du patient [18, 39]. Par exemple, une étude menée sur 478 patients avec une valve péricardique *Carpentier-Edwards PERIMOUNT* montre qu'environ 50% des patients âgés de moins de 50 ans ont dû se faire ré-opérer 15 ans après l'opération à cause d'une défaillance de tissu contre uniquement environ 18% pour les personnes de plus de 60 ans [40]. Dans certains cas, l'homogreffe est à privilégier, celle-ci est une greffe pour laquelle le donneur du greffon appartient à la même espèce que le receveur. Il existe trois types de donneurs pour une valve cardiaque : les donneurs vivants ayant subi une greffe de cœur et dont la valve est intacte, les donneurs avec un diagnostic de mort cérébrale, et les cadavres humains avec une asystolie de moins de huit heures [41]. L'homogreffe est utilisée pour ses performances hémodynamiques, elle consiste en un remplacement complet de la racine aortique. La taille des valves du donneur et celle de la racine aortique du destinataire doivent correspondre. Les problèmes liés à l'homogreffe sont la disponibilité, la stérilisation, la préservation de la valve, ainsi qu'un traitement antirejet à vie. Elle a une durabilité limitée, du même ordre que les bioprothèses, et est techniquement difficile à implanter. De plus, la valve est chère à se procurer et à conserver [18].

Les problèmes majeurs de tous ces procédés sont la limite de leur durabilité et de leur adaptation au corps humain.

### 1.3.2 Le génie tissulaire et les types de tissus pour remplacer des valves cardiaques

Le génie tissulaire est un regroupement des principes et de méthodes de génie ainsi que des sciences de la vie visant la reconstruction de structures et de tissus à partir de cellules vivantes pour des usages in vivo et in vitro<sup>3</sup>. Il permet entre autres d'implanter des tissus reconstruits in vitro à partir de cellules et d'un échafaudage. Ces alternatives aux valves mécaniques existantes pour fabriquer une valve durable avec des tissus biologiques sont communément appelées TEHVs (*Tissue Engineered Heart Valves*). Il existe différents échafaudages pour en fabriquer : valves décellularisées, matrices résorbables, méthode d'auto-assemblage. Des méthodes différentes pour assembler l'échafaudage et les cellules seront détaillées : la bio-impression 3D et le moulage.

---

<sup>3</sup> En milieu artificiel, en laboratoire

Un résumé des différents échafaudages utilisés pour la reconstruction de valves cardiaques est présenté dans le **Tableau 1.1 (Chapitre 1.5)**.

Les valves décellularisées proviennent souvent de la décellularisation de tissus animaux. La décellularisation permet de retirer tous les éléments cellulaires d'un tissu grâce à différents traitements chimiques, physiques ou biologiques [7]. Le tissu résultant conserve les composants de la MEC nécessaires pour maintenir sa forme initiale [42]. Les sources xénogéniques sont souvent les cochons, les vaches ou les chevaux. Les limites de l'utilisation de ces matériaux sont les risques infectieux et immunogènes (**Tableau 1.1, Chapitre 1.5**). Ce procédé n'est pas adapté pour les enfants et les jeunes adultes car il peut provoquer sténose, rupture, rejet immunitaire ou calcification [43, 44]. En effet, trois patients pédiatriques sur quatre sont décédés lors d'un essai clinique d'implant d'une valve porcine décellularisée [45]. Une autre étude menée sur 93 patients ayant aussi reçu un implant de valve porcine décellularisée a montré que plus de 75% des patients avaient une défaillance de leur valve 36 mois après l'implantation. Cette défaillance est due à plusieurs causes mais des données histologiques ont révélé la présence de cellules géantes inflammatoires dans les valves [46]. Les valves décellularisées peuvent aussi être recellularisées en implantant des cellules à la surface des feuillets [42, 47]. C'est un procédé assez long nécessitant 4 à 6 semaines de culture in vitro [47].

Il est possible de construire des matrices résorbables naturelles, synthétiques ou hybrides, la majorité sont des hydrogels. Les hydrogels contiennent beaucoup d'eau et sont utilisés en génie tissulaire pour leur bonne biocompatibilité et leur biodégradabilité. Leur avantage est leur ressemblance structurelle avec la MEC, leur réseau riche en eau crée un environnement propice à l'encapsulation des cellules [48, 49]. Ils favorisent la croissance des cellules avec un bon échange en oxygène et en nutriments, ainsi qu'en substances métaboliques et en déchets cellulaires.

Les échafaudages naturels sont des protéines ou des polysaccharides. Les protéines sont des composants purs de la MEC, comme le collagène ou la fibrine. Celle majoritairement utilisée est le collagène de type I, elle est notamment excellente pour le développement de vaisseaux sanguins artificiels [49]. Les gels de fibrine autologues assurent une distribution uniforme des cellules et un développement rapide du tissu sans dégradation toxique, ni de réactions inflammatoires. Ces propriétés importantes en font aussi un échafaudage idéal [50-52]. Des essais in vivo chez des ovins ont été réalisés avec des valves autologues à base de fibrine. Les conduits de valve explantés trois mois après implantation présentaient un tissu consistant, mais les feuillets présentaient une insuffisance due à la contraction du tissu [53]. Les polysaccharides, tel que l'alginate, sont biocompatibles, biodégradables et ont des propriétés excellentes quant à la formation de gel. L'inconvénient des hydrogels naturels sont leurs propriétés mécaniques faibles, difficiles à contrôler et à ajuster, et leur potentiel à provoquer des réactions immunitaires. Différents procédés, comme la réticulation, la polymérisation, etc., permettent de contrer certains de ces inconvénients [49, 54].

Les échafaudages synthétiques peuvent être biodégradables et sont faits à partir de polymères. Ils ont l'avantage d'avoir des propriétés bien contrôlées et facilement reproductibles. Ils agissent comme une matrice temporaire jusqu'à ce que les cellules sécrètent leur propre matrice. Les principaux hydrogels synthétiques sont le PDMS (polydiméthylsiloxane), le polyéthylène glycol, l'acide poly(lactique-co-glycolique) et le poly(glycerol sebacate). Le PDMS n'est pas cytotoxique mais les cellules peuvent uniquement être cultivées à sa surface car il n'est pas perméable à l'eau. Le polyéthylène glycol est souvent utilisé car il est soluble dans l'eau et dans des solvants inorganiques, il adhère faiblement aux protéines et n'est pas immunogène. L'acide poly(lactique-co-glycolique) et le poly(glycerol sebacate) sont employés pour la formation de structures complexes. Leur application est limitée à cause des difficultés pour avoir une distribution uniforme des cellules dans l'hydrogel.

Les hydrogels hybrides sont une combinaison d'éléments synthétiques et naturels afin d'avoir l'avantage des deux. Par exemple, le *PEGylated fibrinogen hydrogel* est une combinaison de fibrinogène et de polyéthylène glycol [49].

Un autre type d'échafaudage mélange le principe de décellularisation et de matrice biodégradable. Le principe est d'utiliser des matériaux synthétiques biodégradables comme un échafaudage temporaire pour des cellules homologues qui produisent leur propre matrice extracellulaire, puis de décellulariser la valve [55]. Une croissance adaptée et une repopulation cellulaire furent observées dans ces valves. Par exemple, dans une étude [5], du poly(acide glycolique) a été cousu sur un stent et des fibroblastes néonataux dermiques humains ont été implantés dessus en utilisant de la fibrine comme transporteur de cellules. Après quatre semaines de culture, le tissu ainsi formé fut décellularisé. Des *tests in vivo* effectués chez des moutons pendant 4 heures ont démontré l'efficacité de la valve (pas de régurgitation, pas de thrombose). Cependant, ce processus est assez long et le manque de compréhension sur les mécanismes conduisant à la repopulation de tissus restent des obstacles importantes [37].

### 1.3.3 L'utilisation de cellules en génie tissulaire pour remplacer une valve aortique

De nombreux types de cellules sont testés et utilisés en génie tissulaire pour la construction de tissu. Pour des tissus de valves cardiaques, des sources humaines accessibles avec des cellules qui peuvent imiter les phénotypes des cellules cardiaques et avoir les mêmes caractéristiques au niveau de la MEC sont recherchées. Il existe essentiellement deux catégories de cellules employées pour fabriquer des valves cardiaques : des cellules différenciées issues de tissus spécifiques (cellules endothéliales ou cellules musculaires lisses) ou des cellules souches.

Les cellules différenciées ont pour avantage d'avoir déjà le phénotype recherché mais il est souvent nécessaire de sacrifier un tissu vasculaire intact d'un donneur. Elles peuvent être issues du sang de cordon ombilical. Par exemple, *Wu et al.* [56] utilisent des cellules endothéliales progénitrices issues du sang de cordon ombilical humain, elles sont ensuite développées in vitro en cellules endothéliales. Ces cellules sont implantées dans un échafaudage biodégradable poreux avec des cellules musculaires lisses fournissant ainsi des micro-canaux. Les résultats montrent qu'elles maintiennent leur phénotype endothélial [56]. Il est aussi montré que les cellules humaines musculaires aortiques lisses implantées dans du polyéthylène glycol sont viables, prolifèrent et produisent les protéines de la MEC [57]. Les cellules issues du cordon ombilical sont une grande ressource. Elles peuvent venir de l'artère du cordon ombilical humain, de la veine du cordon ombilical ou de la gelée de Wharton, le tissu conjonctif qui englobe le cordon ombilical. Les cellules issues de cette gelée ont le potentiel de se différencier en cardiomyocytes en les traitant avec de la 5-azacitidine ou en les cultivant en milieu conditionné de cardiomyocytes [58]. Cependant, il faudrait prélever et conserver ces cellules dès la naissance du patient avec le consentement de la mère [58-60].

Les cellules souches sont populaires étant donné leur capacité à se régénérer et à se différencier (multipotence). Les cellules stromales mésenchymateuses issues du tissu adipeux ou de la moelle osseuse sont les plus utilisées. Dans une étude [61], elles ont été comparées avec des cellules humaines pédiatriques interstitielles de la valve aortique. Conditionnées dans un milieu de croissance de ces dernières, les cellules issues du tissu adipeux exprimaient des biomarqueurs similaires aux cellules humaines pédiatriques interstitielles de la valve aortique. Les cellules issues de la moelle osseuse exprimaient des teneurs en glycosaminoglycanes, en collagène et en élastine ainsi que des processus de remodelage de la MEC similaires à celles-ci [61]. Ces deux types de cellules sont des sources potentielles pour le développement, la maturation, et la fiabilité au long terme des TEHV [52, 61].

#### 1.3.4 Procédés de génie tissulaire pour remplacer des valves cardiaques

Les valves décellularisées et les matrices résorbables présentent des risques de réactions immunitaires et inflammatoires, ainsi que des risques de cytotoxicité pour les matrices synthétiques [62]. Il existe une méthode appelée, méthode d'auto-assemblage, pour laquelle ces risques sont quasi nuls. Elle consiste à cultiver les cellules du patient et à les stimuler avec de l'acide ascorbique afin de générer des feuillets cellulaires que les chercheurs empilent ou enroulent et assemblent pour obtenir la géométrie de l'organe voulu. Cette méthode s'applique à des tissus de géométrie simple tel que la peau [63], les vaisseaux sanguins [62] mais aussi à des géométries plus complexes comme la valve aortique (**Figure 1.6**) [64-66]. Plusieurs étudiants de l'équipe de recherche de J. Ruel ont travaillé sur ce sujet.

Catherine Tremblay [64] a cultivé des fibroblastes dermiques afin d'obtenir des feuillets qu'elle a empilés sur quatre couches pour former un tissu biologique épais. Après cinq mois de maturation, à l'aide d'un gabarit, les feuillets sont joints pour construire une valve aortique. Cette dernière est cultivée pendant plusieurs mois en statique, puis dans un bioréacteur. Pour un certain débit, la valve a une capacité d'ouverture et de fermeture, les cellules ont une répartition homogène et des colorations au trichrome de Masson et au rouge Sirius ont montré que la MEC composée principalement de collagène s'est densifiée. Néanmoins, la valve présentait des signes de régurgitation et le processus de fabrication est long (7 mois) [64]. Maxime Picard-Deland [65] a continué le projet en utilisant une géométrie tubulaire permettant plus de simplicité dans la fabrication. Il a enroulé des feuillets et les a cultivés pendant trois mois en statique, puis en dynamique dans un bioréacteur à flux pulsé, c'est-à-dire que le milieu de culture circule de façon fluide à intervalle constant, comme dans les vaisseaux sanguins. Le débit est contrôlé par une pompe et la pression est ajustée avec une résistance pinçant un des tubes du bioréacteur. Le débit a été augmenté graduellement jusqu'à rupture de la valve. Une bonne adhésion entre les feuillets a été observée mais ils ont tendance à se séparer les uns des autres dans le bioréacteur, des valves se sont détériorées rapidement dans les 24h de culture dynamique [65]. Afin d'éliminer ce problème de délamination et pour avoir une meilleure solidité, Marc Antoine Lepage [66] a cultivé des cellules sur un gabarit 3D avec un feuillet cellulaire en monocouche épais pour éviter les problèmes de repliement et de fusion des feuillets. Cependant, malgré l'utilisation de différents matériaux et traitement de surface pour le mandrin 3D, les feuillets cellulaires étaient trop minces, et dans certains cas, étaient difficiles à détacher du mandrin [66]. Ainsi, la géométrie complexe de la valve et les contraintes mécaniques qu'elle subit rendent difficile sa fabrication par auto-assemblage.



**Figure 1.6 : Image d'une valve fabriquée par auto-assemblage de feuillets de cellules en tubes, issu de [67].**

La bio-impression est une technique qui ne cesse de se développer ces dernières années avec de nombreuses améliorations encourageantes. Elle permet la construction de tissus couche par couche afin d'avoir une hétérogénéité mécanique ainsi qu'une distribution spécifique des cellules. Ses avantages sont le contrôle précis et la répétabilité mais construire des tissus complexes avec plusieurs types de cellules reste un défi [68, 69]. Il existe différents types de bio-impression : extrusion (directe ou indirecte), *inkjet based bioprinting*, laser, etc. La technique la plus répandue est l'extrusion directe. Un hydrogel contenant des cellules est directement imprimé avec une forme voulue. La viabilité des cellules dépend alors des caractéristiques de la bio-encre : la

réticulation de l'hydrogel et ses propriétés biologiques et chimiques [70]. Cependant, les cellules encapsulées dans l'hydrogel ne contribuent pas tant à ses capacités mécaniques. L'extrusion indirecte contre ce problème : la bio-encre est composée d'un hydrogel contenant des cellules comme pour l'extrusion directe mais elle contient aussi un hydrogel sacrificiel utilisé comme base pour construire le tissu. Ce dernier peut être retiré avec un procédé thermique ou chimique après l'impression, lorsque l'autre hydrogel s'est solidifié. Par exemple, l'équipe de J. T. Butcher a développé une technique d'impression de valve avec du polyéthylène glycol diacrylate et des cellules interstitielles de valve aortique porcines. Un hydrogel d'alginate est utilisé comme encre sacrificielle pour augmenter temporairement la viscosité du polyéthylène glycol pendant le procédé d'extrusion [71]. Une expérience similaire a été réalisée par la même équipe mais avec des cellules humaines et un hydrogel à base de HA-méthacrylate et de gélatine méthacrylate comme matrice [72] (**Tableau 1.1, Chapitre 1.5**).

L'*inkjet based bioprinting* est un procédé conventionnel avec des imprimantes à jet d'encre peu cher et rapide. Il permet le dépôt précis de gouttes de bio-encre de l'ordre du picolitre sur un substrat d'hydrogel. La buse d'encre n'est pas en contact avec la surface imprimée, ce qui diminue les risques de contamination venant de la surface. Deux procédés d'actionnement sont possibles : thermique ou piézoélectrique. En thermique, un chauffage localisé génère une pression différentielle provoquant l'éjection de l'encre. L'augmentation de la température n'affecte pas les cellules, ni les protéines présentes dans la cartouche. L'inconvénient de cette technique d'actionnement est que les gouttelettes ne sont pas directionnelles et sont de taille irrégulière, et l'obstruction récurrente de la buse cause une impression saccadée. Au contraire, avec l'actionnement piézoélectrique, les gouttelettes sont uniformes et directionnelles et elles ne sont pas exposées à la chaleur. Néanmoins, les fréquences utilisées peuvent endommager les membranes cellulaires. Un hydrogel est souvent utilisé comme substrat d'impression car il est riche en eau, les protéines sont donc hydratées pendant la procédure d'impression, elles sont protégées contre la dénaturation [68, 69, 73].

L'impression laser a été conçue en 1969 par Gary Starkweather [69]. Elle est composée de trois parties : le laser pulsé, comme source, un ruban couvert d'un matériau liquide biologique déposé sur un film de métal, et un substrat. En présence du laser, le film s'évapore formant un jet liquide qui atteint le substrat sous forme de gouttelettes. Le substrat contient un biopolymère ou un milieu de culture pour assurer l'adhésion des cellules et leur croissance. Le point fort de cette technique est sa haute résolution avec la possibilité de déposer une cellule à la fois, donc les cellules ne s'agglomèrent pas. Cependant, ce procédé dépend de nombreux facteurs tels que l'épaisseur du matériau biologique sur le film, l'énergie du laser, ou encore les propriétés rhéologiques. Il est cher et peu adapté pour la recherche fondamentale [68, 69].

La stéréolithographie est une technologie développée dans la fin des années 1980 sans forme solide, sans buse. Un polymère liquide photo-sensible est solidifié par illumination. La structure est obtenue par dessin, IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ou tomographie axiale calculée par ordinateur (TACO) (en anglais, *CT scan*) dans le format STL. Elle est ensuite tranchée en une série d'images avec une certaine épaisseur. Cette

technique permet une haute précision de fabrication mais il existe peu de polymères biocompatibles et biodégradables et il n'est pas possible d'enlever complètement la structure de support [68].

Le progrès dans ce domaine est assez lent en raison du choix restreint des bio-encre pour l'encapsulation cellulaire et le mécanisme de gélification cytocompatible. Il faut trouver un équilibre entre l'intégrité mécanique et la viabilité cellulaire des constructions finales [74]. Aujourd'hui, il est difficile de faire des géométries complexes en bio-impression, il est notamment difficile de réaliser des structures avec un système de perfusion et de vascularisation qui est nécessaire pour certains tissus [75]. Le développement de vaisseaux au sein d'un tissu permet de garantir un apport en oxygène et en nutriments primordial à la survie des cellules.

Pour contrer le problème de vascularisation ou permettre la consolidation de la structure, il est possible d'utiliser des moules sacrificiels. L'utilisation d'encre fugitives dans des hydrogels est simple, facile et reproductible. L'enlèvement de l'encre permet l'apparition de canaux interconnectés à l'intérieur de l'hydrogel. Il peut se faire par chaleur afin de faire fondre ou évaporer l'encre, ou par dissolution. Certaines encres, comme l'alliage liquide galistan, peuvent être retirées avec des éléments chimiques mais elles ne sont généralement pas biocompatibles. Le polyéthylène glycol peut servir d'encre fugitive avec, comme matrice artificielle du PDMS, un polymère biocompatible et transparent. L'encre sacrificielle est retirée en chauffant la structure au-dessus de la température de changement de phase du polyéthylène glycol après le séchage du PDMS. Un flux hydraulique permet de retirer le matériau dans les canaux [75-77]. De la même manière, une solution de Pluronic F-127 peut être utilisée comme encre organique fugitive en l'encapsulant dans de la résine et en la liquéfiant afin de laisser place à des canaux [78]. Par exemple, l'équipe du Dr Atala utilise une imprimante 3D ITOP (*Integrated Tissue-Organ Printer*) pour imprimer des formes complexes telles qu'une oreille externe de taille humaine. Ils utilisent deux hydrogels sacrificiels : le Pluronic F-127 comme moule extérieur et le polycaprolactone en interne pour la création de micro-canaux. Un hydrogel composé de gélatine, de fibrinogène, d'acide hyaluronique et de glycérol mélangé dans du DMEM avec des chondrocytes d'oreille de lapin sont employés pour fabriquer l'oreille. La viabilité des cellules est de 91 (+/- 8) % un jour après l'impression. Après cinq semaines dans du milieu de culture, aucune indication sur la viabilité des cellules n'est donnée mais de la matrice cartilagineuse nouvelle est observée grâce à une coloration à la safranine-O. Les résultats sont très prometteurs, l'équipe a aussi imprimé des structures osseuses et musculaires mais aucun autre résultat n'a été trouvé depuis la publication de l'article en 2016 [79]. Un autre exemple est l'équipe du Dr Feinberg qui utilise un gel thermosensible comme un support dans lequel une bio-encre à base d'alginate est imprimée permettant de réaliser des structures complexes. Elle a réussi à imprimer un cœur avec une encre sans cellules, cependant le temps d'impression (actuellement de 92h) augmenterait si une bio-encre cellulaire était utilisée [80, 81].

## 1.4 Procédé choisi par le groupe de recherche pour produire une valve aortique

### 1.4.1 Impression 3D avec du sucre vitrifié

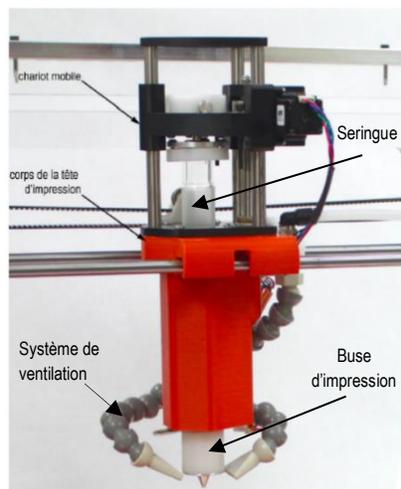
Les encres fugitives tels que le polyéthylène glycol ou le Pluronic F-127 ont pour inconvénients d'être des hydrogels difficiles à retirer lors de la formation du tissu et peuvent être cytotoxiques. Le sucre vitrifié, cependant, est biocompatible, avec un impact limité sur la survie des cellules, et peut se retirer facilement par dissolution dans un milieu aqueux [82]. Son utilisation permet la création de structures complexes ainsi que des réseaux vascularisés. Un hydrogel contenant des cellules est ensuite coulé sur la construction de sucre. Le délai sans nutriment et sans oxygène est plus court que pour la bio-impression car il est restreint uniquement au temps de moulage de l'hydrogel. Il n'existe pas de contraintes de temps lors de l'impression de la structure de sucre, d'où la possibilité de réaliser des constructions précises [83].

Le groupe *Bellan et al.* [84] a développé des structures sacrificielles à base de fibres de sucre pour barbe à papa avec des diamètres et des densités semblables à ceux des capillaires sanguins. Une machine à barbe à papa modifiée est utilisée avec du sucre granulé commercial pour former des bâtons de sucre. La structure est ensuite placée dans un moule Teflon et un polymère y est versé, le PDMS, l'époxy et le polyéthylène glycol ont été testés. L'ensemble est plongé dans un mélange d'eau et d'éthanol à 70° pour dissoudre le sucre, laissant place à un réseau de canaux [84].

Pour avoir des structures répétables, Miller [8] est le premier à développer une imprimante 3D afin de positionner précisément les filaments de sucre pour obtenir un moule. Ceci permet de fabriquer un réseau de canaux avec des filaments, ensuite de le plonger dans un matériau non solide tel qu'un hydrogel, et enfin de sacrifier le réseau laissant place à des canaux dans l'hydrogel. *Miller et al.* [8] ont utilisé un mélange de glucose, de sucrose, de dextran et d'eau d'osmose, chauffé à 165°C. Le glucose est ajouté pour éviter la recristallisation du sucre et faciliter la formation d'un sucre vitrifié stable et peu dispendieux. Cependant, le mélange glucose-sucrose reste trop ductile et hygroscopique. L'incorporation de dextran, un polymère de sucre, augmente la solidité et améliore la stabilité du mélange par rapport aux variations de température. Ce dernier est ensuite versé dans une seringue montée sur une imprimante 3D. Un script python est développé pour générer un code G pour contrôler les mouvements de la tête d'impression. Les filaments de sucre sont imprimés et plongés dans une solution de poly(D-lactide-co-glycolide). La matrice extracellulaire artificielle contenant des cellules est ensuite coulée dans le moule. Plusieurs expériences ont été réalisées avec différents polymères comme matrices extracellulaires artificielles en incorporant des cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine, des fibroblastes humains et des cellules embryonnaires humaines de rein. Des viabilités semblables ont été observées pour ces trois types de cellules, les données ne sont pas montrées dans l'article [8].

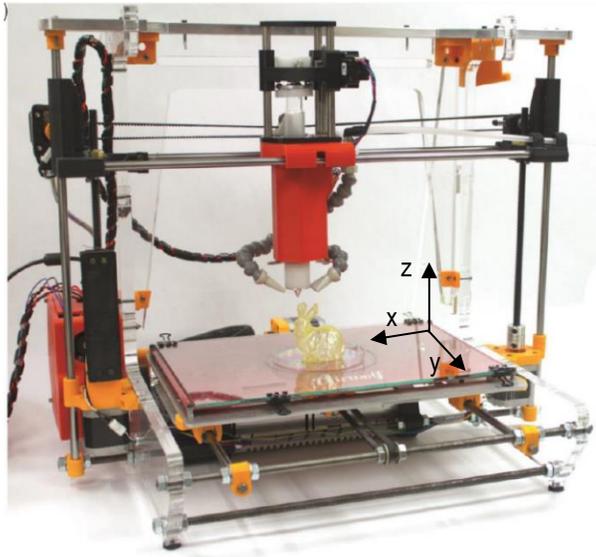
En 2013, *Koyata et al.* [85] ont utilisé comme encre sacrificielle du caramel imprimé dans un polymère, le PDMS. En utilisant du sucre, il est possible de créer des lignes droites mais le diamètre minimal des filaments est trop large pour former un réseau vasculaire. En effet, il doit être de l'ordre de 10  $\mu\text{m}$ , soit la taille d'une cellule humaine ou d'un capillaire sanguin. *Koyata et al.* [85] ont donc trouvé un nouveau processus pour réaliser des canaux cylindriques dans du PDMS. Les points forts de ce dernier sont sa perméabilité à la vapeur d'eau et la capacité du caramel à former des formes cylindriques grâce à sa tension superficielle. Le caramel utilisé est constitué de glucose, de fructose et d'eau ultra-pure. Le mélange est chauffé à 180°C, puis mis dans une seringue placée dans l'imprimante. Le caramel fondu est déposé sur une couche initiale de PDMS, une autre couche de PDMS recouvre celui-ci. La structure est mise dans de l'eau chaude afin de dissoudre le caramel, laissant les canaux apparaître. Avec cette technique, le diamètre minimum atteint pour les canaux est inférieur à 1  $\mu\text{m}$ . Il est observé que la géométrie des canaux dépend de leur taille car, plus le canal est petit, plus il est circulaire étant donné que la gravité a moins d'effet. Elle dépend aussi de la viscosité du caramel : le canal passe d'une forme plate à hémisphérique car la viscosité baisse par absorption graduelle de l'humidité. Cette procédure est assez simple pour réaliser une perfusion [85].

*Bégin-Drolet et al.* [82] ont aussi développé un procédé avec une tête d'impression capable de produire des structures complexes en sucre vitrifié. Il consiste en l'utilisation d'une seringue motorisée avec une buse adaptée au bout (**Figure 1.7**) et d'une imprimante 3D commerciale modifiée (**Figure 1.8**) [82]. L'avantage de cette technique est la possibilité de créer des fils autoportants permettant notamment de faire des géométries complexes, comme des réseaux de perfusion. Un système motorisé qui pousse le piston de la seringue est employé afin d'avoir une extrusion efficace pour faire sortir le sirop. Un système de ventilation a été ajouté pour accélérer le durcissement du sucre à la sortie de la buse (**Figure 1.7**).



**Figure 1.7 : Photographie de la tête d'impression, adaptée de [86].**

Ce processus est plus précis que celui de Miller mais purger la seringue et la remplir est plus délicat. La tête d'imprimante bouge selon les axes X et Z, et le plateau bouge selon l'axe Y (**Figure 1.8**).



**Figure 1.8 : Photographie de l'imprimante 3D utilisée au laboratoire de l'Université Laval, issue de [86].**

Le mélange de sucre utilisé est composé d'eau distillée, de sucrose, et de glucose. Il doit être préparé juste avant l'impression car il doit être maintenu à une certaine température pour avoir la bonne viscosité. Il est ensuite mis dans une seringue chauffée à 110°C pour éviter sa solidification, cette dernière est placée dans une imprimante AW3D XL personnalisée. Un Code G est généré et envoyé sur le logiciel libre *Repetier Host* pour être enfin envoyé à l'imprimante. Un polymère, comme du PDMS, est coulé autour du réseau de sucre vitrifié et mis sous hotte, la structure est ensuite plongée dans de l'eau à température ambiante pour dissoudre le sucre. Pour vérifier le bon fonctionnement du réseau de perfusion, un liquide coloré est envoyé dans les canaux à l'intérieur du PDMS à l'aide d'une pompe péristaltique (**Figure 1.9**).



**Figure 1.9 : Perfusion du réseau de canaux dans un cube de PDMS.**

Le flux observé est uniforme et tous les canaux sont perfusés, seulement des fuites mineures ont lieu à l'entrée et à la sortie de la structure, ce qui valide le procédé. De plus, il est possible d'avoir un contrôle précis et indépendant sur des paramètres comme la température de la seringue et de la buse ou l'activation du système de refroidissement. Une bonne combinaison des débits d'extrusion et de vitesse d'avance permet de faire varier les diamètres des filaments de sucre pour une même impression. L'impression de filaments assez larges diminue les problèmes de perméabilité vasculaire et permet une perfusion/vascularisation complexe [82, 83].

L'avantage de cette méthode est son coût faible et son efficacité. Néanmoins, obtenir un mélange optimisé est difficile car les propriétés de fonte diffèrent selon chaque type de sucre. Le sucrose, le glucose et le fructose ont en commun une propriété de s'oxyder facilement pendant la fonte du sucre, la pointe de la buse peut alors être bloquée. Le maltitol, matériau choisi par *He et al.* [87], ne durcit pas quand il est soumis à une haute température pendant longtemps permettant à la buse de ne pas se boucher. En effet, une tension de surface suffisamment importante reste présente sans appliquer de pression de gaz permettant d'éviter à des gouttes de sucre de tomber à des endroits non voulus dû à la gravité. Des expériences ont été réalisées avec une lignée cancéreuse de cellules de l'ovaire, une viabilité de 97.53 +/- 0.85% a été obtenue après 60 heures de culture, ce qui est prometteur. Ainsi, le maltitol est un matériau idéal car il a des propriétés stables pour fondre, une bonne tension surfacique et une grande solubilité dans l'eau [87].

Le mélange de sucre doit répondre aux exigences suivantes : résistance à la dégradation et à la cristallisation pendant l'impression, être assez chaud pour couler pendant l'extrusion et coller à la construction en cours, et refroidir assez vite pour garder sa forme en sortie de la buse. *Gelber et al.* utilisent un nouveau type de sucre : l'isomalt. C'est un polyol formé de deux molécules : le gluco-mannitol et le gluco-sorbitol [88]. L'avantage par rapport aux autres mélanges de sucre est qu'il est stable pendant longtemps à haute température, il est plus manipulable. Il détient une grande rigidité, il est biocompatible, soluble dans l'eau, stable et facilement accessible dans le commerce. Il peut être anhydre pendant l'impression et reste amorphe. L'inconvénient est qu'il est nécessaire de le filtrer afin de le rendre anhydre [89].

Étant donné le travail effectué sur les paramètres d'impression et sur la recette du mélange d'eau distillée, de glucose et de sucrose par l'équipe d'A. Bégin-Drolet, les problèmes liés à l'obstruction de la buse d'impression sont très rares. Ainsi, c'est ce mélange qui sera choisi pour réaliser le moule de la valve. Des modifications ont été apportées à la recette ainsi qu'à la température d'impression afin d'avoir un sucre plus stable, elles seront détaillées dans le **Chapitre 3**.

#### 1.4.2 Alginate

L'alginate est un bon matériau pour des applications biomédicales car il est peu cher, biocompatible car sa toxicité est basse, et différentes réticulations sont possibles [90]. Cet hydrogel est un copolymère constitué d'une combinaison de blocs M (bêta D-mannuronate) et de blocs G (alpha-L-gulonate). Il existe deux types d'alginate. D'un côté, l'alginate naturel est extrait d'algues brunes, la proportion de blocs G et M dépend des espèces d'algues utilisées [91]. Il détient des ligands qui facilitent l'adhésion des cellules et leur différenciation. De l'autre côté, l'alginate synthétique peut jouer un rôle de page blanche qui peut être modifiée pour avoir des caractéristiques chimiques spécifiques [48]. Il est souvent réticulé avec du chlorure de sodium  $\text{CaCl}_2$ . Lors de sa réticulation avec les ions  $\text{Ca}^{2+}$ , ces derniers déplacent le sodium de l'alginate et rassemblent les chaînes de molécules d'alginate ensemble ce qui forme l'hydrogel. A haute dose, les cations de calcium diminuent sa

stabilité au long terme étant donné que l'hydrogel se dissout avec la présence de ces ions. Dans le cadre du projet, ceci ne devrait pas être contraignant car notre hypothèse est que la MEC sécrétée par les cellules présentes dans l'alginate remplacera ce dernier au fur et à mesure de la culture [48, 91].

Les caractéristiques physiques de l'alginate sont facilement modifiables en changeant la densité de polymère et la concentration de  $\text{CaCl}_2$ . L'avantage de cet hydrogel est sa capacité à se gélifier dans des conditions douces et la possibilité de réaliser toutes les formes et géométries possibles [91]. L'ajout de gélatine permet de faciliter l'adhésion des cellules à l'alginate ainsi que d'augmenter sa viscosité [48]. L'hydrogel formé d'alginate et de gélatine se comporte comme un fluide visqueux : en augmentant la concentration d'alginate, la viscosité dans la solution augmente. Selon *Giuseppe et al.* [48], pour une solution avec 5% d'alginate et 6% de gélatine, la viabilité des cellules est élevée (> 80%) et leur distribution est homogène après sept jours de culture. Les résultats des expériences menées sont que l'augmentation des concentrations en alginate et en gélatine permet d'obtenir des filaments plus fins lors de la bio-impression d'une solution. Uniquement l'augmentation de la concentration d'alginate permet une impression plus précise, et la réticulation a un impact important sur la raideur de l'hydrogel [48].

#### 1.4.3 Cellules stromales issues du tissu adipeux

En 2001, des chercheurs de l'Université de Californie, Los Angeles (*UCLA*) [92, 93] décrivent une nouvelle population de cellules : les cellules souches/stromales issues du tissu adipeux (en anglais *Adipose derived Stem/Stromal Cell* ; ASC). Elles sont utilisées dans de nombreux domaines en médecine régénératrice [94]. Il existe deux types de tissus adipeux : le tissu blanc composé de grosses cellules dont la fonction est d'être un isolant thermique, une source d'hormones et une réserve énergétique, et le tissu brun présent chez les nouveau-nés dont la fonction est la thermorégulation. La majorité des recherches en médecine régénératrice porte sur les cellules issues du tissu adipeux blanc sous cutané, elles sont souvent collectées par lipoaspiration [95, 96].

L'équipe de Hedrick est la première en 2001 à utiliser la lipoaspiration pour récupérer les cellules isolées de la fraction vasculaire stromale du tissu adipeux [92]. Cette dernière contient 2% de cellules avec un potentiel de différenciation vers des lignées multiples contrairement à 0.002% pour les cellules souches mésenchymateuses issues de la moelle osseuse [96]. Leur plus grand atout est leur facilité d'accès avec une méthode peu invasive, la procédure est moins douloureuse que celle pour les cellules issues de la moelle osseuse. De plus, l'âge du donneur n'aurait pas d'influence majeure sur la prolifération des cellules, un élément primordial à prendre en compte étant donné que la majeure partie des patients atteints de maladies cardiovasculaires sont des personnes âgées [97, 98]. Un autre avantage est leur capacité à sécréter et à organiser les éléments de la MEC grâce à une stimulation avec de l'acide ascorbique par la méthode d'auto-assemblage [96, 99]. Elles produisent en particulier de la fibronectine et du collagène de type I et V [99], mais aussi des molécules bioactives comme des facteurs de croissance et des molécules anti-apoptotiques et pro-angiogéniques [67]. Ces cellules sont

aussi populaires pour leur multipotence, elles peuvent se différencier en adipocytes, chondrocytes, myocytes, ostéoblastes et en cellules de type neuronales [94, 100]. Le défi reste de pouvoir contrôler la différenciation vers un tissu spécifique.

## 1.5 Résumé des principaux types de substituts de valves cardiaques en génie tissulaire

Le **Tableau 1.1** résume les principales techniques utilisées en génie tissulaire et présentées dans la revue de littérature pour construire une valve cardiaque.

**Tableau 1.1 : Tableau comparatif des principaux types de substituts de valves cardiaques en génie tissulaire**

Type	Avantages et inconvénients	Type d'études et conclusion	Réf
Valve décellularisée (pas de cellules, valves aortiques xénogéniques ou humaines)	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Géométrie de la valve déjà existante</li> <li>• Présence des composants de la MEC</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Risques infectieux, immunogènes</li> <li>• Risques élevés de dégradation de la MEC et de calcification chez les patients pédiatriques</li> <li>• Rétrécissement des feuillets lors de l'implantation</li> </ul>	Essais in vivo (ovins) et études cliniques : défaillance de la valve chez 75% des patients 36 mois après implantation pour les études cliniques	[47, 53, 101]
Valve décellularisée recellularisée (valve mitrale porcine, ASC)	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Géométrie de la valve déjà existante</li> <li>• Présence des composants de la MEC</li> <li>• Présence de cellules vivantes</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Risques infectieux, immunogènes</li> <li>• Recellularisation : procédé difficile</li> </ul>	Essais in vitro : après trois semaines en bioréacteur, cellules viables (aucune donnée sur résultats du test de viabilité)	[42, 47]
Matrice fabriquée par génie tissulaire décellularisée	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Présence des composants de la MEC</li> <li>• Bonne résistance mécanique</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Risques infectieux, immunogènes</li> <li>• Procédé long</li> </ul>	Essais in vivo (ovins) : après 4 heures in vivo, les valves sont intactes	[5]
Moulage de tissu à base de fibrine ou de collagène (Gels avec des cellules des artères de la carotide, solution de fibrinogène)	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de risques infectieux, ni immunogènes</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Difficulté à réaliser la géométrie de la valve</li> <li>• Insuffisance des feuillets</li> </ul>	Essais in vivo (ovins) : après trois mois in vivo, les valves sont intactes mais insuffisance des feuillets (contraction du tissu)	[53]

<p>Auto-assemblage (Fibroblastes dermiques humains adultes, MEC sécrétée par ces cellules)</p>	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de risques infectieux, ni immunogènes</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Difficulté à réaliser la géométrie de la valve</li> <li>• Résistance mécanique faible</li> </ul>	<p>Essais in vitro : première valve sans stent créée par la méthode d'auto-assemblage, comportement similaire à la valve native dans des conditions douces en bioréacteur</p>	<p>[65]</p>
<p>Bio-impression (Hydrogel Me-HA/Me-Gel, cellules interstitielles valvulaires humaines)</p>	<p><b>Avantages :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Pas de risques infectieux, ni immunogènes</li> <li>• Possibilité de choisir l'emplacement des cellules et d'intégrer plusieurs types de cellules dans la matrice</li> </ul> <p><b>Inconvénients :</b></p> <ul style="list-style-type: none"> <li>• Difficulté à réaliser la géométrie exacte de la valve</li> <li>• Processus d'impression long</li> </ul>	<p>Essais in vitro : 92% cellules viables après 7 jours en culture statique</p>	<p>[72]</p>

## Chapitre 2 Essais préliminaires

### 2.1 Introduction à la culture cellulaire

Dans le cadre de ce projet, il est nécessaire d'avoir des bases en culture cellulaire. Ainsi, un résumé des éléments clés de ce sujet seront présentés dans cette section. L'objectif de la culture cellulaire est d'obtenir des cellules de tissus humains afin d'étudier leurs fonctions et propriétés, de les utiliser pour comprendre leurs réactions, de reconstruire des tissus. Les cellules ont besoin d'un environnement approprié pour proliférer. Nous allons présenter brièvement les conditions pour une bonne prolifération.

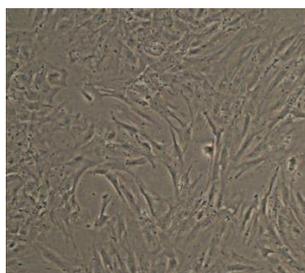
Les cellules nécessitent un support, comme des boîtes de culture en plastique prétraité (**Figure 2.1**), ce peut être aussi du Matrigel™, de la gélatine, etc. Elles ont aussi besoin de nutriments : un milieu riche en glucose, en acides aminés et en vitamines. Le milieu doit avoir un pH neutre (autour de 7), et les cellules doivent rester au chaud (température du corps : 37°C). Un changement régulier du milieu est nécessaire afin d'éliminer les déchets et l'environnement dans lequel prolifèrent les cellules doit être stérile (ajout d'antibiotiques) [102].



**Figure 2.1 : Exemple de boîtes de culture en plastique (des flacons T75 à gauche, des pétris et une plaque 6 puits à droite).**

Pour respecter la stérilité, les laboratoires du LOEX sont munis de hottes à flux laminaire, tous les instruments utilisés assurent la stérilité et des protocoles bien établis sont à suivre pour éviter la contamination des cellules. Pour maintenir les cellules dans un environnement optimal, les salles de culture sont munies d'incubateurs maintenus à 37°C et avec 8% de CO<sub>2</sub>. Les nutriments sont apportés par un milieu spécifique aux ASC, cellules que nous utilisons dans ce projet. Il est composé de 1:1 DMEM: F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium:Ham's* : F12) contenant principalement du glucose, des acides aminés et des vitamines, avec 10% de sérum de veau fœtal riche en protéines et en hormones pour favoriser la croissance cellulaire, et des antibiotiques (100 U/ml de pénicilline et 25 mg/ml de gentamicine) pour empêcher la croissance bactérienne. Pour maximiser la prolifération des cellules, il faut atteindre une confluence donnée de cellules et ensuite les rediviser sur plusieurs surfaces.

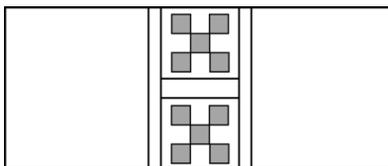
La confluence est le pourcentage de la surface occupée par les cellules (**Figure 2.2**). Ces dernières se multiplient jusqu'à recouvrir toute la surface puis arrêtent de se multiplier.



**Figure 2.2 : Image au microscope optique d'ASC avant la trypsination (confluence 90%), Objectif 10x.**

L'étape suivante est la trypsination. Le nom de cette méthode est tiré de la solution utilisée : la trypsine, qui permet de décoller les cellules de leur support et entre elles afin de les séparer pour les réensemencer dans plusieurs contenants. Les cellules mélangées au milieu sont récupérées dans un tube, la soupe de cellules est appelée suspension cellulaire. Une étape importante lors de la trypsination des cellules est le décompte des cellules afin de savoir si le nombre correspond à celui attendu (si les cellules ont bien proliféré), le taux de mortalité des cellules, et dans combien de contenants il faut les ensemercer. Il existe principalement deux techniques pour compter les cellules que nous pratiquons à chaque fois afin de valider les comptes : le compteur Coulter et l'hématimètre.

Le compteur Coulter est un appareil qui fait passer une solution électrolyte, l'isoton™, par une ouverture calibrée à travers laquelle la résistance électrique est mesurée. Les cellules n'étant pas conductrices, elles génèrent une variation de la résistance qui dépend de la taille de chaque particule comptée. Ceci permet de compter le nombre et la taille de cellules dans la suspension mesurée mais elle ne permet pas de différencier les cellules mortes des cellules vivantes. En fonction du volume de la suspension, du volume d'isoton™ et du volume d'échantillon de la suspension, il est possible de connaître le nombre total de cellules dans la suspension. Ce compte permet de confirmer les données recueillies pour la deuxième méthode : l'hématimètre. Ce dernier est composé d'une lame spécifique avec deux quadrillés sur lesquels les cellules peuvent être comptées au microscope. La présence de quadrillé facilite le compte pour l'utilisateur (**Figure 2.3**). L'échantillon de suspension est mélangé à du bleu de Trypan. Ce colorant est absorbé par les cellules mortes, dont la membrane est endommagée. Ceci permet de compter le nombre total de cellules, le nombre de cellules mortes et le nombre de cellules vivantes. Ainsi, il est possible d'obtenir le taux de mortalité cellulaire et en fonction du volume de suspension total, il est possible de connaître le nombre de cellules total dans la suspension.



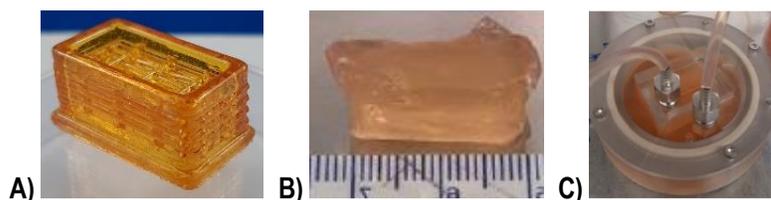
**Figure 2.3 : Schéma d'un hématimètre (zones grises : zones de comptage du nombre de cellules).**

Une fois le compte de cellules effectué, il faut les ensemercer dans des flacons ou des pétris. Le tube avec la suspension cellulaire est centrifugé pendant 10 minutes à 300g, afin de faire tomber toutes les cellules au fond et de pouvoir les diluer avec du milieu à la concentration désirée. Le fait de réensemencer les cellules est défini comme un passage. Par exemple, si les cellules étaient en passage 2 (P2) avant la trypsination, elles sont ensemençées au passage 3 (P3) après. Plus le passage des cellules primaires est élevé, plus leur taux de prolifération est propice à diminuer. Pour l'ensemencement, les cellules sont mélangées avec du milieu et vont adhérer au plastique prétraité. Pour un nombre donné de cellules, il faut un volume donné de milieu en fonction du type de cellules utilisées. Ensuite, des changements de milieu sont à effectuer tous les deux à trois jours afin de jeter les déchets et d'apporter de nouveaux nutriments aux cellules. Il faut aspirer le milieu dans les flacons sans toucher au tapis cellulaire, puis ajouter la même quantité de milieu frais.

## 2.2 Essais préliminaires avec des cubes d'alginate

### 2.2.1 Expériences antécédentes

Des résultats préliminaires ont été obtenus par l'étudiant Simon Collin pour préparer l'expérience de fabrication de valves aortiques par génie tissulaire (**Figure 2.4**). Le procédé de fabrication sera identique, les paramètres seront adaptés pour la valve. L'expérience réalisée consistait en la fabrication d'un prisme rectangulaire parsemé d'une alternance de canaux longitudinaux et transversaux formant un treillis interne. Il était composé d'alginate (2%) et de cellules souches/stromales issues du tissu adipeux (ASC). Les cellules ont été incorporées à l'hydrogel en conditions stériles à une concentration de 1.5 millions cellules/mL et de 5 millions de cellules/mL. Les cubes ont été cultivés pendant 3, 6 et 8 semaines dans un bioréacteur personnalisé avec un flux de milieu passant à travers le cube : la culture quasi statique (QS). Les structures de cubes perfusés sont restées stables pendant les semaines de culture QS [103].



**Figure 2.4 : A) Moule en sucre vitrifié du cube perfusé. B) Cube d'alginate. C) Chambre de culture du bioréacteur dans lequel est cultivé le cube d'alginate.**

Des tests de viabilité et de prolifération cellulaire ont été effectués. Les analyses ont montré une répartition homogène des cellules dans le cube. Cependant, la viabilité diminuait dans le temps mais remontait pour le groupe de cubes à 1.5 millions de cellules/mL (**Figure 2.5**). Étant donné le faible nombre d'échantillons, il était difficile de conclure sur les résultats obtenus. Le faible taux de viabilité pourrait être expliqué par une mauvaise perfusion des cubes étant donné que les cellules avaient le même taux de viabilité proche et loin des canaux.

Les valves cardiaques ayant une épaisseur beaucoup plus faible que les cubes, ce problème risque moins de se produire.

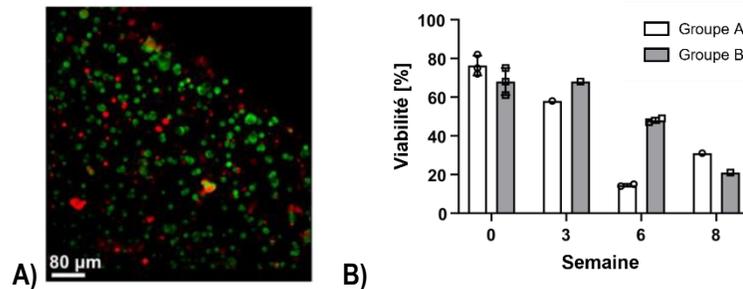


Figure 2.5 : A) Exemple d'une image au microscope confocal d'un spécimen du groupe A (1.5 million cellules/mL). B) Evolution de la viabilité cellulaire de 24h à 8 semaines, adapté de [103].

Des analyses d'immunofluorescence ont aussi été réalisées mais les marqueurs ne se voyaient pas bien et il n'y avait pas de témoins négatifs (cubes sans cellule dans les mêmes conditions que les cubes avec cellules). Ainsi, j'ai réalisé la même expérience mais sans incorporer de cellules dans les cubes et j'ai fait les analyses d'immunofluorescence avec les témoins négatifs (**Chapitre 2.3**).

### 2.2.2 Expérience avec des cubes d'alginate sans cellule pour contrôle négatif

Cette expérience correspond à la mise en culture quasi statique (QS) dans des bioréacteurs de neuf cubes d'alginate sans cellules à différents temps (24h, et 3, 6 et 8 semaines) et à la mise en culture QS pendant 24h dans des bioréacteurs de cubes d'alginate avec des ASC.

Dans cette expérience, un moule en sucre vitrifié a été fabriqué à l'aide d'une imprimante 3D personnalisée développée par l'équipe d'André Bégin-Drolet. La structure était un cube ouvert sur le dessus avec un enchaînement de barres de sucre longitudinales et transversales (structures autoportantes) permettant de perfuser le cube d'alginate. Une description plus détaillée de la fabrication de sirop de sucre et du fonctionnement de l'imprimante 3D seront données plus loin (**Chapitre 3**). La géométrie du moule utilisé a été développée par Simon Collin sur le logiciel Creo (**Figure 2.6**) [9].

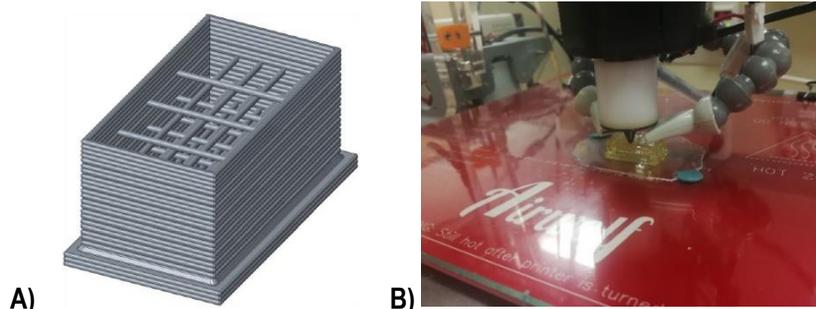


Figure 2.6 : A) Modèle tridimensionnel généré par ordinateur à l'aide du logiciel Creo, issu de [103]. B) Photographie de l'impression 3D du moule en sucre.

Le moule en sucre a été transféré au laboratoire du LOEX et plongé dans de l'éthanol 100% afin de le stériliser. Ensuite, le gel d'alginate a été préparé en conditions stériles. Une solution d'alginate à 4.66% fut mélangée avec du milieu conditionné (milieu avec des facteurs libérés par les cellules lors de leur culture faite antérieurement), une solution de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ) à 5% et une solution de D-glucono-1,5-lactone (GDL) à 17%. Le mélange final fut déposé dans le moule en sucre vitrifié. Une fois que la solution d'alginate était gélifiée, le moule a été dissous à l'aide de milieu chaud. Le GDL et le  $\text{CaCO}_3$  furent employés car ce sont des agents de réticulation non toxiques. Le  $\text{CaCO}_3$  permet la gélification interne de l'alginate et le GDL accélère la gélification par réaction acide avec le milieu, solution aqueuse, qui permet de libérer les ions calcium du  $\text{CaCO}_3$ . La concentration finale d'alginate était de 2%.

Pour les cubes avec cellules, la même procédure a été utilisée mais avec des ASC. Le protocole suivi était identique à celui développé précédemment dans notre équipe [103]. Les cellules ont été mélangées avec le milieu conditionné à une densité de 1.5 million de cellules/mL ( $n = 3$ ) et à une densité de 5 millions de cellules/mL ( $n = 2$ ). Pour les contrôles, nous avons fabriqué des cubes d'alginate dans lesquels nous avons incorporé des ASC mortes. Leur mort a été induite en les laissant dans une solution de formol (3.7%, Chaptec) pendant 30 minutes.

Tous les cubes d'alginate ( $n = 9$ ) ont été placés juste après dissolution du sucre dans des bioréacteurs (Figure 2.7). Ces derniers étaient constitués d'une pompe péristaltique imposant un débit constant d'environ 1.5 mL/min de milieu passant par une chambre de culture personnalisée dans laquelle l'échafaudage d'alginate fut maintenu en place. On dit que les cubes d'alginate sont en culture quasi statique (QS). Ils ont été cultivés pendant 20h ( $n = 1$ ), 3 semaines ( $n = 3$ ), 6 semaines ( $n = 4$ ) et 8 semaines ( $n = 1$ ).

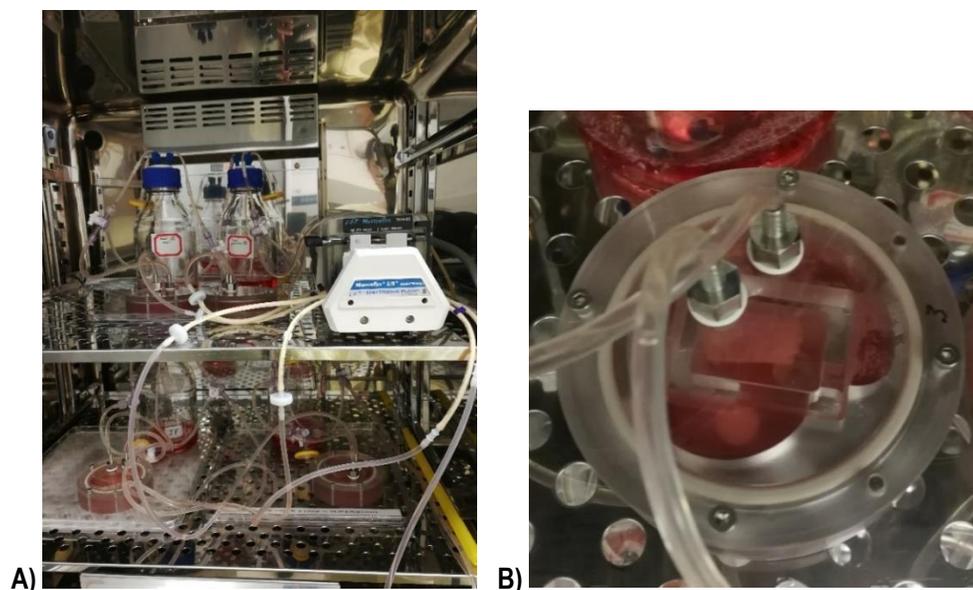


Figure 2.7: A) Dispositif du bioréacteur dans un incubateur. B) Chambre d'un bioréacteur QS avec le cube d'alginate à l'intérieur.

A la fin de la période de culture, les cubes d'alginate étaient coupés en tranches d'environ 1 mm d'épaisseur à l'aide d'un scalpel. Deux ou trois tranches étaient chacune prise au centre et au bord du cube d'alginate. Pour chaque cube, une tranche était congelée dans de l'OCT (Sakuro, Torrance, USA) selon le protocole habituel du LOEX et une autre tranche était aussi congelée dans de l'OCT mais selon un protocole avec infiltration progressive d'OCT permettant d'éviter le bris de la tranche d'alginate. L'OCT est un cryoconservateur qui permet de préserver le tissu des congélations/décongelations intempestives et de le protéger de tout contact. Les échantillons ont été ensuite conservés à  $-80^{\circ}\text{C}$  pour des analyses d'histologie et d'immunofluorescence (**Chapitre 2.3**).

Pour les cubes avec cellules et pour certains cubes sans cellules, une troisième tranche était dédiée à l'analyse de la viabilité. Un kit de viabilité cellulaire (*Live/Dead*, ThermoFisher, Oregon, USA) fut utilisé : les tranches d'alginate ont été couvertes d'une solution saline tamponnée au phosphate (en anglais *Phosphate Buffered-Saline*, PBS) mélangée avec des colorants : calcéine AM et *ethidium homodimer-1*. La calcéine AM est capable d'entrer dans les cellules vivantes car elles ont une certaine activité intracellulaire. Le colorant devient fluorescent par transformation enzymatique lors de l'absorption dans la cellule. Il est retenu dans la cellule et produit une fluorescence verte (494/517 nm). Au contraire, l'*ethidium homodimer-1* entre dans les cellules mortes dont la membrane est endommagée et se lie à leurs acides nucléiques, multipliant ainsi la fluorescence du colorant par 40. Les cellules mortes émettent alors une fluorescence rouge (528/617 nm). L'*ethidium homodimer-1* est rejeté par la membrane intacte des cellules vivantes<sup>4</sup>.

Les échantillons ont ensuite été observés en fluorescence au microscope confocal avec un objectif 10x0.45. Pour chaque coloration, les couches scannées étaient empilées et les cellules ont été comptées à l'aide du logiciel ImageJ pour chaque image enregistrée ( $n = 4$  images par tranche). Une approximation de la densité de cellules pour chaque scan fut réalisée en divisant le nombre de cellules total par image par le volume scanné (dimension de l'image x profondeur). La densité a été convertie en nombre de cellules par millilitre. De la même manière, la densité de cellules vivantes a été estimée en divisant le nombre de cellules vivantes par image par le volume scanné.

Pour les alginates sans cellules, lors de l'observation au microscope confocal, il n'y avait aucune tâche verte, ni de tâche rouge. Les mêmes paramètres ont été utilisés que pour les tranches d'alginate avec cellules, ce qui signifie qu'il n'y avait pas de bruit de fond dû à l'alginate ou à la culture au long terme en milieu de culture contenant du sérum pour ce type d'analyse. Les autres tranches d'alginates sans cellules servent de témoin négatif pour les analyses d'immunofluorescence (**Chapitre 2.3.2**). Pour les alginates avec les cellules induites mortes, il n'y avait que des points rouges (**Figure 2.8**). Ainsi, on peut en déduire que le colorant calcéine AM ne pénètre pas les cellules mortes et que l'*ethidium homodimer-1* pénètre bien les cellules mortes.

---

<sup>4</sup> L3224, *LIVE/DEAD® Viability Cytotoxicity Kit, for mammalian cells*, Invitrogen™, ThermoFisher Scientific, <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/L3224>

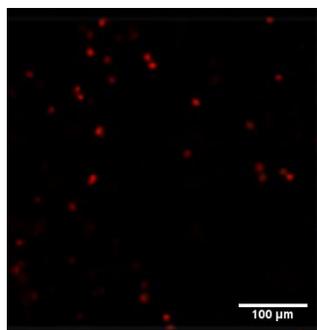


Figure 2.8 : Image de microscopie confocale d'un échantillon d'alginate avec des cellules induites mortes, densité de  $3.65 \times 10^5$  cellules/mL.

Pour les alginates avec 3 millions de cellules (1.5 millions de cellules/mL) et 10 millions de cellules (5 millions de cellules/mL), les résultats du comptage des cellules sur ImageJ sont donnés à la Figure 2.9. La viabilité moyenne des cellules pour les cubes d'alginate à 3 millions de cellules après 20h de culture QS était de  $93 \pm 4\%$  ( $n = 2$ , il était prévu d'avoir  $n = 3$  mais un des alginates était complètement émietté dans un des bioréacteurs). Pour les cubes d'alginate à 10 millions de cellules, la viabilité moyenne était de  $83 \pm 10\%$  ( $n = 2$ ).

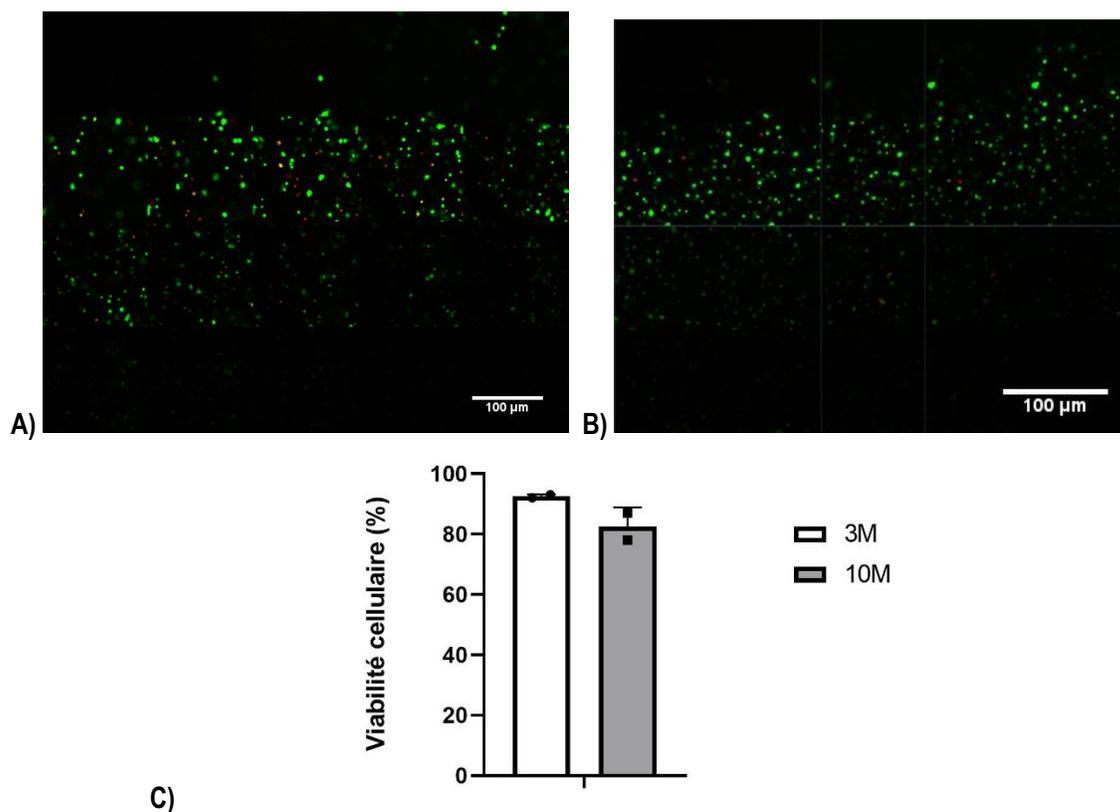
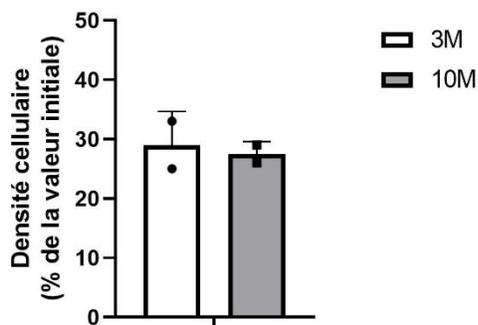


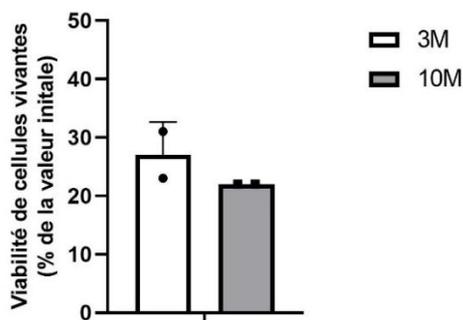
Figure 2.9 : Image au microscope confocal d'un échantillon d'alginate après 20h de culture quasi statique A) à 3 millions de cellules, B) à 10 millions de cellules et C) Viabilité cellulaire après 20h de culture QS pour les alginates à 3 millions de cellules et à 10 millions de cellules.

La **Figure 2.10** représente la densité cellulaire après 20h de culture QS. Pour les alginate à 3 millions de cellules, la densité cellulaire totale moyenne est de  $0.387 \times 10^6$  ( $\pm 1.69 \times 10^5$ ) cellules/mL alors qu'elle devrait être de  $1.5 \times 10^6$  cellules/mL. Pour les alginate à 10 millions de cellules, la densité cellulaire totale moyenne est de  $1.29 \times 10^6$  ( $\pm 6.14 \times 10^5$ ) cellules/mL alors qu'elle devrait être de  $5 \times 10^6$  cellules/mL. Cet écart est significatif et pourrait être dû à un mélange non homogène des cellules lors de l'étape de production de la solution d'alginate. La densité cellulaire par rapport à la concentration initiale est similaire pour les alginate à 10 millions de cellules ( $28 \pm 11\%$  de la valeur initiale de 5 millions de cellules / mL) et pour ceux à 3 millions de cellules ( $29 \pm 8\%$  de la valeur initiale de 1.5 million de cellules / mL). Pour les alginate avec 3 millions de cellules induites mortes au formol, la densité cellulaire totale est du même ordre de grandeur (24%). Cependant, dans les expériences précédentes, les alginate étaient proches de la densité cellulaire initiale [ $1.58 \times 10^6$  ( $\pm 0.28 \times 10^6$ , n = 3) cellules/mL (normalement  $1.5 \times 10^6$ ) et  $4.95 \times 10^6$  ( $\pm 0.50 \times 10^6$ , n = 3) cellules/mL (normalement  $5 \times 10^6$ )] [103].



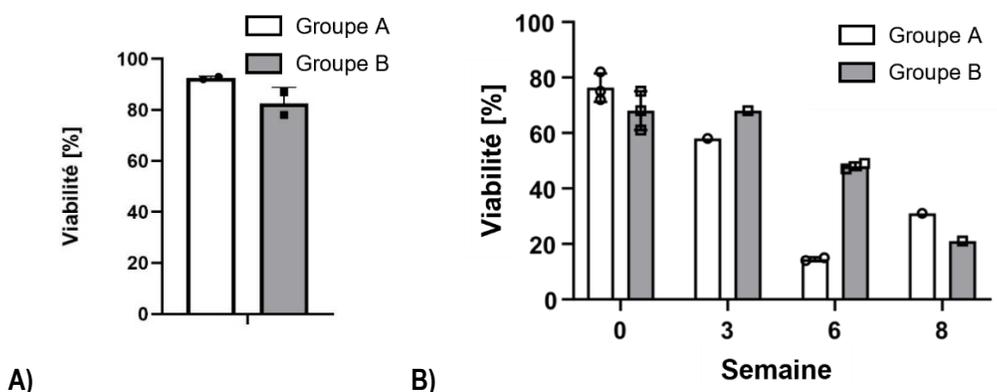
**Figure 2.10 : Densité cellulaire après 20h de culture quasi statique pour les alginate à 3 millions de cellules et à 10 millions de cellules.**

La densité cellulaire de cellules vivantes par rapport à la concentration initiale de cellules a tendance à être plus basse pour les alginate à 10 millions de cellules ( $22 \pm 9\%$  de la valeur initiale de 5 millions de cellules/mL) que pour ceux à 3 millions de cellules ( $27 \pm 7\%$  de la valeur initiale de 1.5 million de cellules/mL) (**Figure 2.11**). Il n'est pas possible de réaliser des tests statistiques étant donné le faible nombre d'échantillons.



**Figure 2.11 : Densité de cellules vivantes après 20h de culture quasi statique pour les alginate à 3 millions de cellules et à 10 millions de cellules.**

Une viabilité plus élevée est observée pour les alginate à 3 millions de cellules que pour ceux à 10 millions de cellules (**Figure 2.12 A**), comme pour les résultats précédents (**Figure 2.12 B**). La viabilité est plus élevée pour les alginate de l'expérience réalisée (83 – 93%) que pour ceux de l'expérience précédente (70 – 75%). Néanmoins, le fait que la densité totale de cellules soit de l'ordre de 30% et non un résultat proche de 100% ne permet pas de conclure sur l'expérience. Un meilleur brassage des cellules avant de les incorporer dans l'alginate pourrait augmenter la densité totale de cellules.



**Figure 2.12 : A) Viabilité cellulaire après 20h de culture quasi statique pour les alginate avec cellules. B) Évolution de la viabilité de la semaine 0 à la semaine 8 de l'expérience de Simon Collin, issue de [103]. Groupe A : 3 millions de cellules ; Groupe B : 10 millions de cellules.**

Il est normal d'observer une diminution de la viabilité, notamment à haute densité cellulaire. Dans l'article de *Bohari et al.* [104], pour une concentration de 2% d'alginate, la viabilité pour une densité de  $0.76 \times 10^6$  cellules par mL était de 70%. En effet, une haute concentration d'alginate implique une haute viscosité qui entraîne de plus grandes contraintes de cisaillement sur les cellules lorsque ces dernières sont mélangées à l'alginate. Or, la membrane des cellules est très sensible aux forces de cisaillement, ainsi le mélange des cellules à l'alginate pourrait entraîner leur mort.

Cette expérience a permis une familiarisation avec la fabrication de gels d'alginate en conditions stériles, de voir comprendre les difficultés qui seront rencontrées lors de la fabrication de valves en alginate avec incorporation de cellules. De plus, un stock d'échantillons d'alginate sans cellule a été congelé à  $-80^\circ\text{C}$  pour être utilisé comme témoin négatif pour des analyses, comme les immunofluorescences que nous décrivons dans la section suivante.

## 2.3 Analyses sur les cubes d'alginate

### 2.3.1 Introduction sur l'immunofluorescence

L'immunofluorescence (IF) est une technique permettant de détecter une protéine précise dans un tissu ou des cellules. La plus populaire est l'IF indirecte, une succession de deux marquages :

- 1<sup>er</sup> marquage : un anticorps primaire reconnaît la protéine précise et s'y fixe
- 2<sup>ème</sup> marquage : un anticorps secondaire marqué par un fluorochrome avec une forte affinité avec l'anticorps primaire s'y fixe, il permet d'amplifier le signal.

Un anticorps est une protéine produite par les lymphocytes B en réponse à une molécule étrangère ou un microorganisme (antigène). Il se lie à une région spécifique de l'antigène, appelée épitope, pour l'inactiver ou le marquer et en faire une cible. Il existe deux types d'anticorps : polyclonaux ou monoclonaux. Les anticorps polyclonaux sont des mélanges d'anticorps qui reconnaissent plusieurs épitopes d'un même antigène, ils marquent plus facilement la protéine recherchée mais sont moins précis, ce sont souvent des anticorps produits chez le lapin. Les anticorps monoclonaux reconnaissent un seul épitope, ils sont plus précis, ce sont souvent des anticorps de souris ou de rat [102].

Parmi les protéines que l'on peut détecter, nous avons sélectionné les trois suivantes :

- Le **collagène I** contient trois chaînes alpha organisées en hélice et est très répandu dans la MEC (matrice extracellulaire), il sert de charpente extracellulaire.
- La **fibronectine** est une glycoprotéine de deux chaînes alpha. Son rôle principal est d'attacher les cellules aux protéines de la MEC et elle est présente en forte quantité dans le sérum.
- La **vimentine** est un des principaux composants de la structure du cytosquelette, elle se présente sous forme de filaments intermédiaires, elle est intracellulaire.

Le LOEX fournit un protocole détaillé de toutes les étapes pour réaliser une IF, une description des étapes importantes est donnée dans ce paragraphe. La fixation est la première étape de l'IF, l'objectif est de maintenir les cellules dans leur état juste après leur décongélation. Les fixateurs peuvent être des agents chimiques de réticulation (ex : formol) ou des solvants organiques (ex : méthanol, acétone). Dans notre projet, de l'acétone est utilisé. En fonction de la protéine qui est cherchée, si cette dernière est essentiellement présente à l'intérieur de la cellule, une perméabilisation est nécessaire. La structure intracellulaire devient alors accessible aux anticorps. En la fixant avec un solvant organique, la membrane cellulaire devient perméable. L'étape de rinçage se fait après chaque dépôt d'anticorps à l'aide d'une solution tampon, habituellement du PBS (*Phosphate Buffered Saline*). Cependant, cette solution faisant dissoudre l'alginate, nous utilisons du MOPS (*3-(N-morpholino)propanesulfonic acid*) à la place. Une attention particulière donnée au rinçage après chaque étape permet d'améliorer la qualité de l'IF. Une autre étape importante est le blocage, soit l'utilisation de BSA (*Bovine Serum Albumin*), pour minimiser l'attachement non spécifique du premier anticorps sur sa cible [105].

Les noyaux des cellules sont souvent marqués au Hoechst. Ceci permet d'avoir une meilleure orientation dans la cellule ou dans le tissu observé. Le colorant Hoechst entre dans le noyau et s'intercale dans l'ADN. Les contrôles sont très importants en immunofluorescence car les fluorochromes sont très sensibles. Ainsi, il est nécessaire de faire des marquages avec seulement le deuxième anticorps, de comparer les mêmes tissus avec et sans cellules, etc. [105] afin de s'assurer que ce qui est observé au microscope correspond bien à la protéine recherchée.

Une fois toutes les étapes réalisées, les lames sont observées au microscope à fluorescence ou au microscope confocal. Le fluorochrome (2<sup>ème</sup> anticorps) est détecté par le microscope. Le principe de la microscopie à fluorescence est que le fluorochrome absorbe la lumière à une longueur d'onde spécifique ( $\lambda$  d'absorption) et en émet à une longueur d'onde différente ( $\lambda$  d'émission). Si ce fluorochrome est illuminé à sa  $\lambda$  d'absorption et qu'il est visualisé à travers un filtre qui ne fait passer que la lumière de la  $\lambda$  d'émission, il rayonnera sur un fond noir [102]. Ainsi, il est possible de visualiser la protéine marquée par le fluorochrome. La microscopie confocale a une meilleure définition d'image que la microscopie à fluorescence car elle détecte un plan très mince de la cellule alors que la microscopie à fluorescence détecte la fluorescence de tout le spécimen. Ainsi, pour des tissus épais, la microscopie confocale est à privilégier car il est possible de prendre des images sur plusieurs plans et de les regrouper.

### 2.3.2 Résumé des analyses d'immunofluorescence sur les cubes d'alginate

Plusieurs essais avec différents anticorps ont été réalisés sur des peaux normales humaines (PNH) pour voir lesquels marquaient le mieux et quels paramètres utiliser avant de faire les immunofluorescences sur les tranches d'alginate de l'expérience des cubes d'alginate avec cellules en culture QS congelées à -80°C.

Pour le collagène I, nous avons réalisé plusieurs tests sur les paramètres suivants : le 1<sup>er</sup> anticorps (de la marque *Rockland* et *Cedarlane*), le 2<sup>ème</sup> anticorps (d'âne couplé au fluorochrome Alexa 488 et de chèvre couplé au fluorochrome Alexa 594), la perméabilisation (avec ou sans), la durée de pose du 1<sup>er</sup> anticorps, le facteur de dilution du 1<sup>er</sup> anticorps. Après tous les tests réalisés, nous en avons conclu que le 1<sup>er</sup> anticorps collagène I *Cedarlane* avec comme 2<sup>ème</sup> anticorps d'âne Alexa 488 avec perméabilisation de l'échantillon, en laissant le 1<sup>er</sup> anticorps pendant une heure sur l'échantillon étaient les meilleures conditions pour obtenir un beau marquage (**Figure 2.13**). Le témoin négatif est un marquage avec uniquement le 2<sup>ème</sup> anticorps (**Figure 2.13 A**). Les noyaux sont marqués en bleu et le collagène I en vert. De la même manière, nous avons réalisé des tests avec les anticorps primaires de fibronectine et de vimentine. Il a été conclu que la fibronectine et la vimentine étaient mieux visibles avec le 2<sup>ème</sup> anticorps de chèvre Alexa 594, avec perméabilisation de l'échantillon, avec une dilution de 1/300 pour la fibronectine et une dilution de 1/250 pour la vimentine.

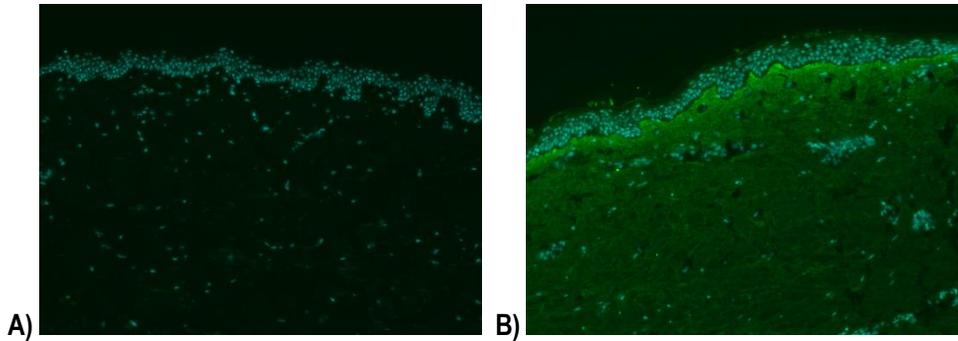


Figure 2.13 : Image de peau normale humaine obtenue par microscopie à fluorescence A) Témoin négatif et B) Marquage du collagène I.

Les marquages d'immunofluorescence ont ensuite été effectués sur les échantillons d'alginate (Figure 2.14, Figure 2.15 et Figure 2.16). Les tranches d'alginate étaient congelées dans de l'OCT et ont été coupées au cryostat pour avoir des échantillons d'alginate sur des lames de verre et réaliser le protocole pour l'IF. Des peaux normales humaines (PNH) ont été utilisées comme témoins positifs, des tranches d'alginate sans cellules ont été utilisées comme témoins négatifs. Dans un premier temps, uniquement un marquage au collagène I a été réalisé sur les alginates. Les conditions étaient une perméabilisation à l'acétone, un 1<sup>er</sup> anticorps lapin Collagène I *Cedarlane* à une dilution de 1/100, un 2<sup>ème</sup> anticorps anti-lapin d'âne Alexa 488 (vert) à une dilution de 1/500, et un rinçage avec une solution tampon MOPS. Les lames ont été observées au microscope à fluorescence. La Figure 2.14 B) représente le marquage au collagène I (en vert) d'un échantillon d'alginate provenant d'un cube à dix millions de cellules après six semaines de culture quasi statique. Par comparaison avec le témoin négatif, un fond vert avec quelques tâches est observé sur l'échantillon mais le marquage reste très faible.

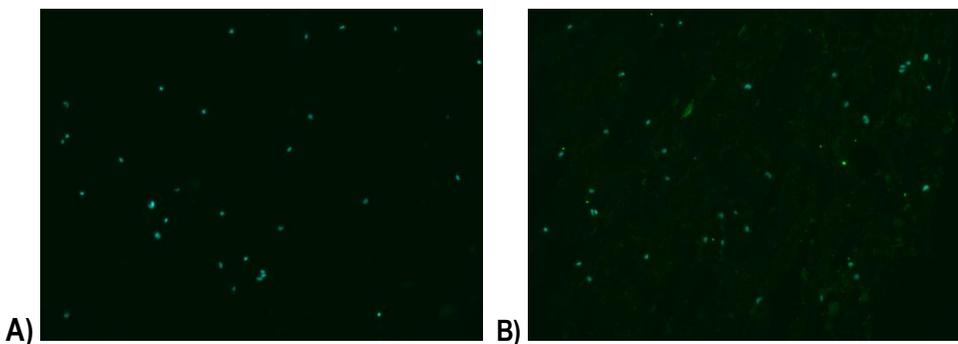


Figure 2.14 : Image au microscope à fluorescence d'un échantillon d'alginate à 10 millions de cellules après 6 semaines de culture quasi statique A) Témoin négatif B) Marquage du collagène I. Objectif 10x.

Les échantillons ont ensuite été observés au microscope confocal afin de pouvoir regarder le collagène I sur plusieurs couches et avoir un meilleur marquage. La Figure 2.15 représente le marquage au collagène observé au microscope confocal pour les cubes d'alginates à 3 millions de cellules à plusieurs temps de culture QS. Un

marquage plus intense de collagène est observé pour ces échantillons que pour ceux à 10 millions de cellules (Figure 2.16) mais peu d'augmentation est visible entre 24h, 3 semaines et 6 semaines. Uniquement après 8 semaines de culture, une augmentation du collagène est légèrement plus visible.

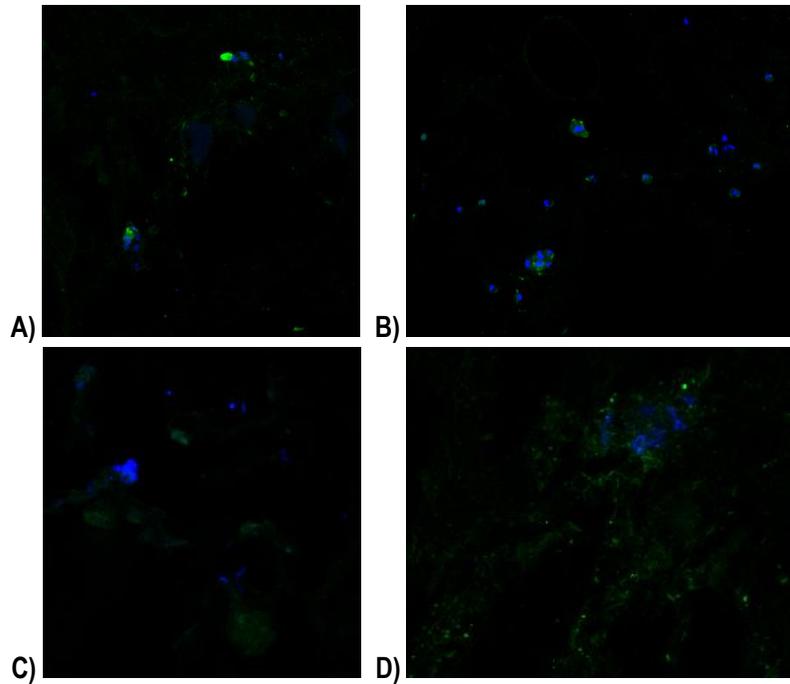


Figure 2.15: Image au microscope confocal d'échantillons d'alginate à 3 millions de cellules après A) 24h, B) 3 semaines, C) 6 semaines et D) 8 semaines de culture quasi statique. Objectif 10x.

La Figure 2.16 représente le marquage au collagène observé au microscope confocal pour les cubes d'alginate à 10 millions de cellules à plusieurs temps de culture QS. Nous observons peu de collagène I pour les lames d'alginate à 10 millions de cellules, avec des cellules sans collagène autour. Aucune augmentation de collagène n'est visible par rapport au temps de culture de l'alginate.

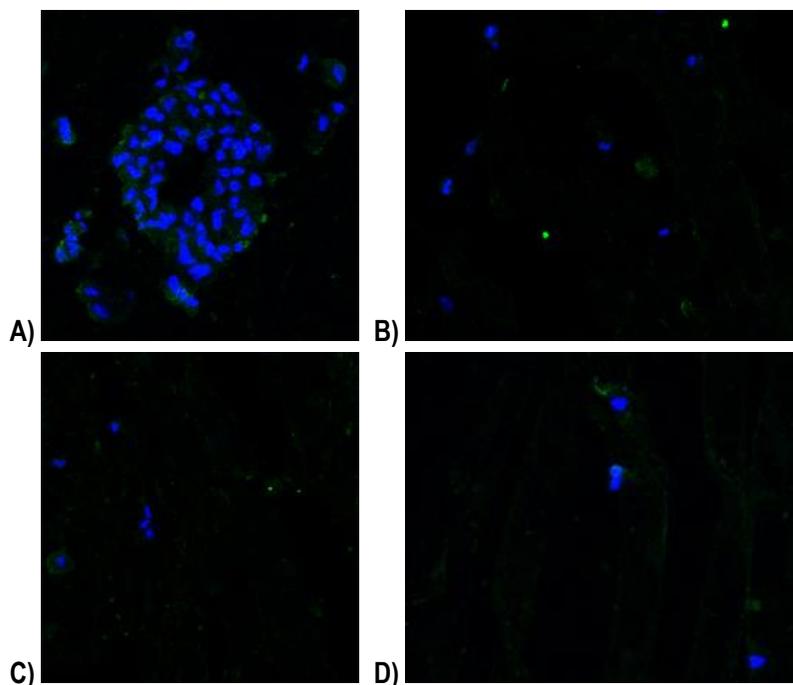


Figure 2.16 : Image au confocal d'échantillons d'alginate à 10 millions de cellules après A) 24h, B) 3 semaines, C) 6 semaines et D) 8 semaines de culture quasi statique. Objectif 10x

Il est difficile de quantifier le collagène avec les photographies actuelles. Une autre analyse envisagée était un dosage à l'hydroxyproline afin de quantifier le collagène. L'hydroxyproline est un acide aminé qui permet d'augmenter la stabilité de la triple hélice du collagène, son dosage permet de connaître la quantité de collagène présent dans le tissu. Cependant, aux vues des analyses d'immunofluorescence, très peu de collagène a été sécrété par les cellules dans les cubes d'alginate, donc le dosage n'aurait sûrement pas été concluant non plus. Les cubes étant des tissus épais avec une perfusion qui n'était sûrement pas très efficace étant donné les résultats de viabilité *Live/Dead* (**Chapitre 2.2.1**), nous espérons que de meilleurs résultats seront obtenus avec l'incorporation des cellules dans les valves dont l'épaisseur est beaucoup plus fine. De plus, il est possible d'ajouter des facteurs de croissance permettant d'encourager la sécrétion de matrice extracellulaire des cellules dans l'alginate.

Ces expériences préliminaires ont permis une familiarisation avec les différentes techniques utilisées en culture cellulaire et de comprendre les enjeux de la fabrication d'une valve aortique avec des tissus biologiques. La formation à la culture cellulaire aide à comprendre les paramètres influant sur une bonne prolifération et la viabilité des cellules, tels que le milieu utilisé, l'environnement, etc. Ensuite, les essais avec les cubes d'alginate sans cellules pendant plusieurs semaines et avec cellules pendant 20h ont permis d'appuyer les résultats précédents obtenus avec les cubes d'alginate avec cellules en culture QS pendant plusieurs semaines. La viabilité élevée des cellules dans les cubes d'alginate pendant 20h en culture QS est encourageante malgré le

fait que la densité cellulaire soit faible. Les cubes d'alginate sans cellules ont notamment rendu possible les tests d'IF en servant de témoins négatifs. Bien que les résultats ne soient pas ceux espérés, le protocole établi pourra être utilisé pour les prochaines expériences pour des alginates avec cellules. Ainsi, nous pouvons passer à l'étape suivante, constituant un des objectifs principaux du projet : le développement d'un protocole pour réaliser une valve aortique en alginate par moulage dans un moule en sucre vitrifié. La première étape est la conception et la fabrication du moule en sucre vitrifié par impression 3D.

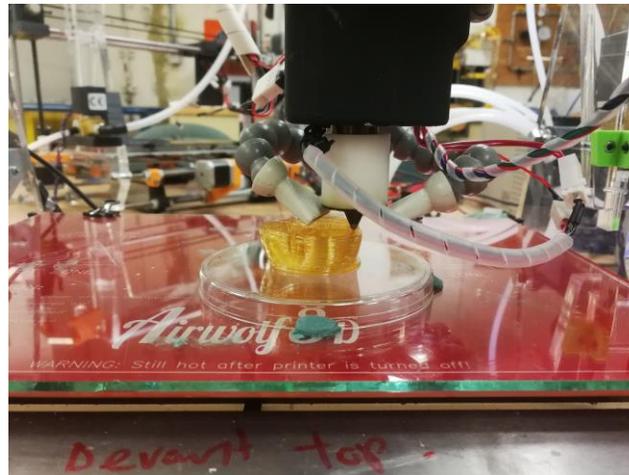
# Chapitre 3 Fabrication d'un moule en sucre vitrifié pour reproduire une valve aortique

## 3.1 Introduction à l'impression 3D de sucre vitrifié

Comme décrit dans la revue de littérature, l'impression 3D de sucre vitrifié est basée sur les travaux de Miller et adaptée par Dussault [8, 86]. Un avantage majeur de cette méthode est la possibilité de créer des géométries complexes, contrairement à la bio-impression contrainte par le temps d'impression, étant donné l'utilisation de bio-encres avec des cellules simultanément. De plus, l'imprimante et le matériel sont peu coûteux. La recette de sucre utilisée comme encre d'impression est composée d'eau distillée et de sucrose. Ce matériau a particulièrement été choisi car sa température de transition vitreuse est supérieure à la température ambiante. Ainsi, le sucre se solidifie juste après son extrusion par contact avec l'air ambiant, ceci permet entre autres de créer des filaments autoportants. De plus, le sucre est cytotocompatible et donc non toxique pour les cellules s'il n'est pas utilisé en grande quantité, le glucose étant par exemple présent dans le milieu de culture cellulaire. Un autre avantage est sa facilité de dissolution dans une solution aqueuse tel que de l'eau, du milieu, une solution tampon, etc. L'étape de démoulage est donc rapide, ce qui est intéressant lors de l'utilisation d'un hydrogel contenant des cellules car ces dernières doivent rester le moins longtemps possible dans des conditions difficiles (température ambiante, sans milieu de culture). Dans la recette de sucre, du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) a été ajouté car l'équipe a remarqué que l'hydrogel d'alginate, majoritairement composé d'eau, dissolvait le moule en sucre de manière prématurée. Ainsi, celui-ci n'avait pas le temps de se gélifier avant que le sucre ne commence à se dissoudre. Lors de la dissolution locale du sucre, lorsque l'alginate est versé dans le moule, les ions calcium sont libérés et gélifient l'hydrogel à l'endroit où le moule est en train de se dissoudre. Ainsi, le  $\text{CaCl}_2$ , en polymérisant localement l'alginate, permet de freiner la dissolution du moule en sucre et permet d'assurer le maintien de la géométrie désirée de la structure en alginate [106].

L'imprimante 3D utilisée est une imprimante commerciale Airwolf3D XL (**Figure 3.1**) adaptée avec une seringue en verre dans laquelle est coulé le sirop de sucre caramélisé, la pression est ensuite contrôlée à l'aide d'un piston lié à un moteur. Le chauffage de la seringue et de la buse d'impression sont indépendants. Ceci permet d'avoir une température de buse légèrement inférieure à la température de la seringue pour avoir une bonne viscosité à la sortie de la buse. Néanmoins, la différence de température ne doit pas être trop significative sinon le sucre se cristallise. L'imprimante est contrôlée par une carte *Arduino ATmega 2560* programmée avec *Marlin Firmware*, un programme libre de droit pour l'impression 3D. La communication avec la carte Arduino se fait avec le langage code G. Ce code décrit ligne par ligne le mouvement de la tête d'impression selon les directions X, Y, Z et l'extrusion E. Les autres paramètres sont aussi renseignés, comme la température de la seringue et de la buse, la vitesse de déplacement et d'extrusion, l'activation ou la désactivation de la ventilation, etc. Il est possible d'écrire à la main les lignes de programme mais la génération du code G peut aussi se faire à l'aide de

*Slic3r*, un logiciel de tranchage, pour les géométries complexes. Pour ce faire, il faut transformer son objet en format STL puis le charger sur le logiciel libre de droit *Repetier Host* et trancher l'objet avec *Slic3r*. Le code G est alors généré avec les paramètres d'impression personnalisés pour l'impression de sucre vitrifié pour une valve aortique. Ces derniers sont les réglages d'impression (hauteur de couche, dimensions de la couche extérieure (en anglais *shell*)), de l'imprimante (diamètre de la buse, paramètres de rétraction) et du filament (température, diamètre). Il est nécessaire de vérifier couche par couche les déplacements de la buse afin de s'assurer que la valve sera bien imprimée.



**Figure 3.1** : Image d'une impression en cours d'un moule de valve aortique en sucre vitrifié.

La création d'un moule en sucre vitrifié se fait en plusieurs étapes. En premier, le sirop de sucre doit être préparé juste avant l'impression, la recette est expliquée en détails en *Annexe A: Recette du sirop de sucre*. La seringue est chauffée préalablement dans l'imprimante 3D avant de recueillir le sucre pour éviter un choc thermique. Puis, lorsque la seringue avec le sucre à l'intérieur est prête et que le dispositif de l'imprimante est monté, l'extrusion du sucre est lancée en faisant varier la température de la seringue et de la buse d'impression aux alentours de 93°C. Le sucre ne doit pas être trop liquide, ni trop solide, il faut trouver les températures adéquates pour avoir une bonne viscosité. Ensuite, l'impression peut être lancée avec les paramètres préalablement déterminés. Le moule est imprimé sur du plastique prétraité (pétris) car le sucre adhère à la surface, ceci permet de le déplacer sans le toucher et risquer de l'endommager. Lorsque l'impression est terminée, le moule doit être conservé au sec. Il est placé dans des boîtes en plastique avec des sachets absorbants. L'humidité étant un facteur très influant sur le comportement du sucre, un capteur d'humidité de l'air est présent dans le laboratoire afin de s'assurer que celle-ci est bien inférieure à 50%.

La **Figure 3.2** résume en images les étapes de fabrication d'une valve aortique par moulage dans un moule en sucre vitrifié fabriqué par impression 3D. Le moule en forme de valve aortique en sucre vitrifié est imprimé **(1)**. Avant de verser l'alginate dans le moule, ce dernier doit être nettoyé avec de l'éthanol à 80% pour enlever les impuretés de sucre entre les parois et vérifier l'absence de fuites. L'éthanol est coloré en vert afin de mieux

visualiser où sont les fuites, il est versé dans le moule et laissé pendant cinq à dix minutes avant d'être jeté (2). Il existe deux types de fuites dans le moule : les fuites internes et les fuites externes. Une fuite interne indique que, lors du moulage, de l'alginate sera dans la cavité interne du moule. Il pourra être retiré une fois le sucre dissous. Si la fuite est externe, il est possible de mettre du film paraffine pour boucher les trous du moule. Le nettoyage à l'éthanol permet aussi de dissoudre les petits filaments de sucre qui pourraient être entre ses parois. Ensuite, le mélange d'alginate est versé à l'aide d'un bécher dans le moule et il faut attendre dix minutes qu'il gélifie (3). Une fois solidifié, le moule avec la valve à l'intérieur est plongé dans une solution aqueuse à laquelle est ajoutée du  $\text{CaCl}_2$  (4). La solution aqueuse permet de dissoudre le sucre et le  $\text{CaCl}_2$  assure le maintien de la gélification de l'alginate.

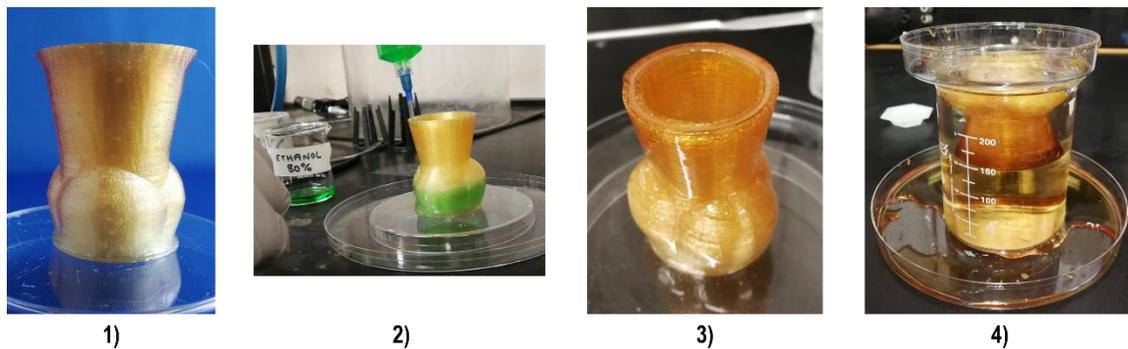


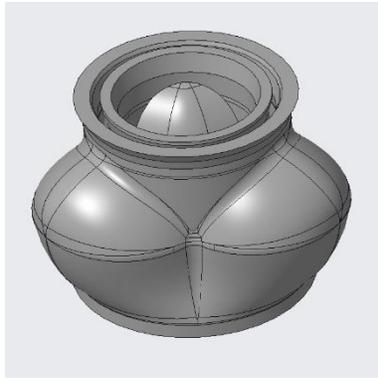
Figure 3.2 : Étapes de fabrication d'une valve aortique par moulage dans un moule en sucre vitrifié.

## 3.2 Conception et impression du moule

Dans cette partie, nous décrivons les étapes pour fabriquer un moule en sucre vitrifié en forme de valve aortique standard et les différents essais réalisés pour modifier le moule en sucre ou les paramètres d'impression afin de contrer les défauts que ce soit dans le moule en sucre ou bien dans la valve en alginate.

### 3.2.1 Premiers essais

Un moule de valve aortique avec une recette de glucose, de sucrose et de  $\text{CaCl}_2$  fut imprimé à partir d'un modèle existant réalisé par Jean François Provost Blais (Figure 3.3). Le moule était conçu pour une valve d'une épaisseur de 1 mm au niveau des feuillets et des sinus. De l'alginate fut coulé dans le moule afin de former la valve. Une fois l'hydrogel solidifié, le moule fut transféré dans un bécher rempli d'eau afin de dissoudre le sucre. La valve résultante avait une géométrie semblable à celle attendue mais était trois fois plus fine. Plusieurs hypothèses pouvaient expliquer ce résultat. Le moule n'avait pas été nettoyé à l'éthanol avant de couler l'alginate, ses parois étaient sûrement plus épaisses que désiré. Les expériences précédentes avaient été faites avec une recette de sucre sans  $\text{CaCl}_2$ , l'alginate dégradait probablement le sucre quand il était coulé et ainsi avait une plus grosse épaisseur finale. De plus, comme le moule imprimé n'avait pas de fond, lorsque l'alginate fut coulé, une grande partie était sorti par le bas du moule.



**Figure 3.3 : Image du premier moule conçu par l'équipe.**

Des améliorations pouvaient être réalisées pour pallier ces problèmes. Premièrement, faire un moule avec un fond pour empêcher l'alginate de couler par le bas. Puis, nettoyer le moule à l'éthanol afin d'enlever les imperfections et s'assurer qu'il n'y ait pas de fuite à l'intérieur, ceci n'ayant pas été fait pour la première valve. Enfin, agrandir l'épaisseur du moule afin d'avoir une valve suffisamment épaisse pour être manipulée. Ainsi, un moule fut réalisé en utilisant le logiciel de CAO (Conception Assistée par Ordinateur) *Solidworks* pour répondre à ces exigences.

Afin de créer le moule en forme de valve, la valve elle-même a dû être conçue (**Figure 3.4**). Pour ce faire, une esquisse d'une valve standard fut importée dans *Solidworks* et l'objet fut réalisé par construction surfacique. Le fait que la valve ne soit pas une pièce mécanique mais présente des courbures peu communes dans le monde industriel rendait difficile le travail sur le modèle. Le moule a ensuite été conçu en prenant les surfaces extérieures de la valve. Cette dernière avait une épaisseur plus grande que la précédente, de 1.5 mm partout, notamment au niveau des feuillets et des sinus avec un diamètre aortique de 22 mm. Le diamètre d'une valve aortique d'un homme adulte est autour de 23 mm et d'une femme adulte est autour de 21 mm [107, 108]. Un cône fut ajouté au-dessus de la valve afin de permettre sa fixation dans le bioréacteur cardiaque conçu par notre laboratoire.

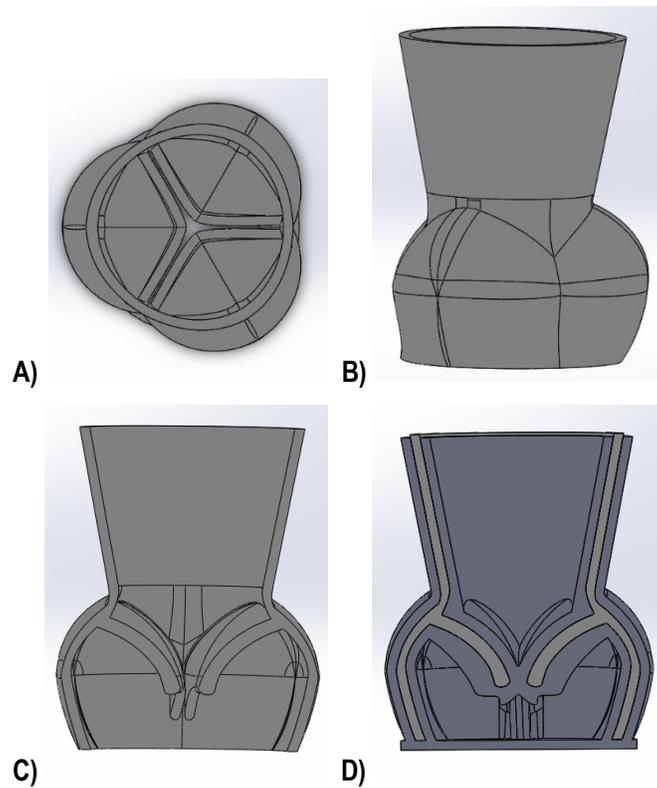


Figure 3.4 : Image de la valve aortique conçue sur *Solidworks* A) vue de dessous et B) vue de côté C) vue en coupe et D) image du moule avec la valve aortique vus en coupe.

Le moule a été tranché sur *Slic3r* avec les paramètres spécifiques à l'impression d'un moule de valve avec une buse de 0.5 mm. L'impression était de 40h avec 247 couches. Un sirop de sucre avec  $\text{CaCl}_2$  (voir *Annexe A: Recette du sirop de sucre*) a été utilisé et la température de la seringue et de la buse s'élevait à 92°C. La valve moulée (Figure 3.5) présentait de beaux feuillets mais les sinus étaient assez fragiles, la jonction entre les feuillets et les sinus était assez fine. L'alginate n'avait pas coulé en dessous du moule contrairement à l'essai précédent et la valve était plus épaisse. Le résultat obtenu était encourageant pour la suite.

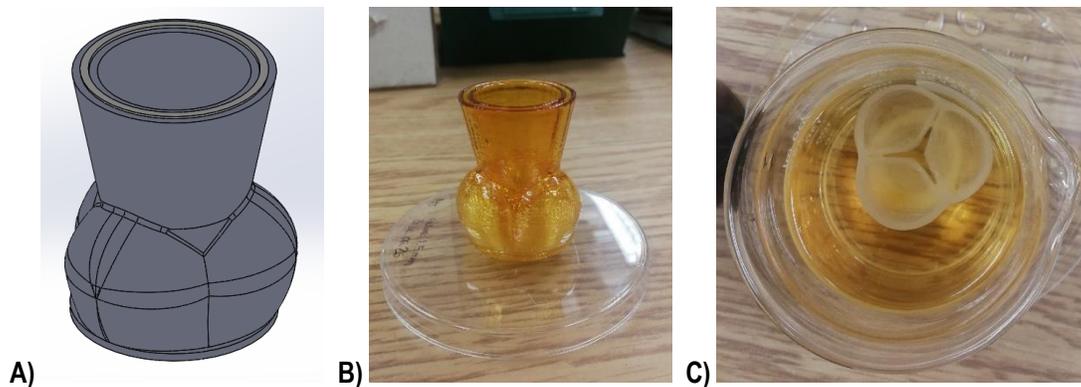


Figure 3.5 : Image A) du moule avec la valve sur *Solidworks*, B) du moule imprimé en sucre vitrifié et C) de la valve après dissolution du sucre dans un bécher, vue de dessous.

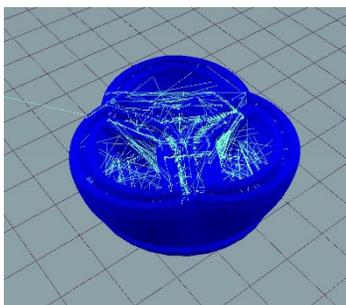
### 3.2.2 Modifications dans la conception et l'impression du moule

D'autres modifications ont été apportées au moule et à ses paramètres d'impression dans l'objectif d'obtenir un protocole répétable garantissant la production d'une valve aortique sans défaut. Les modifications principales apportées au moule sont présentées ci-après.

#### 3.2.2.1 Modification du code G

Un des défauts observés lors de l'impression est la présence de trous dans le moule, révélés lorsque ce dernier était nettoyé avec de l'éthanol à 80%. La présence de 20% d'eau permet de dissoudre les petites impuretés de sucres présentes entre les parois du moule et d'agrandir les trous déjà présents sans dissoudre le moule en entier. Dans ce cas, si les trous sont à l'extérieur, il est possible de mettre du film paraffine autour du moule pour les boucher. Néanmoins, ceci serait à éviter lorsque ce dernier sera utilisé en présence de cellules car il n'est pas possible de stériliser le film paraffine.

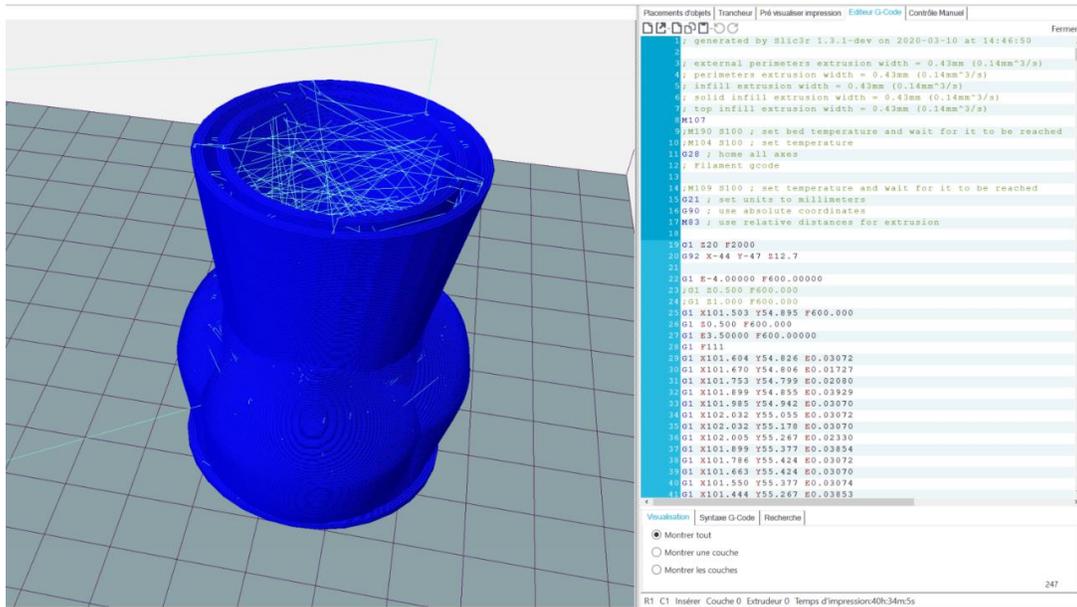
Après plusieurs impressions d'une première version du moule (**Figure 3.4**), il a été observé que les trous étaient présents aux mêmes endroits, à la moitié supérieure des sinus. Ainsi, le code G généré sur *Repetier Host* (**Figure 3.6**) a été modifié pour augmenter le taux d'extrusion du sucre à ce niveau à l'aide du logiciel *Matlab*. Il a été augmenté d'un facteur de 10%. Le moule imprimé ne présentait pas de trous à la moitié supérieure des sinus mais à la couche de transition de l'augmentation du taux d'extrusion.



**Figure 3.6 : Capture d'écran de *Repetier Host* avec le déplacement de la tête d'impression en bleu clair.**

Une nouvelle version du moule a alors été conçue en lissant les jonctions entre les sinus (ajout de congés) pour éviter les trous et le taux d'extrusion initial de sucre fut gardé. Des trous au niveau des feuillets ont été observés à de nombreuses reprises lors du moulage de la valve à l'alginate. Une hypothèse avancée pour expliquer ce phénomène était la présence potentielle de morceaux de sucre entre les parois du moule à ce niveau dû au déplacement de la tête d'impression pour faire la couche du moule extérieur et du moule intérieur. Lors du déplacement, si le sucre ne s'est pas solidifié à la sortie de la buse, un filament de sucre se forme entre la paroi intérieure et extérieure du moule, là où est versé l'alginate. Sur l'imprimante 3D personnalisée, un système de ventilation est présent pour accélérer la solidification du sucre, il est notamment utilisé lors de l'impression de filaments autoportants. Ainsi, la ventilation a été activée au niveau de l'impression des feuillets et des sinus afin d'accélérer la solidification du sucre à ce niveau et d'éviter le dépôt de particules de sucre entre les parois du

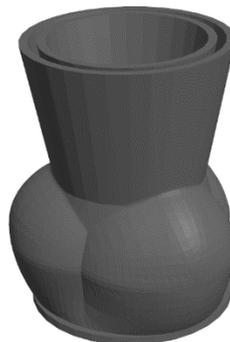
moule. Ceci a été fait en ajoutant une commande dans le code G sur *Repetier Host* (à droite dans la **Figure 3.7**). Lors du moulage des hydrogels d'alginate, les trous étaient moins présents au niveau des sinus et des feuillets mais il en restait souvent au niveau de la jonction feuillelet/sinus.



**Figure 3.7 :** Capture d'écran de la fenêtre de *Repetier Host* avec la valve tranchée en bleu, le déplacement de la tête d'impression en bleu clair.

### 3.2.2.2 Travail sur le STL

Lors du passage de la conception à l'impression, le modèle doit être transformé en format STL (**Figure 3.8**). L'objet *Solidworks* est maillé et représenté par des triangles. Il est possible de choisir la taille des triangles afin d'avoir une géométrie plus ou moins fidèle au design initial. Plus les triangles sont petits, plus leur nombre augmente, et plus le STL est précis. Des essais ont été réalisés en changeant le nombre de triangles, et le résultat était que la géométrie du moule après le tranchage sur *Slic3r* était identique peu importe la précision choisie. Ainsi, afin d'alléger le fichier STL créé, une précision grossière fut choisie pour l'exportation du fichier *Solidworks* en STL.



**Figure 3.8 :** Moule en format STL.

### 3.2.2.3 Modification de la recette de sucre

Étant donné que l'équipe utilisait auparavant une recette de sucre différente et qu'elle avait réussi à faire des valves en alginate sans trous, la même recette de sucre a été réalisée pour voir si cela permettait d'éviter les trous dans la valve. Le sirop précédent était composé de glucose, de sucrose et de  $\text{CaCl}_2$  alors que celui actuel contient uniquement du sucrose et du  $\text{CaCl}_2$ . Les paramètres d'impression sont restés identiques. Le moule imprimé commençait déjà à fondre un peu à la fin de l'impression mais il a été mis au réfrigérateur pour qu'il se solidifie. Il présentait des fuites comme pour certains moules imprimés avec la recette habituelle de sucre. La valve finale avait certains trous en bas des sinus, ceci est probablement à cause du sucre qui est plus visqueux avec la recette glucose + sucrose +  $\text{CaCl}_2$ , ceci a augmenté le nombre de défauts dans le moule (**Figure 3.9**). Ainsi, nous avons conclu que ce n'était pas la recette de sucre qui influait sur la présence de trous dans l'alginate.

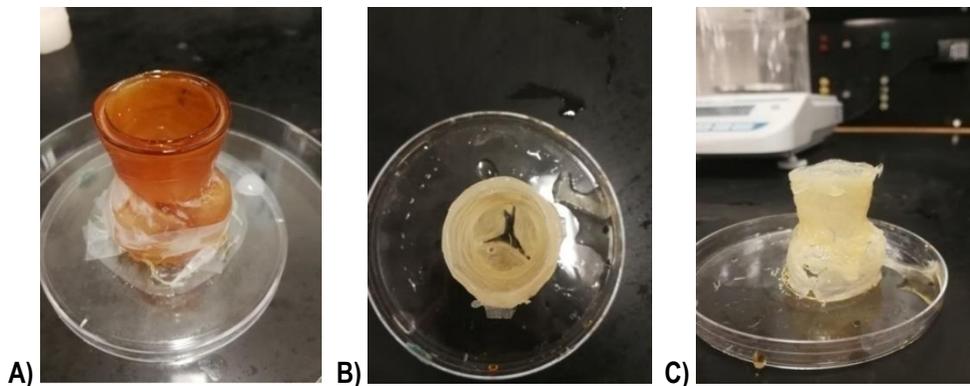


Figure 3.9 : Images A) du moule avec la recette glucose + sucrose +  $\text{CaCl}_2$  et la valve en alginate résultante, B) vue de dessus et C) vue de côté.

### 3.2.2.4 Augmentation de l'espace entre les sinus et les feuillets

Pour répondre au problème de trous à la jonction entre sinus et feuillet, le moule a été modifié sur *Solidworks* dans le but d'augmenter l'espace à ce niveau afin que l'alginate atteigne mieux cette jonction et éviter la formation de bulles. Lors du premier essai, une fuite a été observée à la jonction de deux sinus pour le moule en sucre lors du nettoyage à l'éthanol mais l'alginate n'avait pas trop fui lors du moulage. La valve avait de beaux feuillets et sinus, mais présentait de petits trous sur un côté (**Figure 3.10 C**). D'autres valves ont été moulées avec ce modèle de moule et à plusieurs reprises des trous étaient encore présents à la jonction feuillet/sinus malgré qu'ils soient moins courants que pour les autres moules (**Figure 3.10 E F**).

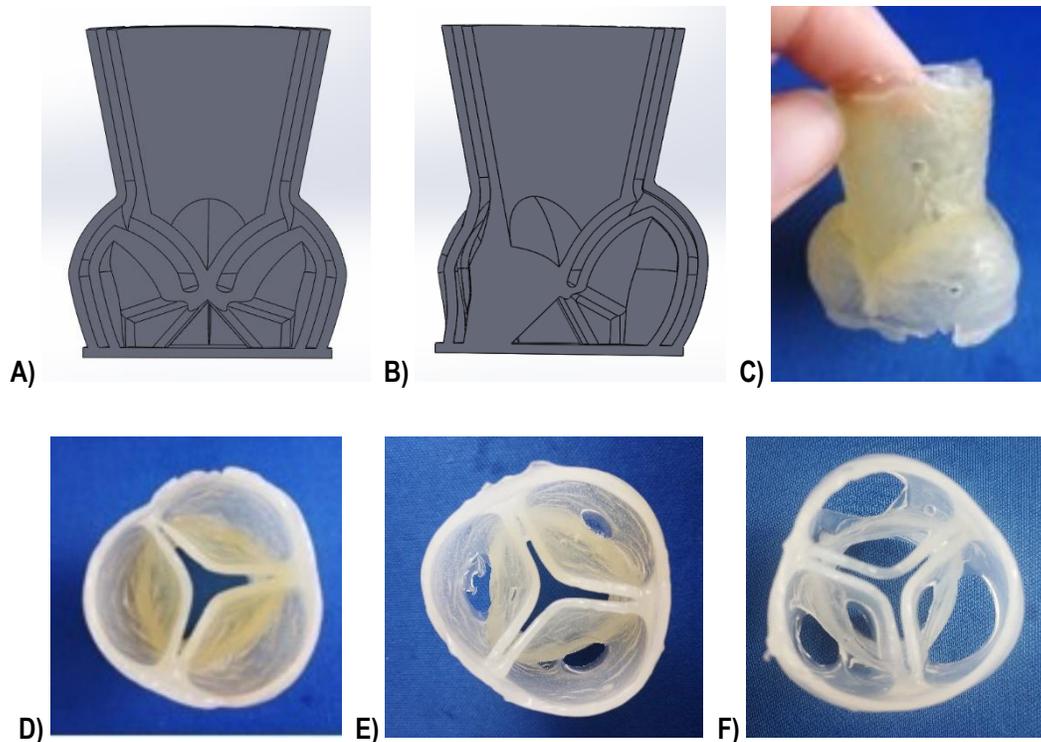


Figure 3.10 : A) et B) Images du nouveau moule vue en coupe sur *Solidworks*. Image de la première valve moulée avec le nouveau moule C) vue de côté et D) vue de dessous. E) et F) Images vue de dessous d'autres valves produites avec ce moule.

### 3.2.2.5 Ajout d'un entonnoir

Dans l'objectif de reproduire le moulage au LOEX en conditions stériles, plusieurs outils ont été testés pour verser l'hydrogel d'alginate dans le moule en sucre. Le volume total d'alginate nécessaire pour fabriquer la valve est de l'ordre de 9 mL. En utilisant une pipette de 10 mL, l'alginate se gélifiait en partie dedans avant de pouvoir le couler dans le moule. Un essai a été réalisé avec une pipette de 25 mL, dont l'embout est plus gros, et l'alginate coulait sans se gélifier dans la pipette mais glissait encore trop doucement. La meilleure méthode trouvée pour verser l'alginate est d'employer un bécher.

Cependant, il est difficile de verser l'hydrogel sans déborder du moule car l'espace entre les deux parois est petit et ceci n'est pas acceptable lorsque des cellules seront incorporées à l'alginate. En effet, il est nécessaire de respecter les conditions de stérilité et de perdre le moins de cellules possible. Ainsi, un entonnoir a été ajouté au-dessus du cône du moule sur *Solidworks* (Figure 3.11 B) et C). L'hydrogel se verse plus facilement avec le bécher, sans débordement; ceci permet de le couler rapidement dans le moule et qu'il ait le temps de se gélifier à l'intérieur. La Figure 3.11 montre la valve résultante sans bulles, ni trous dans l'hydrogel. Ainsi, pour les prochaines conceptions, un entonnoir est ajouté au moule.

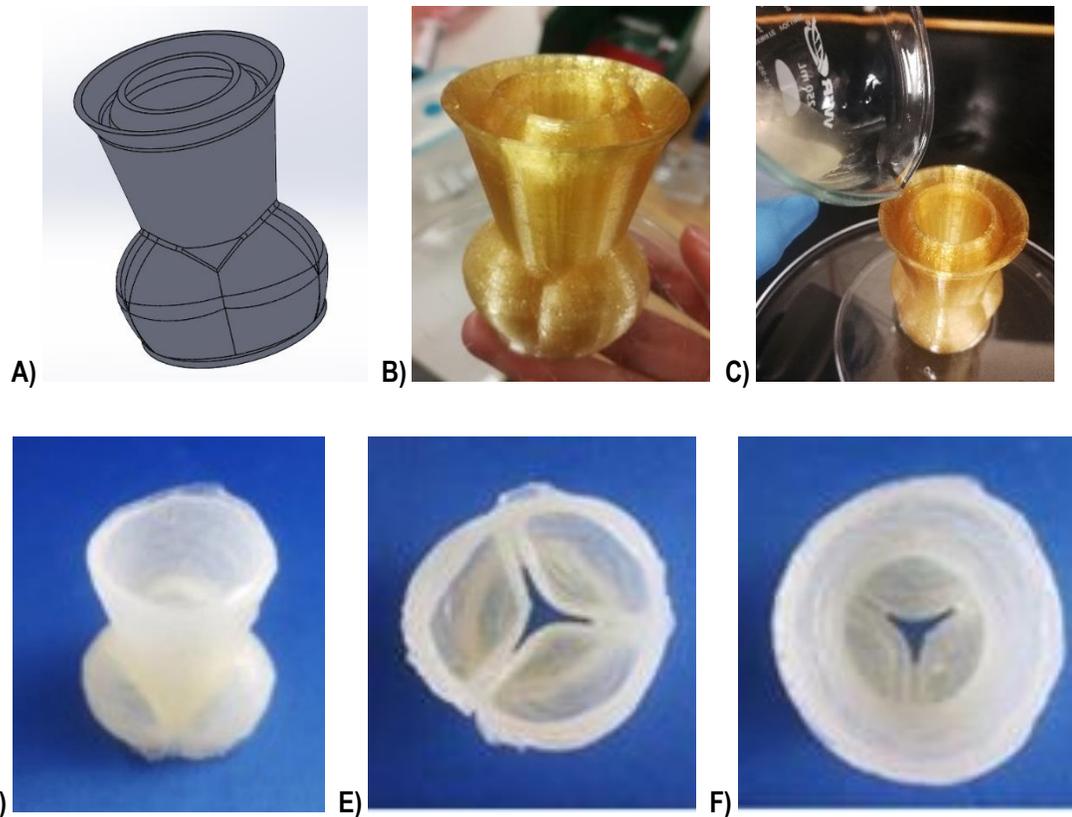


Figure 3.11 : Image du moule avec un entonnoir A) conçu sur *Solidworks* B) imprimé en sucre vitrifié, C) du versement de l'alginate avec un bécher et de la valve moulée D) vue de côté, E) vue de dessous et F) vue de dessus.

### 3.2.2.6 Essais avec un moule sans cône

Des trous étaient toujours présents dans la valve en alginate et toujours à la jonction entre sinus et feuillet. Une hypothèse était que l'alginate se gélifiait dans le cône avant d'atteindre le haut des sinus et des feuillets. Des moules sans cône ont été imprimés pour vérifier ceci. Pour une valve, seulement un trou était situé à une des jonctions feuillet/sinus et deux petites bulles aux deux autres jonctions (Figure 3.12). Pour une autre valve sans cône, des trous étaient aussi présents à la jonction. Nous avons alors réfuté cette hypothèse.

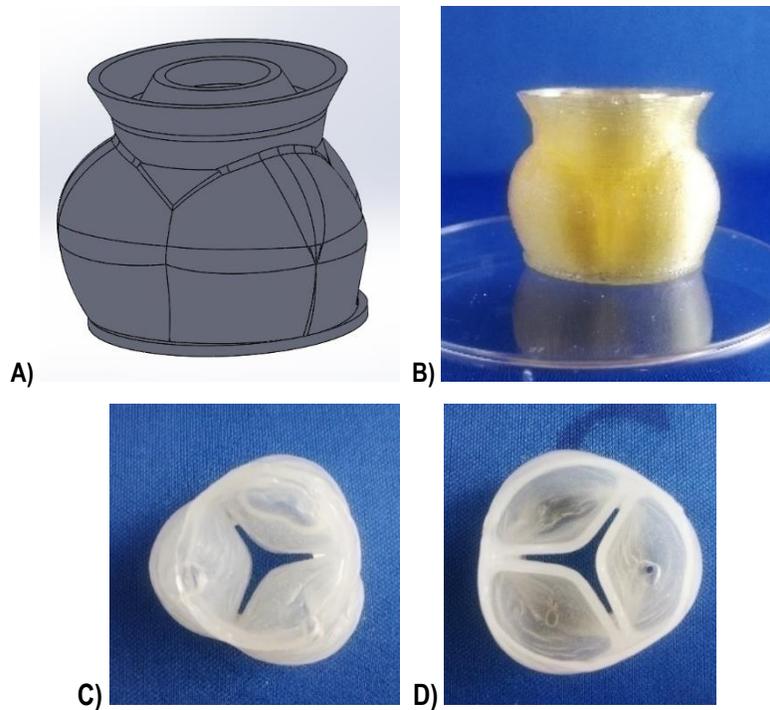
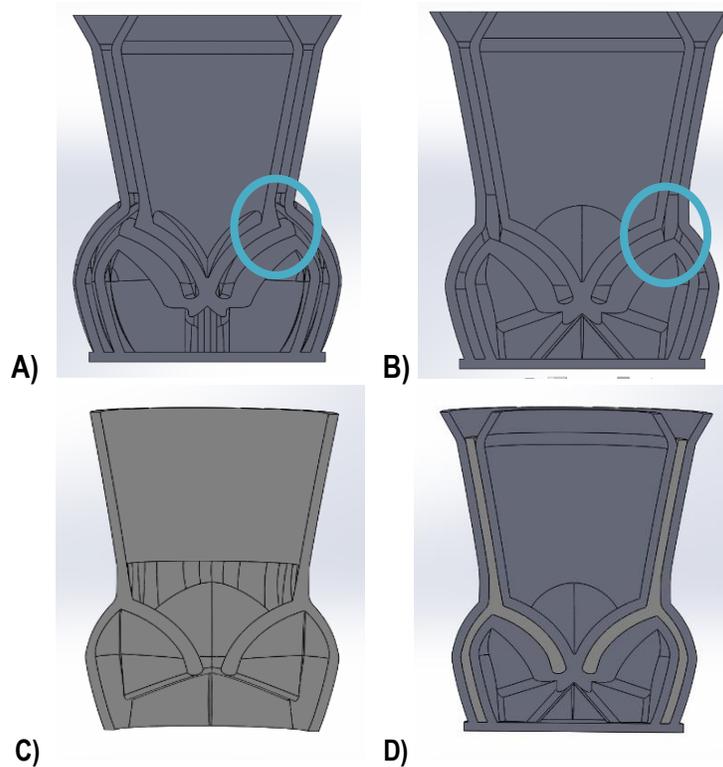


Figure 3.12 : Image du moule sans cône A) conçu sur *Solidworks* B) imprimé en sucre vitrifié, et de la valve moulée C) vue de dessus et D) vue de dessous.

### 3.2.3 Design final du moule et paramètres finaux d'impression

Étant donné que les problèmes de trous au niveau de la jonction feuillet/sinus persistaient, la géométrie du moule a été analysée plus en détails. Il a été observé que l'arrivée du cône n'était pas juste au-dessus de la jonction feuillet/sinus (Figure 3.13 A). La jonction avec le cône était courbée, ce qui pouvait empêcher l'alginate de couler dans cette section ou empêcher les bulles qui s'étaient formées lors du versement de celui-ci de remonter à la surface. La valve et le moule ont donc été modifiés afin que le cône soit juste au-dessus de la jonction feuillet/sinus et lissé les parois du moule à ce niveau afin que l'alginate coule en même temps dans les feuillets et les sinus (Figure 3.13 B).



**Figure 3.13 : A) Image du moule initial, B) du moule modifié, C) de la valve modifiée. D) Image de la valve et du moule modifiés sur *Solidworks*.**

Lors de la première impression du nouveau moule, des fuites ont été observées pendant le nettoyage avec de l'éthanol. La valve finale présentait quand même des trous au niveau du haut d'un feuillet et de la jonction feuillet/sinus (**Figure 3.14 B) et C)**). Pendant une période, j'ai alors imprimé la version précédente du moule pour lequel j'avais réussi à avoir à plusieurs reprises de beaux résultats. Puis, j'ai travaillé sur la fabrication de l'hydrogel d'alginate qui est décrite dans le **Chapitre 4.1**. Lorsque le procédé de fabrication de l'alginate fut établi, j'ai imprimé d'autres moules en sucre avec la géométrie décrite dans cette partie et j'ai moulé les valves avec la recette finale d'alginate, les résultats étaient probants. Les deux moules imprimés ne présentaient pas de défauts et les valves moulées n'avaient pas de trous au niveau de la jonction feuillet/sinus. La première valve avait un trou en bas d'un sinus et la deuxième valve était sans trous, ni de bulles, notamment à la jonction feuillet/sinus (**Figure 3.14**). La suite du travail a été effectué par l'étudiant Yannick Rioux qui poursuit le projet de maîtrise.

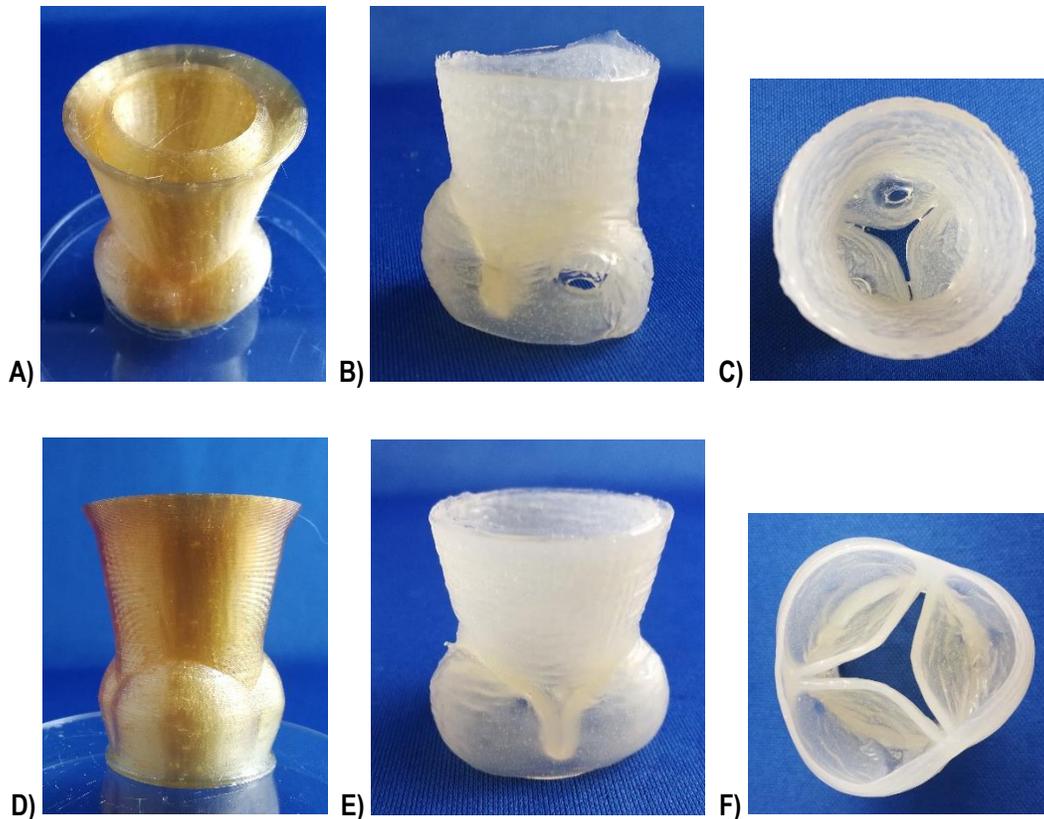


Figure 3.14 : Images A) et D) du moule en sucre de la géométrie finale et de la valve moulée avec la recette d'alginate finale B) et E) vue de côté et C) vue de dessus et F) vue de dessous.

### 3.3 Conclusion et perspectives

De nombreux paramètres influencent le succès du moule final et du moulage de la valve. Nous avons étudié plusieurs de ces éléments afin d'obtenir un moule qui suit la géométrie complexe de la valve aortique et qui soit reproductible. La méthodologie était de faire des essais erreurs. Des hypothèses ont été formulées par rapport aux résultats obtenus, puis des solutions ont été proposées et testées pour contrer les problèmes. Nous avons travaillé sur la conception du moule pour modifier sa géométrie, sur les paramètres d'impression (code G, STL) et sur l'encre d'impression (recette de sucre) afin d'obtenir un protocole de fabrication du moule le plus robuste possible. Les derniers résultats avec le moule final sont prometteurs. La présence d'un entonnoir permet de verser l'alginate de manière homogène. Le fait d'avoir un cône juste au-dessus de la jonction feuillet/sinus et d'avoir augmenté l'espace à ce niveau permet de réduire le nombre de trous dans la valve à cette jonction.

La fabrication d'une valve aortique sans défaut passe par un travail sur le moule en sucre mais aussi sur l'hydrogel d'alginate. Lorsque le moule en sucre avait une géométrie qui permettait de mouler des valves en alginate avec peu de défauts, l'étude a été ensuite menée sur l'hydrogel d'alginate et le protocole pour le fabriquer, le verser et le conserver. Elle est détaillée dans le chapitre suivant du mémoire.

# Chapitre 4 Fabrication d'une valve aortique en alginate et essais en bioréacteur

## 4.1 Moulage à l'alginate

L'alginate est l'hydrogel choisi par l'équipe pour mouler les valves cardiaques car il est biocompatible : il est souvent utilisé en biomédecine pour la cicatrisation, l'administration de médicaments ou pour des applications en génie tissulaire. De plus, il est peu cher et différentes réticulations sont possibles, notamment avec les ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) [109]. Les cations divalents ont une affinité avec les blocs G de l'alginate et forment une liaison entre ces blocs, c'est une réticulation en structure de boîtes d'œufs résultant en un gel (Figure 4.1). Il est possible d'utiliser du chlorure de calcium ( $\text{CaCl}_2$ ) pour la réticulation mais ceci amène à une gélification rapide et peu contrôlée car celui-ci est très soluble dans l'eau [110].

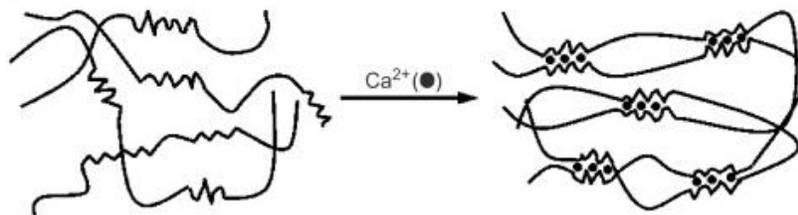


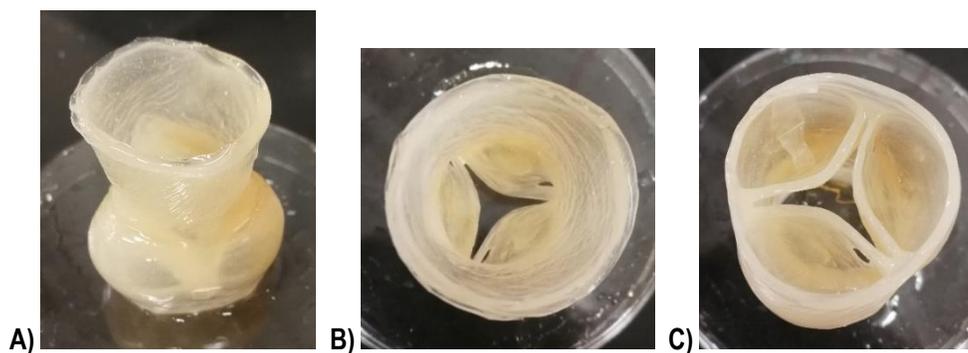
Figure 4.1 : Hydrogel d'alginate formé par réticulation avec les ions calcium, structure en forme de "boîte d'œufs", issu de [110].

Dans notre projet, le D-glucono-1,5-lactone (GDL) et le carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ ), des molécules non toxiques, sont utilisés comme agents de réticulation. Le  $\text{CaCO}_3$  a une solubilité basse permettant de ralentir la gélification et d'augmenter le temps de travail de formation du gel d'alginate. L'ajout de GDL à l'alginate mélangé au  $\text{CaCO}_3$  permet de dissocier les ions calcium du  $\text{CaCO}_3$  en abaissant le pH. Les ions libérés initient alors la gélification de l'alginate de manière graduelle. Les proportions molaires doivent être de 2 : 1 (GDL :  $\text{CaCO}_3$ ) afin d'avoir un pH final neutre (pH nécessaire pour les cellules). Auparavant, l'équipe utilisait du  $\text{CaCO}_3$  en microparticules mais présentement du  $\text{CaCO}_3$  en nanoparticules (15 - 40 nm) est utilisé afin que les particules se diffusent plus facilement dans l'alginate. Du  $\text{CaCl}_2$  est ajouté à la solution aqueuse utilisée afin de dissoudre le moule en sucre car il permet de gélifier les parois extérieures de la valve, comme le  $\text{CaCl}_2$  ajouté dans la recette de sucre pour l'impression 3D du moule.

### 4.1.1 Fabrication du gel d'alginate

Lors de la fabrication des valves, la présence de défauts était récurrente, notamment au niveau de la jonction entre les sinus et les feuillets. La géométrie du moule a été travaillée (**Chapitre 3**). Puis, différentes proportions de  $\text{CaCO}_3$ , de GDL, et d'alginate ont été testées pour évaluer la consistance et le temps de gélification de l'hydrogel et voir si cela influait sur la présence de défauts dans les valves. De plus, nous avons cherché à diminuer la concentration d'alginate car la littérature suggère qu'une concentration élevée est nocive pour la viabilité des cellules [104, 111-113]. Néanmoins, une concentration suffisamment élevée devait être conservée pour maintenir une bonne résistance mécanique de la valve. Une description des différents essais réalisés sera faite dans cette partie.

Pour les premières valves, la procédure de moulage de l'alginate employée est décrite en *Annexe B : Recette de fabrication d'un gel à 4% d'alginate*. La concentration finale d'alginate est de 0.04 g/mL, soit 4%. Ce pourcentage permet d'obtenir une valve assez rigide et résistante, et il est considéré comme un pourcentage élevé lorsque l'alginate est employé avec des cellules [104, 111, 113]. Le  $\text{CaCO}_3$  est à une concentration finale de 0.48% et le GDL est à 1.62%. La **Figure 4.2** montre une valve résultante avec ces proportions, elle présente de beaux feuillets et sinus, malgré le fait que deux petits trous soient présents au niveau de deux feuillets.



**Figure 4.2 :** Images d'une valve moulée à 4% d'alginate A) vue de côté B) vue de dessus et C) vue de dessous.

D'autres valves ont été moulées (**Figure 4.3**) avec le même moule en sucre et la même recette d'alginate mais les résultats étaient moins probants que la valve montrée à la **Figure 4.2**, le taux de réussite pour le moulage est de 50% (n = 6).

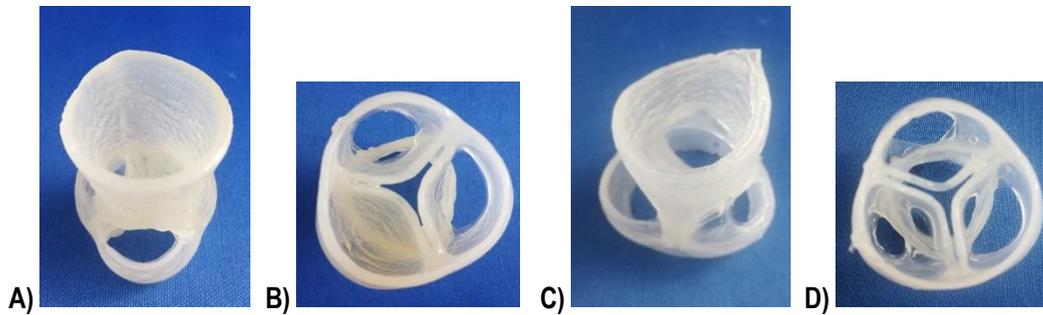


Figure 4.3 : Images de valves à 4% d'alginate avec présence de trous A) et C) vues de dessus et B) et D) vues de dessous.

Quelques gouttes de colorant alimentaire ont été ajoutées dans la préparation d'alginate afin de mieux observer comment cette dernière coulait dans le moule. Ceci permettait de voir où se formaient les trous mais le moule était trop opaque pour pouvoir observer la formation de bulles dans l'alginate (Figure 4.4).

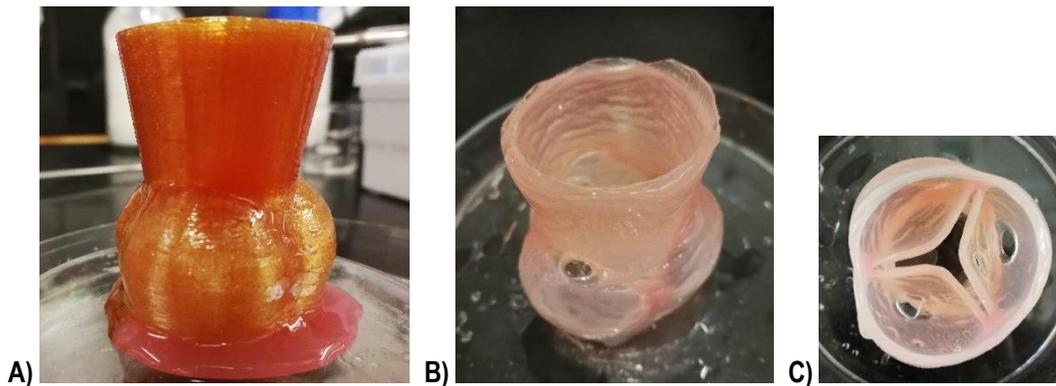


Figure 4.4 : Images A) du moule en sucre avec l'alginate à l'intérieur et de la valve en alginate à 4% colorée en rouge B) vue de côté et C) vue de dessous.

Étant donné les problèmes de trous dans la valve, nous avons supposé que ceux-ci étaient dus à la gélification trop rapide de l'alginate dans le moule. En étudiant les recettes d'alginate utilisées auparavant par l'équipe, il a été remarqué que dans l'expérience de cubes d'alginate (**Chapitre 2.2**), les proportions de  $\text{CaCO}_3$  et de GDL étaient différentes de celles utilisées dans nos expériences. Les proportions de  $\text{CaCO}_3$  et de GDL de l'expérience des cubes d'alginate (0.28% de  $\text{CaCO}_3$  et 0.96% de GDL) ont été testées en gardant une concentration d'alginate finale de 4%. La valve résultante (**Figure 4.5**) présentait des trous à la jonction feuille/sinus et était beaucoup plus fragile que celles réalisées jusqu'à maintenant.

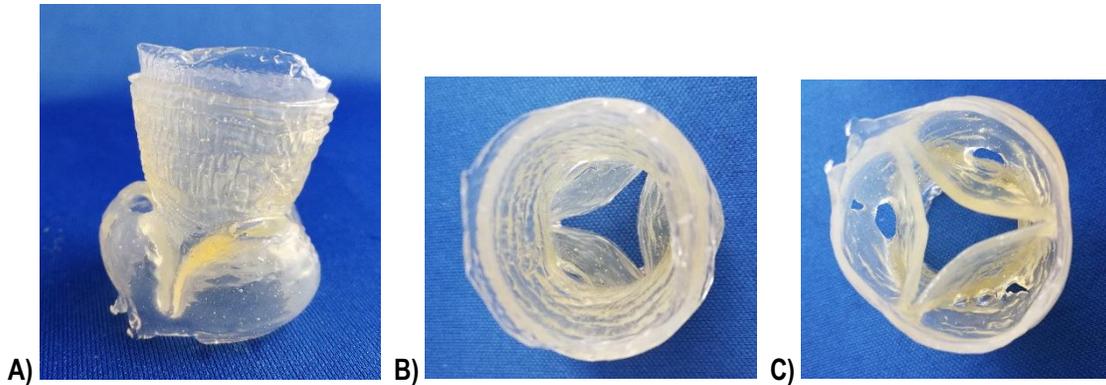


Figure 4.5 : Image d'une valve à 4% d'alginate avec 0.28% de GDL et 0.96% de  $\text{CaCO}_3$  A) vue de côté, B) vue de dessus et C) vue de dessous.

Des essais avec différentes proportions d'alginate et de  $\text{CaCO}_3$  ont été effectués dans des nacelles (Figure 4.6) :

- Hydrogel n°1 : 1.62% de GDL, 0.48% de  $\text{CaCO}_3$  et 4% d'alginate (la recette initiale avec 4% d'alginate, à gauche de la figure)
- Hydrogel n°2 : 1.62% de GDL, 0.24% de  $\text{CaCO}_3$  et 4% d'alginate (au milieu)
- Hydrogel n°3 : 1.62% de GDL, 0.48% de  $\text{CaCO}_3$  et 5% d'alginate (à droite).

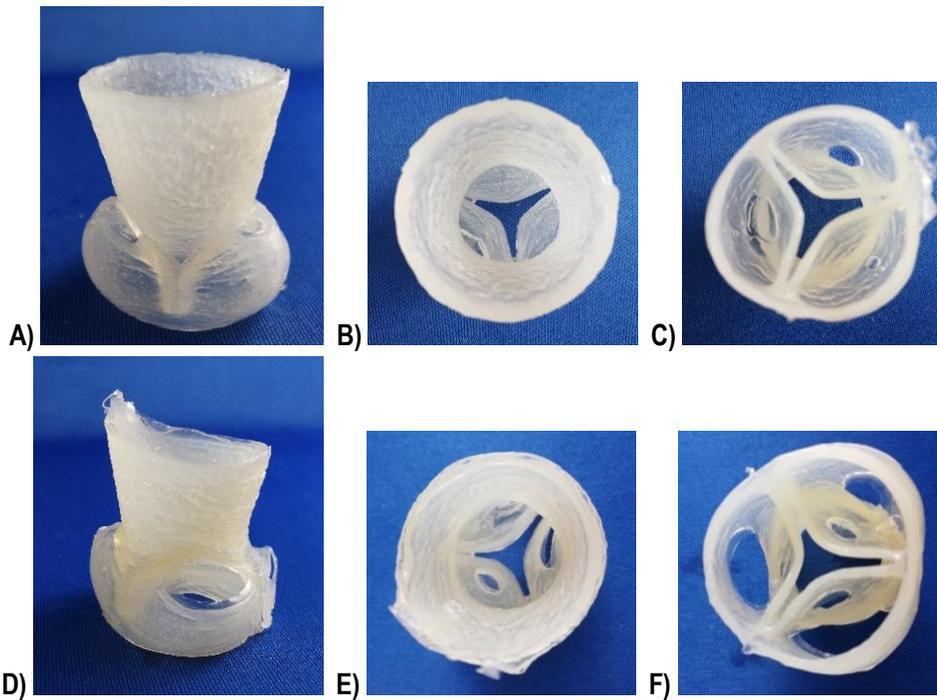
Les trois hydrogels ont bien gélifié. L'hydrogel n°2 était plus transparent et malléable que les deux autres mais plus fragile. L'hydrogel n°3 était plus dense et solide que l'hydrogel n°1. Il en a été conclu que la recette initiale (hydrogel n°1) était la meilleure par rapport à l'élasticité et la résistance de l'alginate.



Figure 4.6 : Image des différentes recettes d'alginate réalisées.

Une fois les concentrations finales de  $\text{CaCO}_3$ , de GDL et d'alginate établies pour avoir une valve consistante (1.62% de GDL, 0.48% de  $\text{CaCO}_3$ , et 4% d'alginate) nous avons cherché à diminuer le pourcentage total d'alginate. Avec un alginate moins concentré, donc moins visqueux, la solution se verserait mieux dans le moule et ceci pourrait diminuer la présence de trous. De plus, la diminution du pourcentage en alginate permettrait d'améliorer les conditions de viabilité et de prolifération des cellules [111, 112]. Dans un premier temps, la solution d'alginate a été diminuée de 4% à 3.5%. Dans la préparation de l'alginate; 4.08 g de sodium d'alginate (au lieu de 4.66 g) ont été mélangés avec 100 mL d'eau distillée (voir Annexe C : Calcul de concentration), le reste du protocole est resté identique (voir Annexe B : Recette de fabrication d'un gel à 4% d'alginate).

Les valves à 3.5% d'alginate sont présentées à la **Figure 4.7**. Elles étaient moins rigides au toucher que les valves à 4% d'alginate et se maintenaient bien en place.



**Figure 4.7 :** Image de valves à 3.5% d'alginate A) et D) vues de côté, B) et E) vues de dessus et C) et F) vues de dessous.

#### 4.1.2 Recette finale

Le pourcentage d'alginate a été diminué de 3.5% à 3%. Une solution avec 3.5 g de sodium d'alginate diluée dans 100 mL d'eau distillée fut préparée (*Annexe C : Calcul de concentration*) et le reste du protocole en *Annexe B : Recette de fabrication d'un gel à 4% d'alginate* fut suivi. Les valves étaient plus flexibles et se maintenaient bien en place aussi, mais elles paraissaient plus fragiles que les valves à 4% d'alginate (**Figure 4.8**).

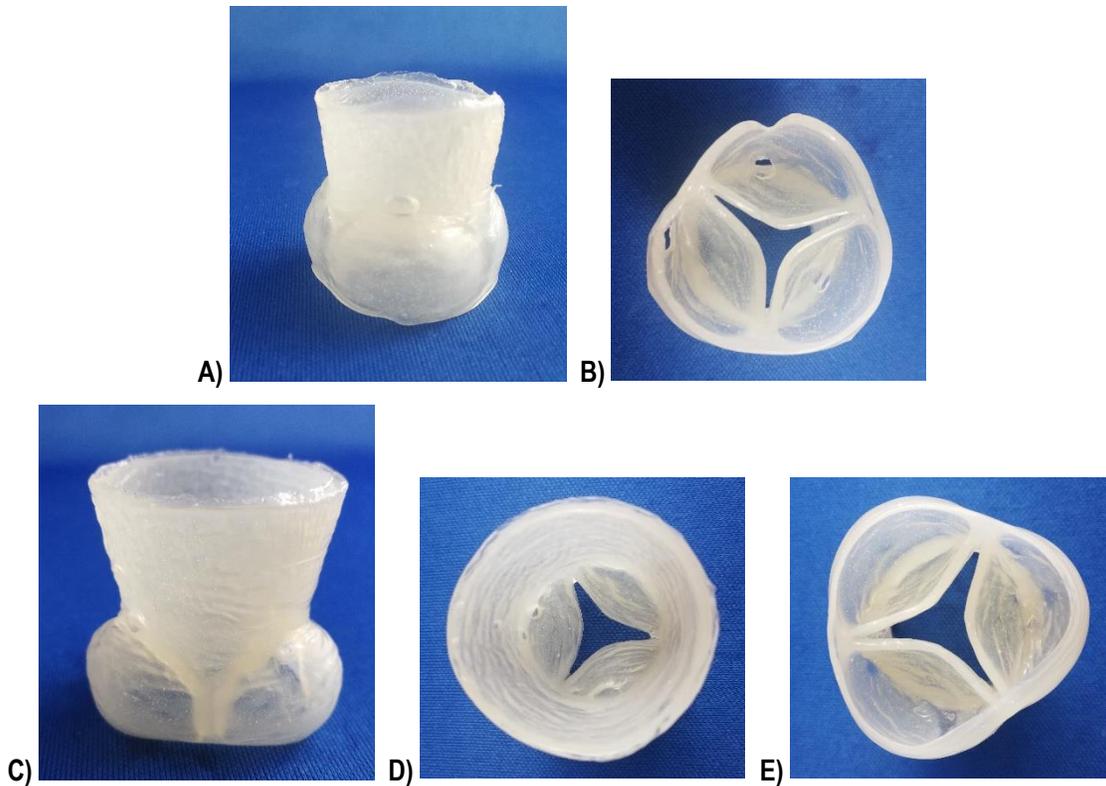


Figure 4.8 : Images de valves à 3% d'alginate avec la dernière version du moule (Chapitre 3.2.3) A) et C) vues de côté, B) et E) vues de dessous et D) vue de dessus.

Au début des expériences, de l'alginate à 4% était utilisé car il est nécessaire d'avoir un pourcentage assez élevé d'alginate pour avoir une bonne résistance mécanique mais le pourcentage a été diminué car un pourcentage élevé d'alginate a un impact sur la viabilité cellulaire. Le pourcentage d'alginate est passé de 4% à 3% avec une valve qui se maintenait en place. Ensuite, la résistance mécanique de la valve a été testée en bioréacteur.

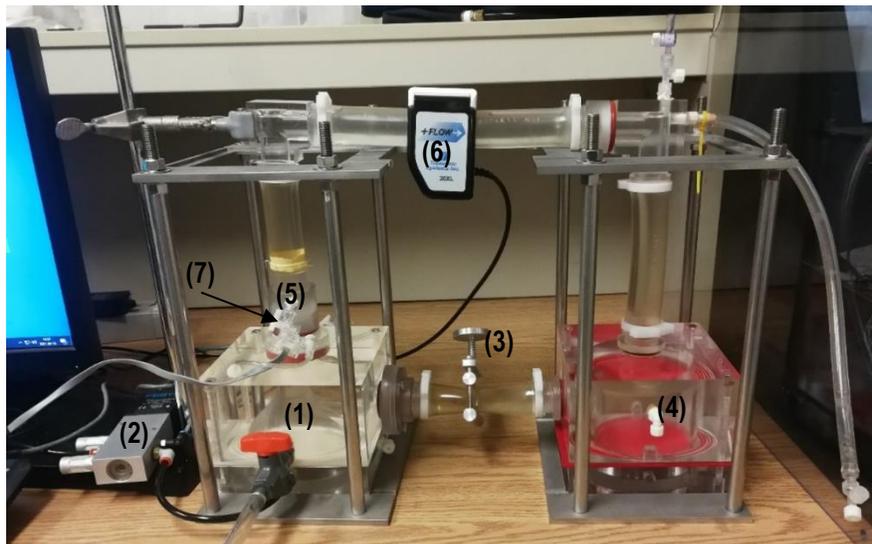
## 4.2 Essais en bioréacteur

### 4.2.1 Introduction sur les bioréacteurs

Un bioréacteur cardiaque est une machine dont l'objectif est de reproduire l'environnement physiologique du cœur en imposant des conditions de débit et de pression. Le débit joue un rôle important lors du conditionnement des substituts valvulaires. Il existe plusieurs types de bioréacteurs. Le *bioréacteur à débit* a un impact sur le conditionnement mécanique des tissus étant donné que des contraintes sont générées par la circulation du fluide. Il n'y a aucun contrôle sur la pression. Au contraire, le *bioréacteur à pression* a un impact sur la déformation des feuillets dû à des différences de pressions. Il existe aussi des *bioréacteurs à débit et à pression*, où le débit est contrôlé par une pompe et la pression est ajustée avec des éléments modulateurs complémentaires de la pompe [114]. Une valve cardiaque produite avec des tissus biologiques peut être placée

dans un bioréacteur qui imite le mieux possible les conditions physiologiques de débit et de pression, une culture dynamique dans des conditions de grande similitude. Le flux de fluide permet de déformer les biomatériaux contenant des cellules comme s'ils étaient implantés dans le corps d'un humain. Il est possible de faire circuler du milieu de culture de façon pulsée comme dans des vaisseaux sanguins, ce qui permet l'augmentation de la différenciation des cellules et de la synthèse de la MEC selon *Grayson et al.* [115]. La culture dynamique diffère des expériences précédentes avec des cubes d'alginate qui étaient en culture quasi statique (**Chapitre 2.2**), un flux constant de milieu permettait un mouvement de fluide mais ne représentait pas les conditions physiologiques du cœur.

L'équipe a conçu un bioréacteur cardiaque à débit (**Figure 4.9**) reproduisant de façon très précise le débit et la pression produits par le cœur [116, 117]. Il est composé de cinq éléments permettant d'imiter les conditions physiologiques du cœur humain. Une pompe ventriculaire avec membrane déformable flexible **(1)** entraînée par une chambre à air compressé imite le ventricule gauche. Un clapet anti-retour **(2)** qui dirige le flux au port d'entrée de la pompe imite la valve mitrale. Une résistance ajustable pinçant le tube flexible **(3)** représente la résistance de flux des capillaires sanguins. Une chambre de compliance servo-commandée **(4)** entraînée par l'air comprimé reproduit l'élasticité artérielle. Enfin, la valve est déposée dans un support personnalisé **(5)** et positionné à la sortie de la pompe ventriculaire. Le contrôle dynamique se fait avec le débit grâce à une servovalve située entre la pompe et le réservoir d'air sous pression. Un débitmètre **(6)** permet de mesurer le débit du fluide, et deux capteurs de pression **(7)** positionnés en amont et en aval de la valve permettent de mesurer la pression. Les essais rapportés ici ont été réalisés avec de l'eau distillée.



**Figure 4.9 : Bioréacteur cardiaque conçu par notre équipe.**

## 4.2.2 Fabrication d'un support personnalisé pour la valve

Nous avons essayé de placer les valves dans les supports existants conçus par l'équipe mais celles-ci ayant des dimensions différentes des valves utilisées auparavant, il n'était pas possible de les insérer. Ainsi, un nouveau support a été conçu selon les dimensions de la valve réalisée sur *Solidworks* et ensuite il a été usiné dans notre laboratoire. Il s'est révélé que le support était trop grand et non adapté aux valves actuelles car la taille de ces dernières diffère par rapport à la valve théorique conçue. Afin de fabriquer un support qui soit adapté aux valves en alginate, des mesures ont été effectuées sur celles-ci à l'aide d'un pied à coulisse et ont été comparées à la valve théorique. Les graphiques **Figure 4.10** et **Figure 4.11** représentent les mesures caractéristiques de la valve et utiles pour le dimensionnement du support. Les valeurs ont été mesurées sur un total de onze valves, plusieurs mesures ont été prises pour une dimension lorsque cela était possible et la moyenne de chaque dimension a été prise. L'écart type entre les dimensions des valves est représenté sur le graphique, il est souvent faible, ce qui montre une variation faible entre les mesures des valves, ainsi les valves moulées ont des dimensions similaires même si elles sont éloignées des dimensions théoriques. Ceci implique qu'elles pourront toutes être insérées dans le même support. Il est important d'avoir un support adapté, ni trop serré afin de pouvoir insérer la valve sans la briser, ni trop grand afin qu'elle puisse rester immobile lors du passage du fluide. Un nouveau support a donc été conçu sur *PTC Creo* (**Figure 4.12**) et usiné en polycarbonate, un matériau qui peut être autoclavé et ainsi stérilisé.

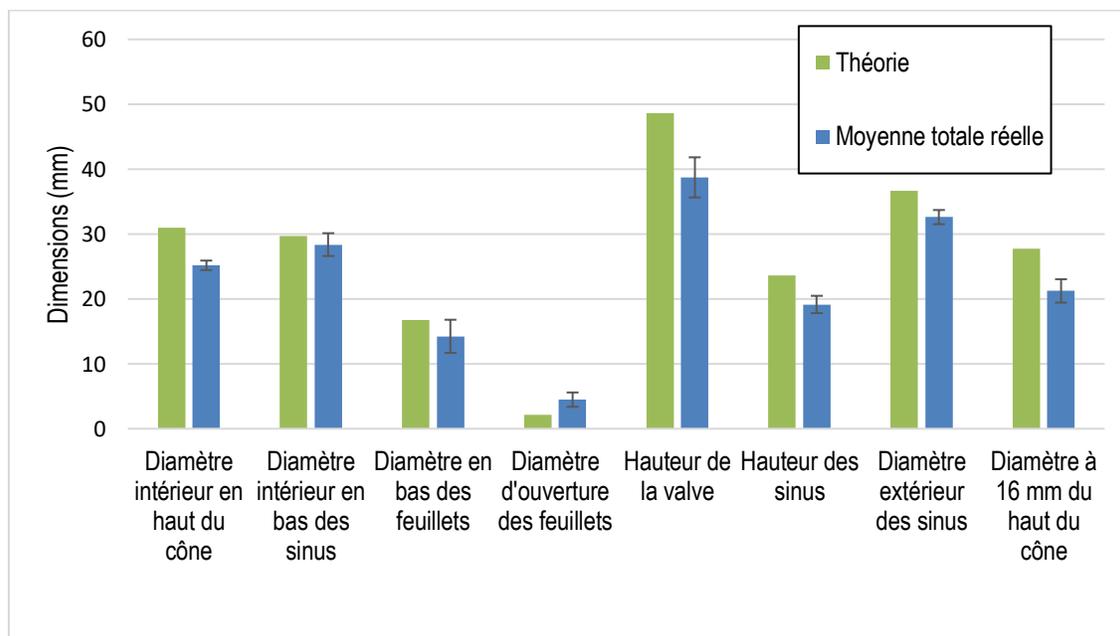


Figure 4.10 : Graphique de comparaison des dimensions de la valve théoriques et réelles, n = 11.

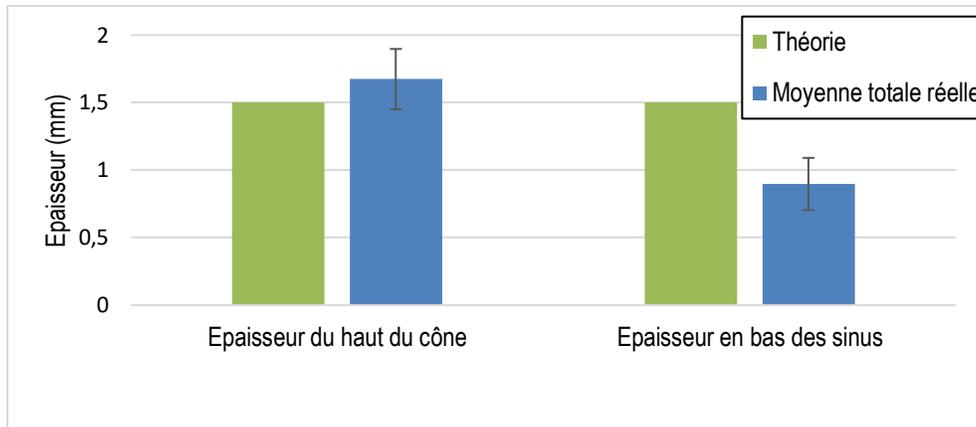


Figure 4.11 : Graphique de comparaison des épaisseurs de la valve d'alginate théoriques et réelles, n = 11.

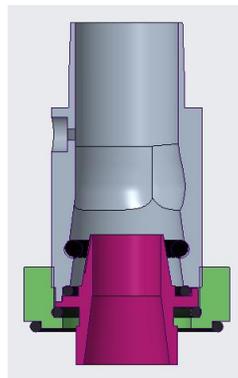


Figure 4.12 : Image du support de valve pour le bioréacteur conçu sur PTC Creo.

#### 4.2.3 Essais en bioréacteurs

Des essais dans le bioréacteur ont été réalisés une fois que la valve fut placée dans le support et le système mis en place. Le débit a été augmenté graduellement et les essais étaient arrêtés lors de la rupture de la valve, ou après un certain temps d'application d'un débit physiologique correspondant à celui de la valve aortique. La courbe de débit physiologique employée comme modèle est représentée à la **Figure 4.13**. Elle correspond au rythme cardiaque d'un être humain adulte au repos, soit 60 bpm (battements par minute), c'est-à-dire un battement par seconde. La figure est divisée en cinq parties représentant les différentes phases du cycle cardiaque. Les sections 1 à 3 du graphique correspondent à la systole, phase pendant laquelle la valve aortique s'ouvre grâce à la contraction du ventricule et le sang oxygéné passe par l'aorte et est distribué aux différents organes. Le pic d'onde de débit est une mesure caractéristique du rythme cardiaque, il est en moyenne à 500 ml/s. Puis, le ventricule se relâche et la valve se ferme afin d'empêcher la régurgitation (reflux du sang de l'aorte dans le ventricule). Une infime partie du sang repart toutefois dans le ventricule, ce qui se manifeste par un débit négatif dans la section 4 de la courbe. Enfin, la diastole est amorcée à la section 5, la valve est alors fermée.

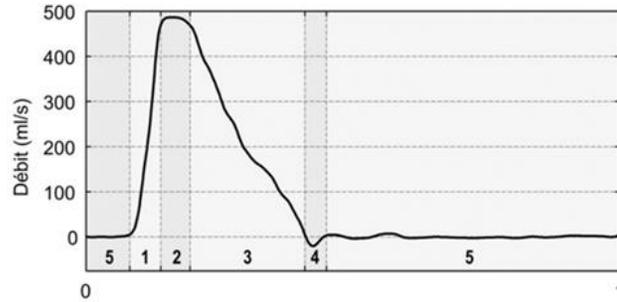


Figure 4.13 : Courbe physiologique typique de débit chez un humain adulte au repos, issue de [117].

La Figure 4.14 représente la pression à la sortie de la valve aortique, du côté de l'aorte (Pa), et la pression à l'entrée de la valve, du côté du ventricule (Pv) et le graphique est divisé en quatre parties. Les sections 1 et 2 correspondent à la systole, durant laquelle la valve est ouverte. La pression dans le ventricule augmente rapidement pendant sa contraction, puis la pression aortique (Pa) augmente une fois la valve complètement ouverte. La pression maximale atteinte est appelée pression systolique. Pour un humain adulte, elle s'élève à 120 mmHg. Les deux courbes évoluent de la même manière jusqu'à la fermeture de la valve aortique à la section 3. À ce moment, la pression ventriculaire diminue jusqu'à être nulle à la section 4, pendant la diastole. La pression aortique baisse avec le choc causé par la fermeture des feuillets de la valve aortique, et reste constante à la pression minimale atteinte du côté de l'aorte, appelée pression diastolique. La différence entre la pression aortique et la pression ventriculaire à la section 4 constitue une caractéristique importante qui témoigne de la résistance des feuillets face au refoulement du fluide.

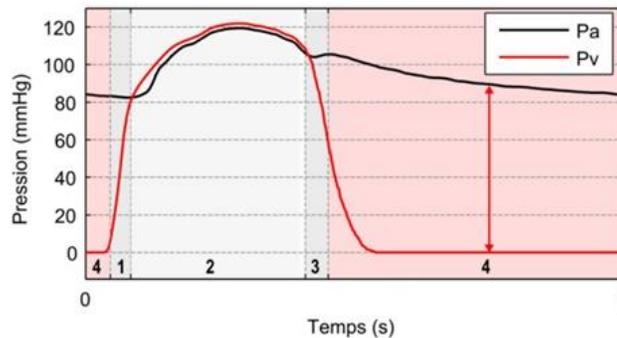


Figure 4.14 : Courbe physiologique typique de pressions chez un adulte humain au repos, issue de [117]. Pression aortique (en noir) et pression ventriculaire (en rouge).

Afin d'obtenir les courbes de débit et de pressions sur la valve dans le bioréacteur cardiaque, un programme a été implémenté sur le logiciel *Labview* afin de contrôler le débit d'air de la chambre à air et d'exporter dans un fichier texte les mesures de débit et de pression. Une valve à 4% d'alginate fut testée et a tenu une centaine de cycles à un débit de 200 ml/s. Un des feuillets s'est ensuite cassé. Nous n'avons pas de données sur les pressions pour cet essai, dû à l'absence d'un capteur de pression. Un deuxième essai fut réalisé avec une autre

valve à 3% d'alginate et cette dernière a résisté plus de 3 000 cycles (une heure) à un débit de 150 ml/s, puis pendant 90 cycles à 250 ml/s, avant de se briser au niveau du cône (Figure 4.15).

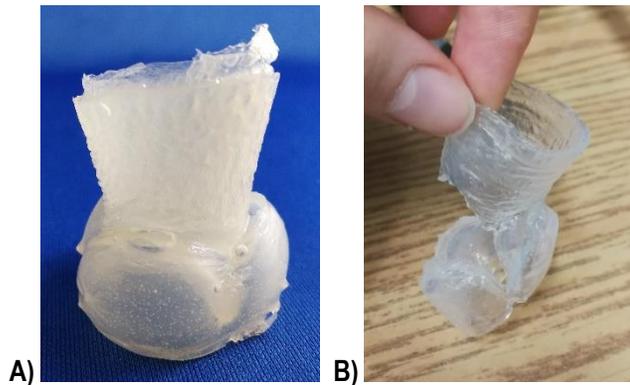


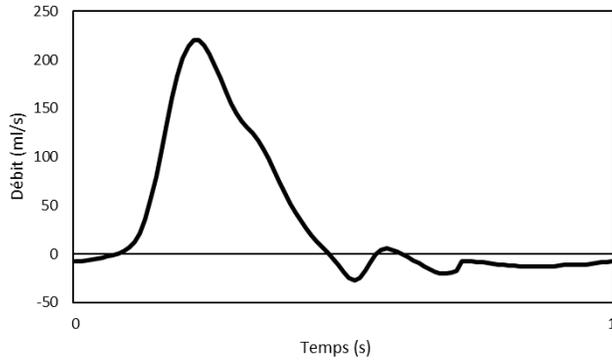
Figure 4.15 : Image de la valve à 3% d'alginate A) avant d'être placée dans le bioréacteur et B) après rupture dans le bioréacteur.

Enfin, un essai avec une valve à 3% d'alginate fut réalisé (Figure 4.16). Le débit a été augmenté graduellement de 75 ml/s à 220 ml/s par pallier approximatif de 30 ml/s. La valve a tenu plus de 3 000 cycles (une heure) pour les débits en dessous de 220 ml/s et elle s'est brisée à un débit de 220 ml/s pour lequel elle a tenu 3 000 cycles.



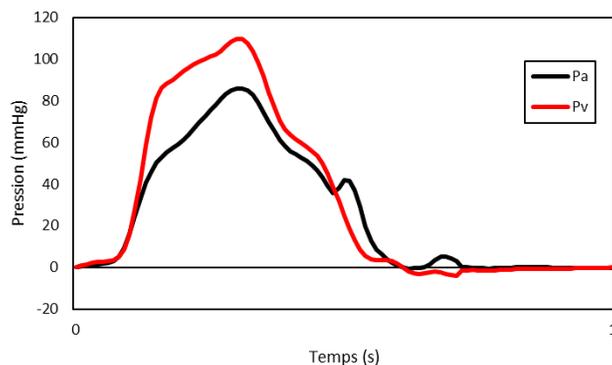
Figure 4.16 : Image d'une valve dans le support du bioréacteur A) vue de dessus et B) vue de dessous. C) Image de la valve vue de dessous dans le bioréacteur.

La courbe de débit (Figure 4.17) obtenue grâce au débitmètre représente le débit en ml/s en fonction du temps en secondes. Le graphique a été obtenu en prenant la moyenne des valeurs de débit (100 mesures par cycle) sur 15 cycles. Il a la même allure que celui du débit physiologique (Figure 4.13) pendant un cycle d'une seconde. Le débit est assez élevé, même s'il reste plus faible que dans la réalité.



**Figure 4.17 : Courbe de débit (débit moyen sur 15 cycles) obtenue avec le débitmètre pour une valve à 3% d'alginate.**

La **Figure 4.18** représente les courbes de pressions obtenues avec les capteurs de pression : en rouge, la pression dite ventriculaire (avant la valve, Pv) et en noir la pression aortique (après la valve, Pa). Comme pour la courbe de débit, une moyenne sur 15 cycles a été effectuée pour obtenir le graphique. Les pressions sont du même ordre de grandeur que les pressions physiologiques (proche de la pression aortique qui est de 120 mmHg, **Figure 4.14**). La pression aortique est censée être maintenue à une pression diastolique de 85 mmHg lorsque la valve est fermée due à la pression du reflux du fluide sur la valve. Cependant, dans notre cas, elle est nulle comme la pression ventriculaire car la valve ne se ferme pas complètement, aucune pression n'est appliquée sur les feuillets. Lors de l'ouverture de la valve, la pression aortique est inférieure à la pression ventriculaire alors qu'elle devrait être légèrement inférieure. Ceci peut être expliqué par une perte de charge dû au fait que la valve ne s'ouvre pas complètement. En résumé, le comportement de la valve est comparable à celui d'une valve sténosée.



**Figure 4.18 : Courbe de pressions (pressions moyennes sur 15 cycles) obtenues avec les capteurs de pression pour une valve à 3% d'alginate. Pression aortique (en noir) et pression ventriculaire (en rouge).**

### 4.3 Conclusion et perspectives

Les différents essais de recettes d'alginate ont permis de valider les proportions de GDL, de  $\text{CaCO}_3$  et d'alginate afin d'obtenir une bonne gélification de l'hydrogel et ainsi une valve qui se maintient bien en place. La diminution du pourcentage final d'alginate est un bénéfice pour la viabilité des cellules mais il est associé à une diminution de la résistance de la valve. Celle-ci a été testée dans un bioréacteur cardiaque conçu par l'équipe. Les résultats de pression et de débit sont encourageants car la valve résiste à des pressions équivalentes à celles de la valve aortique sur plusieurs cycles et à un débit important malgré qu'il soit inférieur au débit aortique. Si la valve est employée comme une valve pulmonaire pour laquelle les contraintes sont beaucoup moins importantes, elle subirait une pression pulmonaire de 25 mmHg et un pic de débit pulmonaire de 170 ml/s [118]. La valve à 3% d'alginate a résisté plus de 3 000 cycles à cette pression et à ce débit. L'objectif final est de mettre en culture dynamique la valve en alginate avec cellules dans le bioréacteur en augmentant progressivement le débit et ainsi entraîner la production de MEC par les cellules qui participerait à la résistance de la valve. Afin de valider l'utilisation d'une concentration de 3% d'alginate, une étude de l'impact du pourcentage d'alginate sur la viabilité cellulaire a été réalisée dans le chapitre suivant.

# Chapitre 5 Étude de l'impact de la concentration d'alginate sur des cellules souches/stromales issues du tissu adipeux

## 5.1 Introduction

Afin de produire un substitut de valve cardiaque avec des conditions optimales, il était nécessaire de faire des expériences préliminaires pour étudier l'influence de l'hydrogel d'alginate sur le comportement des cellules. Ainsi, une expérience a été effectuée pour étudier l'impact de la concentration d'alginate sur la viabilité des cellules. L'idée générale était de mettre en culture des ASC (*Adipose derived Stem/Stromal Cells*), puis de les incorporer dans des disques d'hydrogel d'alginate de 1.5 mm d'épaisseur avec trois concentrations différentes d'alginate (2%, 2.5%, 3%). La viabilité des cellules dans les disques fut évaluée par le biais d'un test de viabilité (*Live/Dead*) 24 heures et 7 jours après leur mise en culture dans l'alginate. Les milieux conditionnés correspondants ainsi que des biopsies ont été récupérés afin de corréler les données avec d'autres tests dans le futur. L'épaisseur choisie pour les disques (1.5 mm) correspond à celle des valves moulées en alginate. Comme les études préliminaires avec incorporation de cellules dans l'hydrogel avaient été réalisées avec des cubes d'alginate à 2% (**Chapitre 2.2.1**), cette concentration fut choisie comme pourcentage minimal d'alginate à évaluer et le pourcentage maximal (3%) correspond à la concentration d'alginate utilisée pour la production des valves (**Chapitre 4.1.2**). Comme une solution de  $\text{CaCl}_2$  est utilisée lors de la dissolution du moule en sucre après la gélification de la valve, l'influence du  $\text{CaCl}_2$  sur les cellules a été recherchée dans la littérature. Selon une étude de l'équipe de Chen [112], la concentration d'alginate a une influence beaucoup plus importante sur la viabilité des cellules que le traitement avec une solution de calcium. Les solutions de  $\text{CaCl}_2$  testées étaient à des concentrations de 100 mM, 500 mM et 1 M et les temps d'exposition étaient de 5 minutes, 10 minutes et 30 minutes. La condition avec la solution de calcium utilisée dans nos expériences correspond à une concentration de 100 mM pendant 30 minutes. En effet, le temps de dissolution du moule en sucre est environ de 30 minutes dans la solution aqueuse avec  $\text{CaCl}_2$  qui est à une concentration de 1%, soit 100 mM. Dans l'étude de l'équipe de Chen [112], la solution de calcium avait un impact sur la viabilité peu importe sa concentration ou le temps d'exposition. Néanmoins, pour les cellules exposées à 100 mM de  $\text{CaCl}_2$ , leur viabilité a augmenté de 80% après 24h alors que pour celles exposées à 1 M de  $\text{CaCl}_2$ , la viabilité a baissé à 50%. Le temps d'exposition avait aussi un impact négatif sur la viabilité cellulaire. Dans notre expérience avec les disques d'alginate, uniquement l'influence de la concentration d'alginate sur la viabilité des cellules a été évaluée.

Afin de choisir la concentration de cellules qui sera utilisée dans les valves et dans l'expérience des disques d'alginate, une revue de la littérature fut effectuée et est résumée dans le **Tableau 5.1**.

**Tableau 5.1 : Comparaison des concentrations des cellules utilisées dans les échafaudages dans la littérature.**

Catégorie	Type de cellules (Concentration)	Échafaudage	Conclusion de l'étude	Réf
Tissu épais perfusé	ASC ( $1.5 \times 10^6$ cellules/mL ou $5 \times 10^6$ cellules/mL)	Alginate (2%)	70-80% de viabilité après 20h de culture statique	[103]
Valve décellularisée recellularisée	ASC (50 000 cellules/feuille)	Valve mitrale porcine décellularisée	Après trois semaines en bioréacteur, les cellules sont viables (aucune donnée sur les résultats du test de viabilité)	[47]
Tissu à base de fibrine ou de collagène, valve	Cellules des artères de la carotide ( $10 \times 10^6$ cellules/mL)	Solution de fibrinogène	Essais in vivo (ovin) : après trois mois, les valves sont intactes mais insuffisance des feuillets (contraction du tissu)	[53]
Auto-assemblage, valve	Fibroblastes dermiques humains ( $15\,000$ cellules/cm <sup>2</sup> )	MEC sécrétée par les cellules	Comportement similaire à la valve native dans des conditions douces en bioréacteur	[65]
Bio-impression, valve	Cellules interstitielles valvulaires porcines ( $0.5 \times 10^6$ cellules/mL)	Polyéthylène glycol-diacrylate + sodium d'alginate	100% de cellules viables à 7 et 21 jours	[71]
Bio-impression, valve	Cellules interstitielles valvulaires humaines ( $0.5 \times 10^5$ cellules/mL)	Hydrogel Me-HA/Me-Gel, 4%Me-HA/10%Me-Gel	92% de cellules viables après 7 jours en culture statique	[72]
Bio-impression 3D, extrusion	ASC de rat ( $0.5 \times 10^5$ cellules/mL)	Alginate-CaSO <sub>4</sub> et Alginate-CaSO <sub>4</sub> -Carraghénane	Plus de 90% de viabilité avec Alg-CaSO <sub>4</sub> -Carraghénane après 24h de culture	[119]
Bio-fabrication	Cellules de Schwann ( $2 \times 10^5$ , $4 \times 10^5$ , $6 \times 10^5$ , $8.5 \times 10^5$ et $4 \times 10^6$ cellules/mL)	Alginate 2% et 4%	Pour $4 \times 10^5$ cellules/mL, après 24h, taux survie plus faible (3.5 fois moins) et prolifération plus lente pour 4% que pour 2%	[112]

Bio- impression, valve	Cellules souches mésenchymateuses venant de cellules souches pluripotentes induites de peau humaine ( $5 \times 10^6$ cellules/mL)	Méthacrylate gélatine/poly (éthylène glycol) diacrylate ; polycaprolactone	92% de viabilité au jour 1, 80% au jour 7	[120]
Bio- impression, conduit valve aortique	Cellules musculaires lisses humaines de la racine aortique + Cellules interstitielles valvulaires porcines ( $2 \times 10^6$ cellules/mL)	5% Alginate + 6% gélatine	81.4% de viabilité pour les cellules musculaires lisses ; 83.2% pour les cellules interstitielles valvulaires après 7 jours culture	[90]
Bio- impression, cœur de Saint Valentin	Myoblastes de rat et cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine ( $4 \times 10^6$ cellules/mL)	4% Alginate + 2, 4, 6 ou 8% agarose + PRP <sup>5</sup>	Viabilité supérieure à 90% après 14 jours de culture in vitro (culture statique)	[121]
Micro- extrusion	Cellules endothéliales ( $6 \times 10^6$ cellules/mL)	5% ou 6% alginate + 0; 3 ou 4% gélatine	Viabilité supérieure à 70% après 24h et 48h pour tous les pourcentages	[122]
Bio-fabrication	Fibroblastes murins ( $0.76 \times 10^6$ cellules/mL et $0.76 \times 10^5$ cellules/mL)	0.5 ; 1 ; 2 ou 5% alginate	→ Pour $0.76 \times 10^6$ cellules/mL, avec 5% alginate : 50% de viabilité et avec 2% alginate : 70% de viabilité. → Pour $0.76 \times 10^5$ cellules/mL, avec 5% alginate : 30% de viabilité, et avec 2% alginate : 65% de viabilité	[104]

Les équipes de recherche utilisent souvent une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/mL avec l'alginate [104]. Dans une valve saine, la densité de noyaux de cardiomyocytes est de  $28\,000 \pm 7\,200 / \text{mm}^3 = 28 \times 10^6$  cellules/mL [123]. Avec les résultats de viabilité (*Live/Dead*) effectués précédemment sur les cubes d'alginate (**Chapitre 2.2.1**), la viabilité cellulaire était plus basse pour le groupe à  $1.5 \times 10^6$  cellules/mL comparé au groupe à  $5 \times 10^6$  cellules/mL mais elle augmentait au bout de huit semaines de culture en bioréacteur contrairement à celle du groupe à  $5 \times 10^6$  cellules/mL (**Figure 2.5, Chapitre 2.2.1**). De plus, la densité augmentait au cours des huit semaines pour le groupe à  $1.5 \times 10^6$  cellules/mL alors que pour le groupe à  $5 \times 10^6$  cellules/mL elle diminuait

<sup>5</sup> PRP : Plasma Riche en Plaquettes (*concentré de plasma sanguin qui contient une concentration élevée de plaquettes*)

légèrement à huit semaines de culture. Le faible nombre d'échantillons rend difficile la conclusion sur la meilleure concentration à choisir, mais à première vue ce serait le groupe de  $1.5 \times 10^6$  cellules/mL à privilégier.

En regardant le tableau de comparaison, la densité cellulaire semble tourner autour de  $10^5$  et  $10^6$  cellules/mL dans la littérature. Pour les échafaudages en alginate, la densité est en moyenne de  $1.5 \times 10^6$  cellules/mL pour des cellules mésenchymateuses (fibroblastes, ASC, myoblastes, etc.). Ainsi, une densité cellulaire de  $1 \times 10^6$  cellules/mL a été choisie pour la fabrication de disques en alginate avec des ASC.

L'objectif de l'expérience peut être résumé en trois points principaux :

1. Évaluer l'influence de la concentration d'alginate sur la survie des cellules dans le but de fabriquer une valve en alginate avec des cellules et une haute viabilité cellulaire.
2. Étudier si le procédé de fabrication de l'alginate influe sur la diminution de la viabilité cellulaire (exemples : pipetage, concentration de GDL et de  $\text{CaCO}_3$ , délais d'attente (préparer la solution d'alginate avec les cellules, temps de gélification)).
3. Comparer la consistance de chaque disque pour évaluer l'influence de la concentration de l'alginate sur les caractéristiques mécaniques des disques avec un tableau qualitatif.

## 5.2 Matériel et méthode

### 5.2.1 Culture cellulaire

Les disques d'alginate ont été fabriqués avec l'incorporation de cellules souches/stromales issues du tissu adipeux. Elles ont été extraites du tissu adipeux humain par lipoaspiration selon des protocoles spécifiques [124]. Le donneur était une femme de 35 ans avec un indice de masse corporelle (IMC) normal de  $21 \text{ kg/m}^2$ . Les ASC ont été décongelées et amplifiées à un passage 4 avec comme milieu de culture du DMEM:F12 (*Dulbecco's Modified Eagle Medium:Ham's F12 Medium*) à un ratio de 1 :1 (*Gibco/Life Technologies*, Burlington, ON, Canada) contenant 10% de sérum (*FB essence, VWR Life Science Seradigm*, Ville Mont-Royal, QC, Canada) et des antibiotiques [100 U/ml de pénicilline (*Sigma*, Oakville, ON, Canada) et 25 mg/ml de gentamicine (*Schering-Plough Canada Inc./Merck*, Scarborough, ON, Canada)]. Les cellules ont été cultivées dans des flacons *Nunc™* (*ThermoFisher Scientific*, Massachusetts, USA) à une densité de  $6.67 \times 10^3$  cellules par  $\text{cm}^2$  pour l'expansion. Le milieu a été changé trois fois par semaine. Les cellules ont été trypsinées deux fois afin d'obtenir le nombre voulu de cellules, elles ont été incorporées aux disques au passage 7.

### 5.2.2 Fabrication des disques en alginate

Les solutions pour fabriquer l'hydrogel d'alginate ont été préparées, puis autoclavées à l'avance. Trois solutions à trois concentrations différentes d'alginate ont été réalisées. Du sodium d'alginate (ALG, M/G ratio=1.56, *Sigma-Aldrich*, Missouri, USA) à des concentrations de 4.66%, 6.20% et 7.44% a été dissous dans une solution tampon composée d'eau apyrogène, de HEPES (*MP Biomedicals*, LLC, Ohio, USA), de NaCl (*ThermoFisher Scientific*, Massachusetts, USA), et de NaOH (2 N) pour avoir un pH de 7.4 à l'aide d'une plaque agitatrice à 400 rpm pendant 24 heures. Pour la fabrication de trois disques à une concentration donnée, en conditions stériles, 968 µL d'alginate fut ajouté et mélangé à 1.2 mL de milieu dans lequel les cellules ont été incorporées à une concentration de  $1 \times 10^6$  cellules/mL. Ensuite, 116 µL de carbonate de calcium ( $\text{CaCO}_3$ , 15-58, 40 nm, 98%, *SkySpring Nanomaterials Inc.*, Texas, USA) dilué à 10% avec la solution tampon fut ajouté au mélange. Enfin, 116 µL de D-glucono-1,5-lactone (GDL, *Sigma-Aldrich*, Missouri, USA) dilué à 17% dans la solution tampon fut ajouté. La solution fut alors versée dans des puits d'une plaque Nunc™ 12 puits (*ThermoFisher Scientific*, Massachusetts, USA). Après dix minutes de gélification, 2 mL de milieu à 1% de  $\text{CaCl}_2$  fut ajouté sur les disques pendant 30 minutes afin d'accélérer la gélification externe du disque, les plaques 12 puits ont été mises dans un incubateur à 37°C, 8%  $\text{CO}_2$  pendant ce temps. Enfin, les disques ont été transférés à l'aide d'une spatule dans des plaques Nunc™ 6 puits (*ThermoFisher Scientific*, Massachusetts, USA) et immergés dans 8 mL de milieu avec acide ascorbique (**Figure 5.1**). Deux disques pour chaque temps de culture (24h et 7 jours) ont été fabriqués avec des cellules induites mortes pour les contrôles de mortalité. La mort des cellules a été induite en les laissant dans une solution de formol (3.7%, Chaptec) pendant 30 minutes avant de les incorporer dans les disques. Un disque pour chaque concentration d'alginate (2%, 2.5%, 3%) et chaque temps de culture (24h et 7 jours) a été fabriqué sans cellules pour les contrôles négatifs selon la même procédure que les disques avec cellules. La culture était statique et le milieu fut changé tous les deux/trois jours dans les plaques remplies de milieu avec acide ascorbique frais pour chaque changement.



**Figure 5.1 : Transfert d'un disque d'alginate dans une plaque 6 puits remplie de milieu.**

### 5.2.3 Biopsie pour analyses

A la fin du temps de culture (24h ou 7 jours), à l'aide d'un poinçon de 6 mm (Acuderm, Fort Lauderdale, USA), un échantillon de chaque disque fut congelé à sec dans de l'azote liquide et mis en banque à -80°C pour de futures analyses. Ensuite, les disques avec les trous du poinçon furent transférés dans des plaques 12 puits pour faire des analyses de viabilité observées à l'aide du microscope confocal. Un test de viabilité *Live/Dead* fut réalisé en mettant dans chaque puits 2 mL de solution phosphate saline (PBS, *Sigma-Aldrich*, Missouri, USA) mélangée avec 1 µL de calcéine AM et 4 µL d'*ethidium homodimer-1* (*Invitrogen*<sup>TM</sup>, L3224, *ThermoFisher Scientific*, Massachusetts, USA). Les disques furent ensuite observés au microscope confocal équipé du logiciel Zeiss 2011 avec un objectif apochromatique 10x/0.45. Pour chaque colorant, environ 40 couches de 10 µm ont été scannées et empilées, et les cellules ont été comptées grâce au logiciel ImageJ. Pour chaque disque, deux photographies ont été prises (une au milieu du disque et une en périphérie), peu de différences ont été observées entre les deux comptes. La moyenne des deux comptes fut utilisée dans le logiciel *GraphPad Prism* pour réaliser les graphiques (**Figure 5.3**). Pour le pourcentage de viabilité, le nombre de cellules vivantes fut divisé par le nombre de cellules total. Pour la densité de cellules totale, le nombre de cellules total fut divisé par le volume observé (surface de l'image x hauteur du « *stack* ») qui donnait la concentration cellulaire, elle fut ensuite divisée par la concentration cellulaire initiale (1x10<sup>6</sup> cellules/mL). Pour la densité de cellules vivantes, la densité cellulaire totale fut multipliée par le pourcentage de cellules vivantes.

## 5.3 Résultats et discussion

### 5.3.1 Conditions de culture et disques d'alginate

La majorité des disques d'alginate ne présentaient pas de défauts, ils se détachaient bien des puits de la plaque 12 puits avant d'être transférés dans une plaque 6 puits (**Figure 5.1**). Les disques avaient une épaisseur plus fine au centre car l'alginate avait tendance à se coller aux parois des puits. La consistance des disques est résumée dans le **Tableau 5.2**.

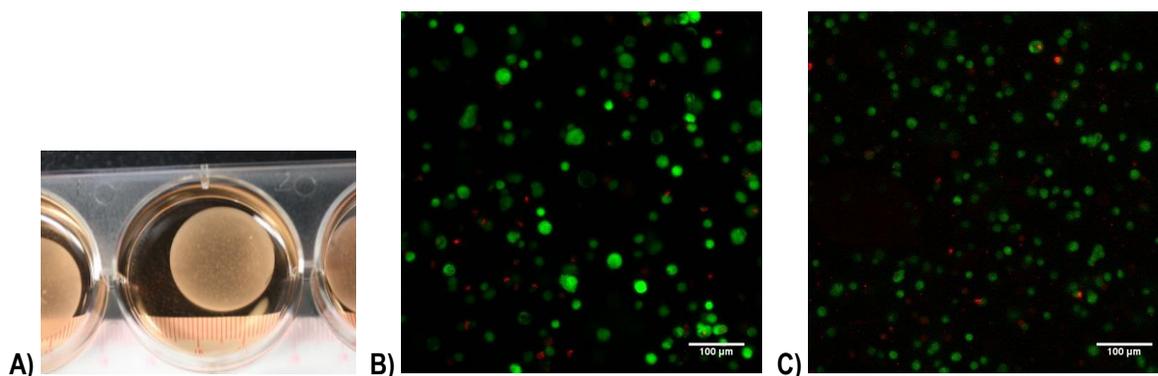
**Tableau 5.2 : Tableau de la consistance des disques d'alginate selon le temps de culture et le pourcentage en alginate (1 : liquide, 2 : fluide visqueux, 3 : gel ; 4 : solide élastique ; 5 : rigide).**

	24h 2%	24h 2.5%	24h 3%	7 jours 2%	7 jours 2.5%	7 jours 3%
N°1	4	4	4	3	3.2	3.5
N°2	4	4	4	3	3.2	3.5
N°3	4	4	4	3	3.2	3.5
Sans cellule	4	4	4	3.8	3.8	3.8

La consistance des disques d'alginate était similaire après 24h de culture que ce soit pour les disques sans ou avec cellules. Peu de différences étaient visibles entre les différentes concentrations d'alginate. Les disques n'étaient pas rigides mais ils pouvaient être manipulés assez facilement avec une spatule. Après 7 jours de culture, les disques avec cellules étaient plus visqueux et les disques à 2% d'alginate étaient un peu plus visqueux que les disques à 3% d'alginate. Les disques avec cellules mortes et sans cellules après 7 jours de culture étaient plus rigides que ceux avec cellules après 7 jours de culture, mais un peu moins que les disques après 24h de culture. Ces observations permettent de montrer que les cellules peuvent avoir une influence sur les caractéristiques mécaniques de l'alginate, le rendant moins solide, d'où l'importance d'avoir une bonne rigidité initiale de l'alginate. En effet, au bout d'un certain temps de culture dynamique ou quasi statique, les cellules devraient produire de la matrice extracellulaire et des enzymes de remodelage et ainsi, en fonction des molécules sécrétées, l'alginate aura probablement des propriétés mécaniques différentes que celles observées initialement.

### 5.3.2 Test de viabilité (*Live/Dead*)

Chaque disque d'alginate a été soumis à un test de viabilité comme décrit dans la section précédente. Trois disques pour chaque concentration d'alginate (2%, 2.5%, 3%) et pour chaque temps (24h et 7 jours) ont été analysés. Les cellules sont réparties de manière assez homogène (**Figure 5.2**). Les cellules des disques de cellules mortes ont présenté 100% de mortalité et aucune tâche, ni de bruit de fond n'était présent dans le vert (laser pour voir les cellules vivantes). Aucun bruit de fond n'était présent pour les disques d'alginate sans cellules (non montré).



**Figure 5.2 :** A) Photographie d'un disque d'alginate à 3% après 24h de culture. Images prise au microscope confocal pour un disque à 3% d'alginate B) après 24h de culture et C) après 7 jours de culture.

Le graphique de la **Figure 5.3 A**) représente la viabilité des cellules dans les disques pour les trois pourcentages différents d'alginate après 24h et 7 jours de culture statique dans des puits. La viabilité était de plus de 60% pour tous les pourcentages d'alginate après 24h de culture, qui est assez élevé bien que ce ne soit pas proche de 100%. Une hypothèse qui pourrait expliquer cette viabilité est le fait que lors de la réticulation des disques d'alginate dans du milieu avec  $\text{CaCl}_2$  pendant 30 minutes, le milieu était devenu acide très rapidement,

probablement à cause du GDL. Il faudrait mettre une quantité de milieu avec  $\text{CaCl}_2$  plus élevée pour éviter ceci. La concentration d'alginate, lorsque comprise entre 2% et 3%, n'a pas d'influence sur la viabilité cellulaire (selon le test statistique Anova à deux facteurs,  $p^6 = 0.0706$ ). Ceci permet de valider l'utilisation d'une concentration d'alginate à 3% pour la fabrication des valves, il n'est pas nécessaire de la diminuer à 2%. En réalisant un test statistique Anova à deux facteurs, il a été remarqué que le temps de culture avait un impact sur les résultats de viabilité ( $p = 0.0365$ ), ce qui est encourageant pour la suite, d'autant plus que les disques étaient en culture statique et non quasi statique comme le seront les valves. Le graphique **Figure 5.3 B**) représente la densité cellulaire sous forme de pourcentage de la concentration initiale ( $1 \times 10^6$  cellules/mL) dans les disques pour les trois pourcentages d'alginate après 24h et 7 jours de culture statique. Au niveau de la densité cellulaire, une perte significative des cellules fut observée lors de la fabrication des disques (ex : 65% des cellules dans les disques à 3%). Néanmoins, pour toutes les concentrations d'alginate, les valeurs de densité suggèrent une légère augmentation du nombre de cellules (1.56 fois pour 2%, 1.59 fois pour 2.5%, et 1.43 fois pour 3%) observée entre 24h et 7 jours. Ceci montre que les cellules étaient métaboliquement actives et ainsi que l'alginate est un support adéquat pour les cellules. Le nombre de cellules pourrait être évalué de manière plus précise avec des tests quantitatifs indirects comme le PicoGreen™, un colorant fluorescent qui permet de mesurer l'ADN dans un échantillon grâce à l'étude de son absorbance. Le graphique de la **Figure 5.3 C**) représente la densité de cellules vivantes sous forme de pourcentage de la concentration initiale de cellules. Elle a augmenté aussi entre 24h et 7 jours, ce phénomène de diminution de la viabilité dans l'alginate après 24h, suivi d'une augmentation a aussi été observé dans des expériences similaires [104].

---

<sup>6</sup> Valeur p : Mesure de la probabilité qu'une différence observée ait pu se produire uniquement par hasard. Plus la valeur p est basse, plus la signification statistique de la différence observée est importante. *Encyclopedia of Statistics in Quality and Reliability* (eds F. Ruggeri, R.S. Kenett and F.W. Faltin). 2008.

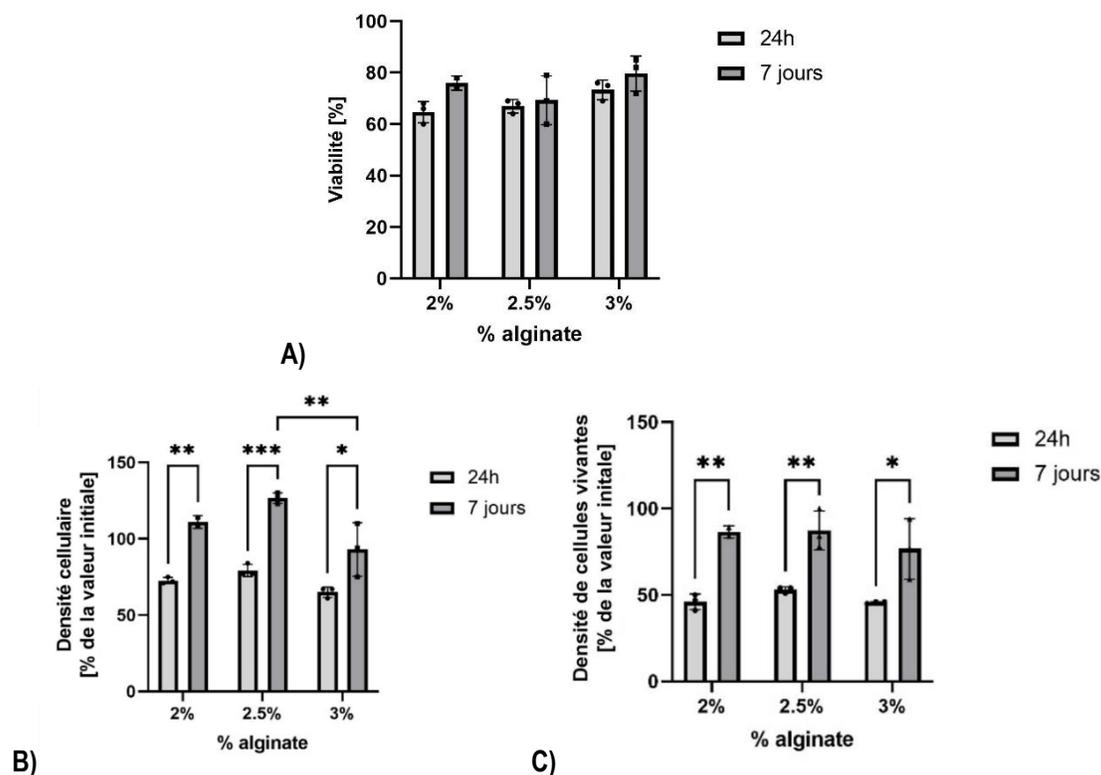


Figure 5.3 : A) Viabilité (pourcentage de cellules vivantes), B) Densité cellulaire (% de la valeur initiale) et C) Densité de cellules totale (% de la valeur initiale) en fonction du pourcentage d'alginate après 24h et 7 jours de culture (test Anova à deux facteurs, \* représente  $p < 0.05$ , \*\* représente  $p < 0.01$  et \*\*\* représente  $p < 0.001$ ).

## 5.4 Conclusion

Cette expérience a permis de valider l'utilisation d'une concentration de 3% d'alginate pour la fabrication d'une valve aortique car les résultats de viabilité ont montré que la concentration (comprise entre 2% et 3%) n'avait pas d'influence sur la viabilité des ASC dans les conditions de culture étudiées ici. Cette dernière n'était pas aussi élevée que désiré mais les conditions dans lesquelles étaient les disques n'étaient pas optimales. Par exemple, du milieu conditionné pourrait être utilisé à la place du milieu normal lors de la fabrication des disques d'alginate. De plus, dans les expériences futures avec les valves, ces dernières seront en culture quasi statique ou dynamique et non statique comme l'étaient les disques. L'augmentation de la densité de cellules vivantes avec le temps sont des points positifs pour la suite du projet car ceci montre que les cellules sont métaboliquement actives. Ce type d'expérience permet d'évaluer différentes conditions (type de cellule, concentration de cellules, influence de  $\text{CaCl}_2$ , etc.) et d'effectuer différentes analyses (ex : *Live/Dead*, *PicoGreen™*) de manière rapide avant de produire des valves cardiaques qui nécessitent beaucoup plus de préparations.

# Conclusion

Le nombre annuel de personnes nécessitant un remplacement de valve cardiaque devrait tripler de 290 000 en 2003 à plus de 850 000 en 2050. Les méthodes de remplacements existantes permettent d'augmenter l'espérance de vie des patients mais cette dernière demeure toujours limitée. De tout temps, les hommes tentent de se rapprocher de la nature en reproduisant les phénomènes qui existent autour d'eux. Le génie tissulaire en est un exemple avec la reproduction de tissus biologiques. Lorsque combiné à des technologies de pointe, telle que l'impression 3D, il est possible de réaliser des produits innovants. Les fonctions dans la valve cardiaque se font grâce aux cellules qui anticipent les mouvements de cette dernière, grâce à la relation entre la matrice extracellulaire et les cellules. Ces phénomènes ne peuvent pas être reproduits avec des systèmes mécaniques, l'emploi de matière vivante est indispensable pour avoir une valve cardiaque performante. L'implantation dans un être humain d'une telle valve est encore lointaine et nécessite des essais rigoureux in vitro et in vivo mais des avancées se font chaque jour afin de se rapprocher de cet objectif.

## Retour sur les objectifs initiaux

Les objectifs initiaux du projet de maîtrise étaient les suivants :

- 1) Fabriquer une valve aortique avec une résistance mécanique suffisamment importante avec la méthode élaborée par l'équipe de recherche, soit par moulage de l'alginate dans un moule en sucre vitrifié fabriqué par impression 3D.
- 2) Dans la perspective de fabriquer une valve cardiaque avec des cellules, étudier l'impact de la concentration d'alginate sur la viabilité cellulaire.

Afin de répondre aux objectifs, le **Chapitre 1** est une revue de littérature qui fut effectuée afin de comprendre le fonctionnement de la valve aortique et son rôle primordial dans le système cardiovasculaire. La valve permet le transfert unidirectionnel du sang oxygéné vers les différents organes du corps humain, d'où la nécessité qu'elle soit résistante. Cependant, il existe un certain nombre de maladies touchant la valve qui nécessitent son remplacement. Les dispositifs existants sont mécaniques (ex : *Starr Edwards silastic ball valve*) ou des bioprothèses (ex : *Perseval S*), mais elles sont associées à de nombreuses contraintes comme la calcification, la prise à vie d'anticoagulants, etc. Plusieurs recherches avec des essais in vitro et in vivo ont été réalisés dans le domaine du génie tissulaire pour contrer tous ces problèmes (ex : bio-impression 3D). Notre équipe de recherche a aussi trouvé un procédé innovant pour fabriquer un substitut de valve cardiaque, grâce à un moulage de l'alginate dans un moule en sucre vitrifié fabriqué par impression 3D.

Le **Chapitre 2** a permis de comprendre les bases de la culture cellulaire, de comprendre comment créer un environnement idéal pour les cellules. Des essais préliminaires avec des tissus épais d'alginate ont été réalisés pour corroborer les résultats précédents obtenus par l'équipe lors de la mise en culture quasi statique de cubes d'alginate avec incorporation de ASC. Des immunofluorescences ont été réalisées sur ces cubes, la présence de collagène n'était pas évidente mais le protocole pour faire des analyses d'immunofluorescence a été bien établi et pourra être utilisé pour de prochaines études sur les échantillons d'alginate.

Afin de répondre au premier objectif, le **Chapitre 3** a présenté le travail sur la conception de plusieurs moules de valve cardiaques (lissage de certaines parties du moule, ajout d'un entonnoir, etc.) et des différentes impressions effectuées afin d'obtenir un moule sans défaut. Plusieurs paramètres d'impression furent étudiés (taux d'extrusion, recette de sucre, température d'impression) pour optimiser la fabrication du moule en sucre vitrifié. La présence de trous dans les valves moulées était assez régulière mais le pourcentage de valves présentant des défauts a diminué avec les améliorations réalisées. La deuxième étape de fabrication du substitut de valve cardiaque est le moulage à l'alginate (**Chapitre 4**). Différents essais avec des concentrations de  $\text{CaCO}_3$  et de GDL ont permis de jouer sur la gélification de l'alginate. Une diminution de la concentration d'alginate était recherchée pour maximiser la viabilité des cellules mais il fallait conserver une bonne résistance de la valve. La concentration fut baissée de 4% à 3%, et une valve à 3% d'alginate a été testée en bioréacteur pour étudier sa résistance. Les essais en bioréacteur, qui reproduit les conditions physiologiques du cœur, ont permis de voir que la valve tenait pour des pressions équivalentes à celles de la pression aortique (120 mmHg) et à un fort débit. Cette expérience a permis de valider l'utilisation d'un alginate à 3% pour mouler les valves.

Afin de répondre au deuxième objectif, le **Chapitre 5** a présenté une expérience avec des disques d'alginate avec incorporation d'ASC, les mêmes cellules utilisées dans les expériences précédentes et celles envisagées pour fabriquer les valves cardiaques avec tissus biologiques. L'étude a été effectuée avec trois concentrations d'alginate (2%, 2.5%, 3%) pour une culture statique durant 24h et 7 jours. Les tests de viabilité ont montré que la concentration d'alginate n'avait pas d'influence sur la viabilité et qu'elle augmentait après 7 jours. De plus, les cellules ont proliféré entre 24h et 7 jours, ceci est prometteur pour les prochaines expériences et permet de valider l'utilisation d'un alginate à 3% pour les valves cardiaques.

Malgré le fait de ne pas avoir réussi à produire une valve cardiaque avec des cellules, les deux objectifs principaux du mémoire ont été atteints et ont permis de préparer les protocoles pour la fabrication d'une valve aortique avec des tissus biologiques.

## Perspectives

De nombreuses perspectives sont envisagées avec ce projet avec des objectifs à court, moyen et long terme. Dans les objectifs à court terme, un travail sur le moule est encore à faire. Dans un premier temps, les feuillets sont assez écartés les uns des autres et ceci était visible lors des essais en bioréacteurs pendant lesquels la valve ne se fermait pas complètement, elle n'était pas étanche (**Chapitre 4.2**). Yannick Rioux, étudiant qui poursuit le projet, a travaillé sur la géométrie du moule afin de rapprocher les feuillets, quitte à les coller ensemble, puis à les séparer à l'aide d'un scalpel. Il a paramétré certaines dimensions du moule afin de pouvoir modifier les caractéristiques assez facilement, comme le diamètre aortique, par exemple. Ceci permettra par la suite d'imprimer un moule pour une valve aux dimensions spécifiques d'un patient. Les dimensions pourront être mesurées grâce à des images de la valve obtenues par IRM (Imagerie par Résonance Magnétique) ou par tomographie axiale calculée par ordinateur (TACO) (en anglais, *CT scan*). Quant à la présence de trous dans la valve, c'est un travail encore en cours. Étant donné l'étude approfondie sur la modélisation de la valve, le travail est plus porté sur la manière de déposer l'alginate dans le moule. Il a été proposé d'injecter l'alginate par le bas du moule grâce à un injecteur et une seringue. Les valves moulées présentent moins de trous, même s'ils ne sont pas complètement absents (**Figure 5.4**).

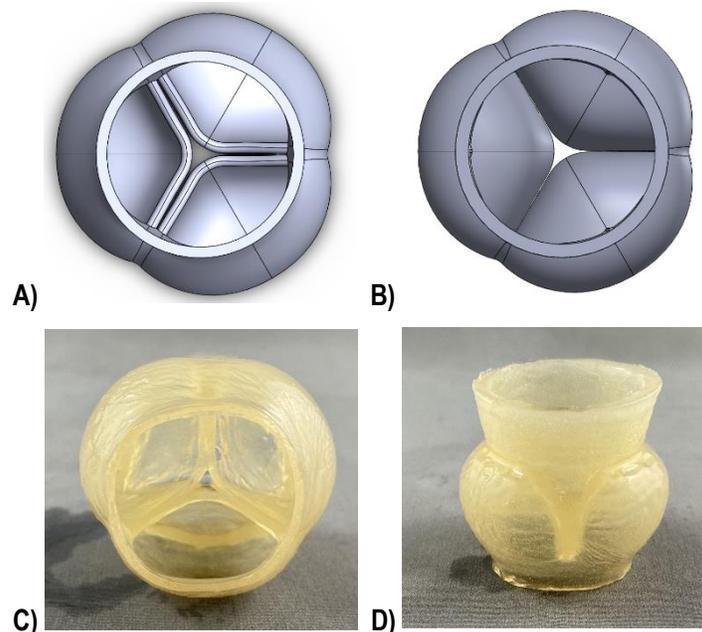


Figure 5.4 : Images de la valve conçue par Yannick Rioux A) vue de dessous et B) vue de dessus. Images de la valve résultante en alginate A) vue de dessous et B) vue de côté.

L'objectif à moyen terme est de mouler une valve cardiaque en conditions stériles avec un alginate à 3% à une concentration d'un million de cellules/mL. La valve sera mise en culture dans un bioréacteur quasi statique avec un débit constant. Puis, elle sera transférée dans le bioréacteur cardiaque conçu par l'équipe qui sera contrôlé en débit mais aussi en pression. Dans le cadre du projet financé par *New Frontiers*, il est envisagé d'incorporer des cellules modifiées génétiquement grâce à l'outil CRISPR/Cas9 afin de limiter la calcification et la minéralisation des cellules dans les substituts de valves cardiaques fabriqués.

Enfin, l'objectif au long terme est de fabriquer une valve cardiaque avec un échafaudage en alginate qui, grâce aux conditions dans lesquelles sera la valve, se dégradera au cours du temps en laissant place à la MEC sécrétée par les cellules. Finalement, une valve avec des tissus biologiques autologues sera implantée chez le patient. Ce projet multidisciplinaire est ambitieux mais de nombreuses perspectives lui sont associées.

# Bibliographie

1. Yacoub N. and Takkenberg J., *Will heart valve tissue engineering change the world?* Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine, 2005. **2**(2): p. 60-61.
2. Aljohani W., Ullah M. W., Zhang X., and Yang G., *Bioprinting and its applications in tissue engineering and regenerative medicine*. Int J Biol Macromol, 2018. **107**(Pt A): p. 261-275.
3. Murphy M. B., Moncivais K., and Caplan A. I., *Mesenchymal stem cells: environmentally responsive therapeutics for regenerative medicine*. Exp Mol Med, 2013. **45**(11): p. e54.
4. *Maladies Cardiovasculaires*. 2020; Available from: <https://www.icm-mhi.org/fr/soins-et-services/maladies-cardiovasculaires/maladies-valvulaires-cardiaques>.
5. Motta S. E., Lintas V., Fioretta E. S., Dijkman P. E., Putti M., Caliskan E., Biefer H. R. C., Lipiski M., Sauer M., Cesarovic N., Hoerstrup S. P., and Emmert M. Y., *Human cell-derived tissue-engineered heart valve with integrated Valsalva sinuses: towards native-like transcatheter pulmonary valve replacements*. Npj Regenerative Medicine, 2019. **4**: p. 10.
6. Cheung D. Y., Duan B., and Butcher J. T., *Current progress in tissue engineering of heart valves: multiscale problems, multiscale solutions*. Expert Opinion on Biological Therapy, 2015. **15**(8): p. 1155-1172.
7. Mesina M., Mindrila I., Mesina C., Obleaga C. V., and Istratoaie O., *A perfusion decellularization heart model - an interesting tool for cell-matrix interaction studies*. Journal of Mind and Medical Sciences, 2019. **6**(1): p. 137-142.
8. Miller J. S., Stevens K. R., Yang M. T., Baker B. M., Nguyen D. H. T., Cohen D. M., Toro E., Chen A. A., Galie P. A., Yu X., Chaturvedi R., Bhatia S. N., and Chen C. S., *Rapid casting of patterned vascular networks for perfusable engineered three-dimensional tissues*. Nature Materials, 2012. **11**(9): p. 768-774.
9. Collin S. B.-D., A.; Fradette, J.; Hayward, C. J.; Ruel, J. *Design of a Custom Bioreactor for the Dynamic Culture of Pre-Vascularized Cell-Laden Alginate Scaffolds Obtained by 3D Printing*. in CSME-CFDCS Congress 2019. 2019. London, ON, Canada.
10. in *Concise Medical Dictionary (8 ed.)*. 2010, Oxford University Press.
11. Mohrman D. E. and Heller L. J., *Overview of the Cardiovascular System*, in *Cardiovascular Physiology*, 9e. 2018, McGraw-Hill Education: New York.
12. Garg S. *Aortic Valve Anatomy*. 2016; Available from: <https://emedicine.medscape.com/article/1922899-overview#a1>.
13. *Le fonctionnement du coeur* 2020; Available from: <https://www.fedecardio.org/Je-m-informe/Le-coeur/le-fonctionnement-du-coeur>.
14. Ba M., *Reconstruction valvulaire aortique: Mise au point d'une prothèse en péricarde autologue prétraitée par un hydrogel de polysaccharide*, in *Ingénierie biomédicale*. 2014, Université Paris-Nord: Paris.
15. Rozeik M. M., Wheatley D. J., and Gourlay T., *The aortic valve: structure, complications and implications for transcatheter aortic valve replacement*. Perfusion-Uk, 2014. **29**(4): p. 285-300.
16. Misfeld M. and Sievers H. H., *Heart valve macro- and microstructure*. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 2007. **362**(1484): p. 1421-1436.
17. Charitos E. I. and Sievers H. H., *Anatomy of the aortic root: implications for valve-sparing surgery*. Annals of Cardiothoracic Surgery, 2013. **2**(1): p. 53-56.
18. David T. E., *Surgical treatment of aortic valve disease*. Nature Reviews Cardiology, 2013. **10**(7): p. 375-386.
19. Butcher J. T., Mahler G. J., and Hockaday L. A., *Aortic valve disease and treatment: The need for naturally engineered solutions*. Advanced Drug Delivery Reviews, 2011. **63**(4-5): p. 242-268.
20. MacGrogan D., Luxan G., Driessen-Mol A., Bouten C., Baaijens F., and de la Pompa J. L., *How to Make a Heart Valve: From Embryonic Development to Bioengineering of Living Valve Substitutes*. Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine, 2014. **4**(11).

21. Sacks M. S. and Yoganathan A. P., *Heart valve function: a biomechanical perspective*. Philosophical Transactions of the Royal Society B-Biological Sciences, 2007. **362**(1484): p. 1369-1391.
22. Ioan Tilea H. S., Brindusa Tilea, Cristina Maria Tatar, Michaela Ispas, Razvan Constantin Serban, *Anatomy and function of Normal Valvular Complex*, in *Calcific Aortic Valve Disease*, E. Aikawa, Editor. 2013.
23. Eriksen H. A., Satta J., Risteli J., Veijola M., Väre P., and Soini Y., *Type I and type III collagen synthesis and composition in the valve matrix in aortic valve stenosis*. Atherosclerosis, 2006. **189**(1): p. 91-98.
24. Latif N., Sarathchandra P., Taylor P. M., Antoniw J., and Yacoub M. H., *Localization and pattern of expression of extracellular matrix components in human heart valves*. Journal of Heart Valve Disease, 2005. **14**(2): p. 218-227.
25. Wang H., Leinwand L. A., and Anseth K. S., *Cardiac valve cells and their microenvironment-insights from in vitro studies*. Nature Reviews Cardiology, 2014. **11**(12): p. 715-727.
26. Vesely I. and Noseworthy R., *Micromechanics of the fibrosa and the ventricularis in aortic-valve leaflets*. Journal of Biomechanics, 1992. **25**(1): p. 101-113.
27. Sacks M. S., Merryman W. D., and Schmidt D. E., *On the biomechanics of heart valve function*. Journal of Biomechanics, 2009. **42**(12): p. 1804-1824.
28. Simmons C. A., Grant G. R., Manduchi E., and Davies P. F., *Spatial heterogeneity of endothelial phenotypes correlates with side-specific vulnerability to calcification in normal porcine aortic valves*. Circulation Research, 2005. **96**(7): p. 792-799.
29. Della Rocca F., Sartore S., Guidolin D., Bertiplaglia B., Gerosa G., Casarotto D., and Pauletto P., *Cell composition of the human pulmonary valve: A comparative study with the aortic valve - The VESALIO\* project*. Annals of Thoracic Surgery, 2000. **70**(5): p. 1594-1600.
30. Taylor P. A., Batten P., Brand N. J., Thomas P. S., and Yacoub M. H., *The cardiac valve interstitial cell*. International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2003. **35**(2): p. 113-118.
31. *Prolasus mitral*. 2020; Available from: <http://icardio.ca/fr/articles/maladies-valvulaires/prolasus-mitral>.
32. Rabkin-Aikawa E., Farber M., Aikawa M., and Schoen F. J., *Dynamic and reversible changes of interstitial cell phenotype during remodeling of cardiac valves*. Journal of Heart Valve Disease, 2004. **13**(5): p. 841-847.
33. Marron K., Yacoub M. H., Polak J. M., Sheppard M. N., Fagan D., Whitehead B. F., de Leval M. R., Anderson R. H., and Wharton J., *Innervation of human atrioventricular and arterial valves*. Circulation, 1996. **94**(3): p. 368-375.
34. *Bicuspidie aortique familiale*. 2021; Available from: <https://www.maladies-vasculaires-rares.fr/bicuspidie-aortique-familiale>.
35. Rutkovskiy A., Malashicheva A., Sullivan G., Bogdanova M., Kostareva A., Stenslokken K. O., Fiane A., and Vaage J., *Valve Interstitial Cells: The Key to Understanding the Pathophysiology of Heart Valve Calcification*. Journal of the American Heart Association, 2017. **6**(9): p. 23.
36. Sadaba J. R., Martinez-Martinez E., Arrieta V., Alvarez V., Fernandez-Celis A., Ibarrola J., Melero A., Rossignol P., Cachofeiro V., and Lopez-Andres N., *Role for Galectin-3 in Calcific Aortic Valve Stenosis*. Journal of the American Heart Association, 2016. **5**(11): p. 12.
37. Fioretta E. S., Motta S. E., Lintas V., Loerakker S., Parker K. K., Baaijens F. P. T., Falk V., Hoerstrup S. P., and Emmert M. Y., *Next-generation tissue-engineered heart valves with repair, remodelling and regeneration capacity*. Nature Reviews Cardiology, 2021. **18**(2): p. 92-116.
38. Mujtaba S. S., Ledingham S., Shah A. R., Clark S., Pillay T., and Schueler S., *Early Clinical Results of Perceval Sutureless Aortic Valve in 139 Patients: Freeman Experience*. Brazilian Journal of Cardiovascular Surgery, 2018. **33**(1): p. 8-14.
39. Sons J. W., *Aortic valve replacement and transvalvular aortic valve replacement*, in *Endovascular and Hybrid Therapies for Structural Heart and Aortic Disease*. 2013. p. 194-203.
40. Smedira N. G., Blackstone E. H., Roselli E. E., Laffey C. C., and Cosgrove D. M., *Are allografts the biologic valve of choice for aortic valve replacement in nonelderly patients? Comparison of explantation for structural valve deterioration of allograft and pericardial prostheses*. The Journal of Thoracic and Cardiovascular Surgery, 2006. **131**(3): p. 558-564.e4.

41. Herreros J. M., Mastrobuoni S., Ubilla M., Rábago G., Lorente Ruiz M., Rifón J., and Hernández M., *Trasplante de homoinjertos valvulares cardiacos y vasculares [Cardiac and vascular homograft valves transplant]*. *An Sist Sanit Navar*, 2006. **29**: p. 153-61.
42. Deborde C., Simionescu D. T., Wright C., Liao J., Sierad L. N., and Simionescu A., *Stabilized Collagen and Elastin-Based Scaffolds for Mitral Valve Tissue Engineering*. *Tissue Engineering Part A*, 2016. **22**(21-22): p. 1241-1251.
43. Nakamura N., Kimura T., and Kishida A., *Overview of the Development, Applications, and Future Perspectives of Decellularized Tissues and Organs*. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, 2017. **3**(7): p. 1236-1244.
44. Weber B., Dijkman P. E., Scherman J., Sanders B., Emmert M. Y., Grunenfelder J., Verbeek R., Bracher M., Black M., Franz T., Kortsmid J., Modregger P., Peter S., Stampanoni M., Robert J., Kehl D., van Doeselaar M., Schweiger M., Brokopp C. E., Walchli T., Falk V., Zilla P., Driessen-Mol A., Baaijens F. P. T., and Hoerstrup S. P., *Off-the-shelf human decellularized tissue-engineered heart valves in a non-human primate model*. *Biomaterials*, 2013. **34**(30): p. 7269-7280.
45. Simon P., *Early failure of the tissue engineered porcine heart valve SYNERGRAFT™ in pediatric patients*. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2003. **23**(6): p. 1002-1006.
46. Perri G., Polito A., Esposito C., Albanese S. B., Francalanci P., Pongiglione G., and Carotti A., *Early and late failure of tissue-engineered pulmonary valve conduits used for right ventricular outflow tract reconstruction in patients with congenital heart disease*. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2012. **41**(6): p. 1320-1325.
47. Syedain Z. H., Bradee A. R., Kren S., Taylor D. A., and Tranquillo R. T., *Decellularized Tissue-Engineered Heart Valve Leaflets with Recellularization Potential*. *Tissue Engineering Part A*, 2013. **19**(5-6): p. 759-769.
48. Giuseppe M. D., Law N., Webb B., A. Macrae R., Liew L. J., Sercombe T. B., Dilley R. J., and Doyle B. J., *Mechanical behaviour of alginate-gelatin hydrogels for 3D bioprinting*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2018. **79**: p. 150-157.
49. Liu J., Zheng H. Y., Poh P. S. P., Machens H. G., and Schilling A. F., *Hydrogels for Engineering of Perfusible Vascular Networks*. *International Journal of Molecular Sciences*, 2015. **16**(7): p. 15997-16016.
50. Jockenhoevel S., Zund G., Hoerstrup S. P., Chalabi K., Sachweh J. S., Demircan L., Messmer B. J., and Turina M., *Fibrin gel-advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering*. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2001. **19**(4): p. 424-430.
51. Ye Q., Zund G., Benedikt P., Jockenhoevel S., Hoerstrup S. P., Sakyama S., Hubbell J. A., and Turina M., *Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering*. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2000. **17**(5): p. 587-591.
52. Mendelson K. and Schoen F. J., *Heart valve tissue engineering: Concepts, approaches, progress, and challenges*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2006. **34**(12): p. 1799-1819.
53. Flanagan T. C., Sachweh J. S., Frese J., Schnöring H., Gronloh N., Koch S., Tolba R. H., Schmitz-Rode T., and Jockenhoevel S., *In vivo remodeling and structural characterization of fibrin-based tissue-engineered heart valves in the adult sheep model*. *Tissue Eng Part A*, 2009. **15**(10): p. 2965-2976.
54. Kuo C. K. and Ma P. X., *Ionic crosslinked alginate hydrogels as scaffolds for tissue engineering: Part 1. Structure, gelation rate and mechanical properties*. *Biomaterials*, 2001. **22**(6): p. 511-521.
55. Dijkman P. E., Driessen-Mol A., Frese L., Hoerstrup S. P., and Baaijens F. P. T., *Decellularized homologous tissue-engineered heart valves as off-the-shelf alternatives to xeno- and homografts*. *Biomaterials*, 2012. **33**(18): p. 4545-4554.
56. Wu X., Rabkin-Aikawa E., Guleserian K. J., Perry T. E., Masuda Y., Sutherland F. W. H., Schoen F. J., Mayer J. E., and Bischoff J., *Tissue-engineered microvessels on three-dimensional biodegradable scaffolds using human endothelial progenitor cells*. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2004. **287**(2): p. H480-H487.
57. Mann B. K., Gobin A. S., Tsai A. T., Schmedlen R. H., and West J. L., *Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: synthetic ECM analogs for tissue engineering*. *Biomaterials*, 2001. **22**(22): p. 3045-3051.

58. Wang H. S., Hung S. C., Peng S. T., Huang C. C., Wei H. M., Guo Y. J., Fu Y. S., Lai M. C., and Chen C. C., *Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord*. *Stem Cells*, 2004. **22**(7): p. 1330-1337.
59. Kadner A., Zund G., Maurus C., Breyman C., Yakarisik S., Kadner G., Turina M., and Hoerstrup S. P., *Human umbilical cord cells for cardiovascular tissue engineering: a comparative study*. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2004. **25**(4): p. 635-641.
60. Sodian R., Schaefermeier P., Abegg-Zips S., Kuebler W. M., Shakibaei M., Daebritz S., Ziegelmueller J., Schmitz C., and Reichart B., *Use of Human Umbilical Cord Blood-Derived Progenitor Cells for Tissue-Engineered Heart Valves*. *Annals of Thoracic Surgery*, 2010. **89**(3): p. 819-828.
61. Duan B., Hockaday L., Das S., Xu C., and Butcher J., *Comparison of Mesenchymal Stem Cell Source Differentiation Toward Human Pediatric Aortic Valve Interstitial Cells Within 3D Engineered Matrices*. *Tissue engineering. Part C, Methods*, 2015. **21**.
62. L'Heureux N., Paquet S., Labbe R., Germain L., and Auger F. A., *A completely biological tissue-engineered human blood vessel*. *Faseb Journal*, 1998. **12**(1): p. 47-56.
63. Auger F. A., Berthod F., Moulin W., Pouliot R., and Germain L., *Tissue-engineered skin substitutes: from in vitro constructs to in vivo applications*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2004. **39**: p. 263-275.
64. Tremblay C., Ruel J., Bourget J. M., Laterreur V., Vallieres K., Tondreau M. Y., Lacroix D., Germain L., and Auger F. A., *A New Construction Technique for Tissue-Engineered Heart Valves Using the Self-Assembly Method*. *Tissue Engineering Part C-Methods*, 2014. **20**(11): p. 905-915.
65. Picard-Deland M., Ruel J., Galbraith T., Tremblay C., Kawecki F., Germain L., and Auger F. A., *Tissue-Engineered Tubular Heart Valves Combining a Novel Precontraction Phase with the Self-Assembly Method*. *Annals of Biomedical Engineering*, 2017. **45**(2): p. 427-438.
66. Lepage M. A., *Fabrication de substituts de valves cardiaques par génie tissulaire avec la méthode par auto-assemblage sur gabarits tridimensionnels usinés*, in *Génie Mécanique*. 2018, Laval: Québec.
67. Vallieres K., Laterreur V., Tondreau M. Y., Ruel J., Germain L., Fradette J., and Auger F. A., *Human adipose-derived stromal cells for the production of completely autologous self-assembled tissue-engineered vascular substitutes*. *Acta Biomaterialia*, 2015. **24**: p. 209-219.
68. Li J. P., Chen M. J., Fan X. Q., and Zhou H. F., *Recent advances in bioprinting techniques: approaches, applications and future prospects*. *Journal of Translational Medicine*, 2016. **14**: p. 15.
69. Jana S. and Lerman A., *Bioprinting a cardiac valve*. *Biotechnology Advances*, 2015. **33**(8): p. 1503-1521.
70. Datta P., Ayan B., and Ozbolat I. T., *Bioprinting for vascular and vascularized tissue biofabrication*. *Acta Biomaterialia*, 2017. **51**: p. 1-20.
71. Hockaday L. A., Kang K. H., Colangelo N. W., Cheung P. Y. C., Duan B., Malone E., Wu J., Girardi L. N., Bonassar L. J., Lipson H., Chu C. C., and Butcher J. T., *Rapid 3D printing of anatomically accurate and mechanically heterogeneous aortic valve hydrogel scaffolds*. *Biofabrication*, 2012. **4**(3).
72. Duan B., Kapetanovic E., Hockaday L. A., and Butcher J. T., *Three-dimensional printed trileaflet valve conduits using biological hydrogels and human valve interstitial cells*. *Acta Biomaterialia*, 2014. **10**(5): p. 1836-1846.
73. Ilkhanizadeh S., Teixeira A. I., and Hermanson O., *Inkjet printing of macromolecules on hydrogels to steer neural stem cell differentiation*. *Biomaterials*, 2007. **28**(27): p. 3936-3943.
74. Marques C. F., Diogo G. S., Pina S., Oliveira J. M., Silva T. H., and Reis R. L., *Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: a comprehensive review*. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2019. **30**(3): p. 12.
75. Alfadhel A., Ouyang J., Mahajan C. G., Forouzandeh F., Cormier D., and Borkholder D. A., *Inkjet printed polyethylene glycol as a fugitive ink for the fabrication of flexible microfluidic systems*. *Materials & Design*, 2018. **150**: p. 182-187.
76. Wang S., Dalton P. D., and Dargaville T. R., *Spatial Patterning of Hydrogels via 3D Covalent Transfer Stamping from a Fugitive Ink*. *Macromolecular Rapid Communications*, 2018. **39**(4): p. 5.
77. Mamidanna A., Lefky C., and Hildreth O., *Drop-on-demand printed microfluidics device with sensing electrodes using silver and PDMS reactive inks*. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2017. **21**(11): p. 9.

78. Wu W., DeConinck A., and Lewis J. A., *Omnidirectional Printing of 3D Microvascular Networks*. *Advanced Materials*, 2011. **23**(24): p. H178-H183.
79. Kang H. W., Lee S. J., Ko I. K., Kengla C., Yoo J. J., and Atala A., *A 3D bioprinting system to produce human-scale tissue constructs with structural integrity*. *Nature Biotechnology*, 2016. **34**(3): p. 312-+.
80. Lee A., Hudson A. R., Shiwardski D. J., Tashman J. W., Hinton T. J., Yerneni S., Bliley J. M., Campbell P. G., and Feinberg A. W., *3D bioprinting of collagen to rebuild components of the human heart*. *Science*, 2019. **365**(6452): p. 482-487.
81. Mirdamadi E., Tashman J. W., Shiwardski D. J., Palchesko R. N., and Feinberg A. W., *FRESH 3D Bioprinting a Full-Size Model of the Human Heart*. *Acs Biomaterials Science & Engineering*, 2020. **6**(11): p. 6453-6459.
82. Begin-Drolet A., Dussault M. A., Fernandez S. A., Larose-Dutil J., Leask R. L., Hoesli C. A., and Ruel J., *Design of a 3D printer head for additive manufacturing of sugar glass for tissue engineering applications*. *Additive Manufacturing*, 2017. **15**: p. 29-39.
83. Gauvin-Rossignol G., *Conception d'un dispositif expérimental pour la mise à l'essai in vitro et ex vivo d'un pancréas artificiel*, in *Génie Mécanique*. 2018, Université Laval: Québec.
84. Bellan L. M., Singh S. P., Henderson P. W., Porri T. J., Craighead H. G., and Spector J. A., *Fabrication of an artificial 3-dimensional vascular network using sacrificial sugar structures*. *Soft Matter*, 2009. **5**(7): p. 1354-1357.
85. Koyata Y., Ikeuchi M., and Ikuta K., *Sealless 3D microfluidic channel fabrication by sacrificial caramel template direct-patterning in 26th IEEE International Conference on Micro Electro Mechanical Systems*. 2013, IEEE: New York. p. 311-314.
86. Dussault M.-A., *Développement d'un dispositif d'extrusion tridimensionnelle de sucre vitrifié pour la production de réseaux fluidiques complexes par moulage rapide*, in *Génie Mécanique*. 2016, Laval: Québec.
87. He Y., Qiu J. J., Fu J. Z., Zhang J., Ren Y. N., and Liu A., *Printing 3D microfluidic chips with a 3D sugar printer*. *Microfluidics and Nanofluidics*, 2015. **19**(2): p. 447-456.
88. *Qu'est-ce que l'isolmalt?* 2015; Available from: <https://www.fqmc.org/zone-membre/questions-reponses/qu-est-ce-que-l-isomalt-2>.
89. Gelber M. K., Hurst G., Comi T. J., and Bhargava R., *Model-guided design and characterization of a high-precision 3D printing process for carbohydrate glass*. *Additive Manufacturing*, 2018. **22**: p. 38-50.
90. Duan B., Hockaday L. A., Kang K. H., and Butcher J. T., *3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels*. *Journal of Biomedical Materials Research - Part A*, 2013. **101** A(5): p. 1255-1264.
91. Liberski A. R., *Three-dimensional printing of alginate: From seaweeds to heart valve scaffolds*. *QScience connect*, 2016.
92. Zuk P. A., Zhu M., Mizuno H., Huang J., Futrell J. W., Katz A. J., Benhaim P., Lorenz H. P., and Hedrick M. H., *Multilineage cells from human adipose tissue: Implications for cell-based therapies*. *Tissue Engineering*, 2001. **7**(2): p. 211-228.
93. Zuk P. A., Zhu M., Ashjian P., De Ugarte D. A., Huang J. I., Mizuno H., Alfonso Z. C., Fraser J. K., Benhaim P., and Hedrick M. H., *Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells*. *Molecular Biology of the Cell*, 2002. **13**(12): p. 4279-4295.
94. Zuk P. A., *The Adipose-derived Stem Cell: Looking Back and Looking Ahead*. *Molecular Biology of the Cell*, 2010. **21**(11): p. 1783-1787.
95. Ni H., Zhao Y. M., Ji Y. L., Shen J., Xiang M. X., and Xie Y., *Adipose-derived stem cells contribute to cardiovascular remodeling*. *Aging-Us*, 2019. **11**(23): p. 11756-11769.
96. Vallee M., Cote J. F., and Fradette J., *Adipose-tissue engineering: Taking advantage of the properties of human adipose-derived stem/stromal cells*. *Pathologie Biologie*, 2009. **57**(4): p. 309-317.
97. Colazzo F., Sarathchandra P., Smolenski R. T., Chester A. H., Tseng Y. T., Czernuszka J. T., Yacoub M. H., and Taylor P. M., *Extracellular matrix production by adipose-derived stem cells: Implications for heart valve tissue engineering*. *Biomaterials*, 2011. **32**(1): p. 119-127.

98. Wang C., Cen L., Yin S., Liu Q. H., Liu W., Cao Y. L., and Cui L., *A small diameter elastic blood vessel wall prepared under pulsatile conditions from polyglycolic acid mesh and smooth muscle cells differentiated from adipose-derived stem cells*. *Biomaterials*, 2010. **31**(4): p. 621-630.
99. Aubin K., Vincent C., Proulx M., Mayrand D., and Fradette J., *Creating capillary networks within human engineered tissues: Impact of adipocytes and their secretory products*. *Acta Biomaterialia*, 2015. **11**: p. 333-345.
100. Miana V. V. and Gonzalez E. A. P., *Adipose tissue stem cells in regenerative medicine*. *Ecancermedicalscience*, 2018. **12**: p. 14.
101. VeDepo M. C., Buse E. E., Quinn R. W., Williams T. D., Detamore M. S., Hopkins R. A., and Converse G. L., *Species-specific effects of aortic valve decellularization*. *Acta Biomaterialia*, 2017. **50**: p. 249-258.
102. Moulin V., *Médecine Régénératrice: mise à niveau en biologie cellulaire*. 2020, Université Laval.
103. Collin S., *Production d'échafaudages cellulaires épais pour applications de génie tissulaire via impression 3D d'encre fugitive*, in *Génie Mécanique*. 2020, Laval: Québec.
104. Bohari S. P. M., Hukins D. W. L., and Grover L. M., *Effect of calcium alginate concentration on viability and proliferation of encapsulated fibroblasts*. *Bio-Medical Materials and Engineering*, 2011. **21**(3): p. 159-170.
105. *How to Prepare Your Specimen for Immunofluorescence Microscopy*. 2015 [cited 2021; Available from: <https://www.leica-microsystems.com/science-lab/how-to-prepare-your-specimen-for-immunofluorescence-microscopy/>].
106. Gauvin-Rossignol G., Legros P., Ruel J., Fortin M. A., and Begin-Drolet A., *Sugar glass fugitive ink loaded with calcium chloride for the rapid casting of alginate scaffold designs*. *Heliyon*, 2018. **4**(7): p. 14.
107. Capps S. B., Elkins R. C., and Fronk D. M., *Body surface area as a predictor of aortic and pulmonary valve diameter*. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2000. **119**(5): p. 975-982.
108. George I., Guglielmetti L. C., Bettinger N., Moss A., Wang C., Kheysin N., Hahn R., Kodali S., Leon M., Bapat V., Borger M. A., Williams M., Smith C., and Khalique O. K., *Aortic Valve Annular Sizing*. *Circulation: Cardiovascular Imaging*, 2017. **10**(5).
109. Liberski A., Latif N., Raynaud C., Bollensdorff C., and Yacoub M., *Alginate for cardiac regeneration: From seaweed to clinical trials*. *Glob Cardiol Sci Pract*, 2016. **2016**(1).
110. Lee K. Y. and Mooney D. J., *Alginate: Properties and biomedical applications*. *Progress in Polymer Science*, 2012. **37**(1): p. 106-126.
111. Mohanty S., Wu Y., Chakraborty N., Mohanty P., and Ghosh G., *Impact of alginate concentration on the viability, cryostorage, and angiogenic activity of encapsulated fibroblasts*. 2016. **65**: p. 269-277.
112. Cao N., Chen X. B., and Schreyer D. J., *Influence of Calcium Ions on Cell Survival and Proliferation in the Context of an Alginate Hydrogel*. *ISRN Chemical Engineering*, 2012. **2012**.
113. Łabowska M. B., Cierluk K., Jankowska A. M., Kulbacka J., Detyna J., and Michalak I., *A Review on the Adaption of Alginate-Gelatin Hydrogels for 3D Cultures and Bioprinting*. *Materials*, 2021. **14**(4).
114. Buckley C. T. and O'Kelly K. U., *Maintaining cell depth viability: on the efficacy of a trimodal scaffold pore architecture and dynamic rotational culturing*. *Journal of Materials Science-Materials in Medicine*, 2010. **21**(5): p. 1731-1738.
115. Grayson W. L., Martens T. P., Eng G. M., Radisic M., and Vunjak-Novakovic G., *Biomimetic approach to tissue engineering*. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 2009. **20**(6): p. 665-673.
116. Bégin-Drolet A., Collin S., Gosselin J., and Ruel J., *A new robust controller for non-linear periodic single-input/single-output systems using genetic algorithms*. *Journal of Process Control*, 2018. **61**: p. 23-35.
117. Laterreur V., *Développement d'outils pour le conditionnement mécanique de substituts valvulaires et vasculaires produits par génie mécanique*, in *Génie Mécanique*. 2015, Laval: Québec.
118. Chemla D. M. T. L., Edmund; Attal, Pierre; Hervé, Philippe, *Circulation pulmonaire normale et au cours de l'hypertension artérielle pulmonaire*. *La lettre du cardiologue*, 2015. **483**.

119. Kim M. H., Lee Y. W., Jung W.-K., Oh J., and Nam S. Y., *Enhanced rheological behaviors of alginate hydrogels with carrageenan for extrusion-based bioprinting*. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 2019. **98**: p. 187-194.
120. Nachlas A. L. Y., Li S., Streeter B. W., De Jesus Morales K. J., Sulejmani F., Madukauwa-David D. I., Bejleri D., Sun W., Yoganathan A. P., and Davis M. E., *A multilayered valve leaflet promotes cell-laden collagen type I production and aortic valve hemodynamics*. *Biomaterials*, 2020. **240**.
121. Zou Q., Grottkau B. E., He Z., Shu L., Yang L., Ma M., and Ye C., *Biofabrication of valentine-shaped heart with a composite hydrogel and sacrificial material*. *Materials Science and Engineering C*, 2020. **108**.
122. Bociaga D., Bartniak M., Grabarczyk J., and Przybyszewska K., *Sodium Alginate/Gelatine Hydrogels for Direct Bioprinting—The Effect of Composition Selection and Applied Solvents on the Bioink Properties*. *Materials*, 2019. **12**(17).
123. Bergmann O., Zdunek S., Felker A., Salehpour M., Alkass K., Bernard S., Sjostrom S. L., Szewczykowska M., Jackowska T., dos Remedios C., Malm T., Andrä M., Jashari R., Nyengaard J. R., Possnert G., Jovinge S., Druid H., and Frisén J., *Dynamics of Cell Generation and Turnover in the Human Heart*. *Cell*, 2015. **161**(7): p. 1566-1575.
124. Vermette M., Trottier V., Menard V., Saint-Pierre L., Roy A., and Fradette J., *Production of a new tissue-engineered adipose substitute from human adipose-derived stromal cells*. *Biomaterials*, 2007. **28**(18): p. 2850-2860.

# Annexe A: Recette du sirop de sucre

## **MÉLANGE N°1 :**

- 78 g de sucrose<sup>7</sup>
- 50 mL d'eau déminéralisée

## **MÉLANGE N°2 :**

- 6.20 g de sucrose
- 8 mL d'eau déminéralisée
- 0.30 g de chlorure de calcium<sup>8</sup>

## **Préparation :**

1. Peser les constituants du mélange n°1 dans un bécher de 200 mL (bécher n°1) et ajouter une barre magnétique.
2. Peser les constituants du mélange n°2 dans un bécher de 50 mL (bécher n°2) et ajouter une barre magnétique.
3. Placer le bécher n°1 sur une plaque chauffante agitatrice et placer une sonde de température dans le bécher pour connaître la température du mélange. Chauffer la plaque à 100°C et mettre la rotation à 400 rpm.
4. Placer le bécher n°2 sur une plaque chauffante agitatrice et placer une sonde de température dans le bécher pour connaître la température du mélange. Mettre la rotation à 200 rpm.
5. Lorsque le mélange n°1 atteint 100°C, vérifier que le sucre soit complètement dissous et augmenter la température à 175°C.
6. Lorsque le mélange n°1 atteint 125°C, chauffer la plaque du mélange n°2 à 140°C.
7. Lorsque la couleur du mélange n°1 devient jaune (aux alentours de 175°C), enlever le bécher n°1 de la plaque chauffante et le laisser refroidir en laissant la sonde de température dans le bécher.

---

<sup>7</sup> C<sub>12</sub>H<sub>22</sub>O<sub>11</sub>, Sigma Aldrich, Produit #S0389, Lot #SLBJ3869

<sup>8</sup> CaCl<sub>2</sub>, Sigma Aldrich, Produit #C1016-500, Lot #SLBT0806

Remarque : si la température du mélange diminue en dessous de 135°C avant que le mélange n°2 n'atteigne 145°C, remettre le mélange n°1 sur la plaque chauffante à 145°C.

8. Lorsque le mélange n°2 commence à devenir jaune, retirer le bécher n°2 de la plaque chauffante et verser le mélange n°2 dans le mélange n°1.
9. Mélanger le sirop avec une spatule et le verser dans une seringue de 20 mL préalablement chauffée qui sera placée dans l'imprimante 3D. Mettre le piston sur la seringue et la placer dans l'imprimante 3D.

## Annexe B : Recette de fabrication d'un gel à 4% d'alginate

**A préparer au moins 24h en avance** : Peser 4.66 g de sodium d'alginate<sup>9</sup> dans un bécher de 250 mL et ajouter 100 mL d'eau distillée (concentration de 4.66 g/100 mL = 4.66%). Ajouter une barre magnétique dans le bécher et le placer sur une plaque tournante. Activer la rotation à 400 rpm et s'assurer que la barre magnétique tourne bien. Laisser pendant tourner pendant environ 24h le temps que l'alginate soit complètement dissous. L'alginate peut être conservé au réfrigérateur.

1. Prendre une pipette de 25 mL et ajouter dans un bécher de 250 mL, 36 mL d'alginate à 4.66% à température ambiante.
2. Prendre un bécher de 10 mL et ajouter 0.20 g de CaCO<sub>3</sub><sup>10</sup>.
3. Prendre un bécher de 10 mL et ajouter 0.68 g de GDL<sup>11</sup>.
4. Avec une pipette automatique de 1 mL, ajouter 2 mL d'eau distillée dans le bécher avec CaCO<sub>3</sub>. Mettre le bécher dans un bain ultrasonique et en même temps mélanger l'eau avec le CaCO<sub>3</sub> à l'aide d'une spatule. Le mélange doit être homogène (pas de grumeau de CaCO<sub>3</sub>).
3. Ajouter la solution de CaCO<sub>3</sub> dans le bécher avec l'alginate et mélanger jusqu'à obtenir une solution homogène.
4. Ajouter 4 mL d'eau distillée à l'aide d'une pipette automatique de 1 mL dans le bécher avec GDL. Mélanger avec la pipette jusqu'à ce que le GDL soit bien dissous.
5. Verser la solution de GDL dans la solution d'alginate. Mélanger rapidement à l'aide d'une spatule.
6. Verser le mélange dans le moule.
7. Attendre environ dix minutes que l'alginate se gélifie.
8. Prendre un bécher de 250 mL. Peser 2.8 g de CaCl<sub>2</sub><sup>12</sup> et ajouter 280 mL d'eau distillée. Plonger le moule avec l'alginate à l'intérieur pendant environ 30 minutes dans le bécher le temps que le sucre se dissolve.
9. La valve peut être conservée au réfrigérateur dans un contenant avec de l'eau distillée et un peu d'éthanol pour éviter le développement de moisissures sur la valve.

---

<sup>9</sup> Sodium alginate, Sigma Aldrich, Produit #W201502, Lot #MKCC4541

<sup>10</sup> CaCO<sub>3</sub> Calcium Carbonate Nanoparticules, 97.5%, 15-40 nm, SkySpring Nanomaterials, Produit #1951RH, Lot #1951-033017

<sup>11</sup> C<sub>6</sub>H<sub>10</sub>O<sub>6</sub>, AlfaAesar, Produit #A13105, Lot #10205779,

<sup>12</sup> CaCl<sub>2</sub>, EMD, Produit #1.02378.0500, Lot #K47498778 716

## Annexe C : Calcul de concentration

### CONCENTRATION POUR UN ALGINATE À 4%

$$\% \text{ final}_{\text{alginate}} = \% \text{ initial}_{\text{alginate}} \times \frac{\text{Volume alginate}}{\text{Volume total}} = 4.66\% \times \frac{36}{36 + 2 + 4} = 3.99\%$$

$$\% \text{ final}_{\text{GDL}} = \% \text{ initial}_{\text{GDL}} \times \frac{\text{Volume GDL}}{\text{Volume total}} = 17\% \times \frac{4}{36 + 2 + 4} = 1.62\%$$

$$\% \text{ final}_{\text{CaCO}_3} = \% \text{ initial}_{\text{CaCO}_3} \times \frac{\text{Volume CaCO}_3}{\text{Volume total}} = 10\% \times \frac{2}{36 + 2 + 4} = 0.48\%$$

### CONCENTRATION POUR UN ALGINATE À 3.5%

$$\% \text{ final}_{\text{alginate}} = \% \text{ initial}_{\text{alginate}} \times \frac{\text{Volume alginate}}{\text{Volume total}}$$

$$\% \text{ initial}_{\text{alginate}} = \% \text{ final}_{\text{alginate}} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume alginate}} = 3.5\% \times \frac{36 + 2 + 4}{36} = 4.08\%$$

### CONCENTRATION POUR UN ALGINATE À 3%

$$\% \text{ final}_{\text{alginate}} = \% \text{ initial}_{\text{alginate}} \times \frac{\text{Volume alginate}}{\text{Volume total}}$$

$$\% \text{ initial}_{\text{alginate}} = \% \text{ final}_{\text{alginate}} \times \frac{\text{Volume total}}{\text{Volume alginate}} = 3\% \times \frac{36 + 2 + 4}{36} = 3.5\%$$