



UNIVERSITÉ SORBONNE PARIS NORD – UNIVERSITÉ PARIS 13

ECOLE DOCTORALE GALILEE

DOCTORAT

Discipline : Sciences de la vie et de la santé

Thèse présentée par

Soraya LANOUAR

**Conception et validation de nouveaux matériaux 3D poreux pour
la cicatrisation et la régénération cutanées**

Soutenue publiquement le 30 septembre 2020

Devant le jury composé de :

Docteur Florence RUGGIERO	Rapporteur
Professeur Emmanuel PAUTHE	Rapporteur
Docteur Graciela PAVON-DJAVID	Examineur
Professeur Frédéric CHAUBET	Examineur
Docteur Brigitte CLOSS	Directrice de thèse
Docteur Didier LETOURNEUR	Directeur de thèse

“Correr como pollo sin cabeza”



REMERCIEMENTS

Je remercie tout d'abord mes directeurs de thèse, Didier Letourneur, directeur du laboratoire LVTS, et Brigitte Closs, directrice générale déléguée R&D de l'entreprise Silab, de m'avoir fait confiance pour mener à bien ce projet de thèse, pour m'avoir accueillie dans leurs équipes respectives et guidée tout au long de ce travail grâce à leur expertise.

Je tiens à remercier les membres du jury, Florence Ruggiero et Emmanuel Pauthe, rapporteurs, ainsi que Frédéric Chaubet, président du jury et Graciela Pavon-Djavid d'avoir accepté de juger et de discuter de ce travail.

Je voudrais remercier Laurent Bidault, mon encadrant chez Silab/Siltiss, pour m'avoir suivie et aidée tout au long de mon projet ainsi que pour sa grande contribution à la relecture du manuscrit. Merci à Camille Ehret de Siltiss, pour son apport précieux à ce projet, qui a permis d'obtenir beaucoup de résultats intéressants, et pour notre belle collaboration. Je remercie aussi Rachida Aid du LVTS pour tout ce qu'elle m'a appris, depuis mes tous débuts lors de mon master 2 et pour son implication dans ce travail de recherche.

Je remercie tous les membres de l'équipe 3, qui ont tous apporté leur pierre à l'édifice de ma thèse et qui rendent cette équipe formidable. Teresa, Marie-Noëlle, Camille, Paola, Jessica et Laura. Merci pour les nombreux échanges et conseils, merci d'avoir partagé votre expérience avec moi, sur un plan professionnel ou personnel. Je remercie les thésards, Fernanda, Jérôme et Xavier, les plus les anciens Maya, Marisol et Bo ainsi que les dernières recrues Louise, Chau et Alessandra pour cette entraide constante et la bonne ambiance permanente. Sans oublier Cédric, que je remercie pour sa bienveillance. Je remercie les membres de l'équipe basés à Villetaneuse, Murielle, Elnaz, Fatou, Lucie, Graciela, Adi, et Isabelle, toujours aidants et accueillants lors de mes passages.

Mes remerciements chaleureux vont également aux membres du LVTS, Soumaya, Pauline, Karen, Audrey, Raphaël, Katia, Guillaume, Christine, Zak, Carine, Kristell, Marie-Anne, Samira, Catherine et Véronique (j'en oublie certainement) avec qui j'ai pu échanger, rigoler et partager durant toutes ces années.

Je voudrais également remercier les Siltissiens, encore une fois Laurent et Cam, Lili, Sandrine, Romain et Céline pour m'avoir intégrée aussi facilement à cette équipe en or et pour leur accueil et

leur gentillesse à chacune de mes visites. Je pense aussi aux Silabiens de la « chimie », Sandrine, Vincent, Katia, Magali et Lya qui m'ont formée, notamment à la PTC..., et intégrée dès mes tous premiers jours dans l'entreprise. Je remercie aussi Adèle, thésarde Silabienne, pour son soutien, sa douceur et son écoute.

Je remercie tous mes amis qui ne sont pas directement impliqués dans la thèse mais qui m'ont soutenue pendant cette période et notamment autour d'une petite mousse.

Pour finir, je remercie ma mère, mon père, mes frères, mon neveu et mon compagnon pour leur soutien sans faille et leurs encouragements durant toutes ces années.

TABLE DES MATIERES

LISTE DES ABREVIATIONS	ix
INTRODUCTION GENERALE	1
CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE	5
I] La Peau et la cicatrisation	7
I.1) La physiologie de la peau	7
I.1.a) L'épiderme	8
I.1.b) La jonction dermo-épidermique	9
I.1.c) Le derme	9
I.1.d) L'hypoderme	12
I.2) Les plaies	12
I.2.a) Les types de plaie	12
I.2.b) La classification	13
I.3) La cicatrisation	14
I.3.a) Les phases de la cicatrisation	14
I.3.b) Les types de cicatrisation	21
I.3.c) L'altération de la cicatrisation.....	22
I.4) Stratégies thérapeutiques.....	23
I.4.a) Formulations topiques	23
I.4.b) Pansements.....	23
I.4.c) Pansements actifs	24
I.4.d) Substituts cutanés.....	24
I.4.e) Greffes.....	25
I.5) Conclusion sur la peau et la cicatrisation.....	25
II] Les biomatériaux pour la régénération cutanée.....	25
II.1) Les biomatériaux.....	25
II.1.a) Définition.....	25

II.1.b)	Supports 3D.....	26
II.1.c)	Classification	29
II.2)	Les hydrogels.....	30
II.2.a)	Définition.....	30
II.2.b)	Contexte d'utilisation.....	31
II.2.c)	Polymères.....	31
II.2.d)	Réticulation	41
II.2.e)	Formation de pores.....	45
II.2.f)	Exemples d'hydrogels à base de biopolymères	47
II.3)	Applications.....	48
II.3.a)	Plateforme de libération.....	49
II.3.b)	Substituts cutanés.....	52
II.4)	Modèles d'étude animaux	56
II.4.a)	Réaction de l'hôte	56
II.4.b)	Modèles de plaie.....	57
III]	Conclusion de la revue bibliographique.....	58
CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES.....		59
I]	Réactifs chimiques, solvants, enzymes et protéines utilisées	61
II]	Caractérisation des molécules à délivrer	61
II.1)	Molécules d'intérêts	61
II.1.a)	Molécule A	61
II.1.b)	Molécule B	62
II.2)	Marquage des molécules par un fluorophore	62
II.2.a)	Marquage de la molécule A	62
II.2.b)	Marquage de la molécule B	63
II.3)	Radiomarquage de la molécule A	63
II.4)	Caractérisation des molécules	63
II.4.a)	Chromatographies	63

II.4.b)	Dosages colorimétriques.....	64
II.4.c)	Potentiel Zeta.....	65
III]	Synthèse des matériaux.....	65
III.1)	Synthèse de l'hydrogel.....	65
III.1.a)	Réaction chimique de synthèse	65
III.1.b)	Lyophilisation	66
III.2)	Modulations des propriétés physicochimiques	67
III.2.a)	Ratio des polysaccharides.....	67
III.2.b)	Porosité	68
III.2.c)	Taux de réticulation	68
III.2.d)	Récapitulatif des formulations sans actifs	68
III.3)	Incorporation des molécules A et B.....	69
III.3.a)	Méthode 1 : incorporation <i>in situ</i>	69
III.3.b)	Méthode 2 : Incorporation par diffusion inverse	69
III.3.c)	Méthode 3 : Incorporation par imprégnation	70
III.3.d)	Tableaux récapitulatifs des dénominations	70
III.4)	Fonctionnalisations des hydrogels.....	71
III.4.a)	Addition d'une protéine de la matrice extracellulaire.....	71
III.4.b)	Synthèse de systèmes combiné : molécule A/Collagène.....	72
III.4.c)	Fonctionnalisation par des charges positives	75
IV]	Propriétés physico-chimiques.....	75
IV.1)	Morphologie	75
IV.1.a)	Structure et surface	75
IV.1.b)	Porosité	76
IV.2)	Caractérisation des propriétés physico-chimiques.....	76
IV.2.a)	Taux de gonflement	76
IV.2.b)	Dosage de phosphore	76
IV.2.c)	Dégradation enzymatique.....	76

IV.2.d)	Tests mécaniques.....	77
IV.3)	Analyse de la fonctionnalisation	78
IV.3.a)	Molécules A et B	78
IV.3.b)	Collagène.....	78
IV.3.c)	Charges positives	79
V]	Etudes cellulaires	79
V.1)	Culture cellulaire	79
V.1.a)	Cellules	80
V.1.b)	Conditions d'encensement	80
V.2)	Etudes de cytotoxicité.....	81
V.2.a)	Tapis cellulaire 2D	81
V.2.b)	Activité métabolique.....	82
V.3)	Migration.....	82
V.4)	Immunomarquages.....	83
V.4.a)	Marquages Dapi/phalloïdine	83
V.4.b)	Immunomarquages (anticorps primaires et secondaires).....	83
VI]	Études <i>ex vivo</i> : Pénétration transcutanée (PTC).....	83
VI.1)	Préparation des peaux	84
VI.1.a)	Prélèvement des peaux.....	84
VI.1.b)	Résistance transépithéliale (TEER).....	84
VI.2)	Altération de la barrière cutanée.....	84
VI.2.a)	Cycle de congélation/décongélation	84
VI.2.b)	Micro-perforations.....	85
VI.2.c)	Caractérisation des méthodes d'altération	85
VI.3)	Etude de libération	85
VI.3.a)	Préparation des échantillons	85
VI.3.b)	Montage du système	86
VI.3.c)	Traitement des échantillons	86

VII]	Expérimentation animale.....	87
VII.1)	Modèles animaux.....	87
VII.1.a)	Modèle de plaie chez le rat.....	88
VII.1.b)	Modèles chez la souris	89
VII.2)	Analyses des plaies <i>in vivo</i>	90
VII.2.a)	Imagerie nucléaire : TEMP	90
VII.2.b)	Mesure de l'aire de la plaie.....	91
VII.3)	Traitement des échantillons	91
VII.3.a)	Récupération des échantillons de peau.....	91
VII.3.b)	Congélation	91
VII.3.c)	Revêtement des lames par de la gélatine.....	91
VII.3.d)	Coupes histologiques	91
VII.4)	Analyse des échantillons	92
VII.4.a)	Microscopie.....	92
VII.4.b)	Colorations histologiques.....	92
VIII]	Statistiques.....	93
CHAPITRE III : FORMULATION D'UNE PLATEFORME DE LIBERATION A PARTIR D'UNE MATRICE POREUSE		95
I]	Optimisation du support par des modifications physico-chimiques	97
I.1)	Synthèse des formulations.....	97
I.1.a)	Analyse de la morphologie.....	97
I.1.b)	Evaluation du taux de réticulation.....	99
I.2)	Impacts sur les propriétés physico-chimiques.....	103
I.2.a)	Porosité	103
I.2.b)	Propriétés mécaniques	105
I.2.c)	Biodégradabilité <i>in vitro</i>	108
I.3)	Conclusion sur la mise en forme et physicochimie des matrices poreuses.....	110
II]	Incorporation de molécules actives dans le support.....	111

II.1)	Molécule A	111
II.1.a)	Caractérisation du composé	111
II.1.b)	Incorporation dans l'hydrogel.....	115
II.2)	Molécule B	122
II.2.a)	Caractérisation du composé	123
II.2.b)	Incorporation dans l'hydrogel.....	124
II.2.c)	Fonctionnalisation par des charges positives	128
II.3)	Sélection des matériaux.....	132
II.4)	Caractérisation des matériaux sélectionnés	133
II.4.a)	Etudes de libération sur des modèles de peau	133
II.4.b)	Interactions cellules/matériaux	142
III]	Conclusion sur l'incorporation et la libération de molécules actives	145
CHAPITRE IV : SYNTHÈSE D'UN SUBSTITUT CUTANÉ PAR FONCTIONNALISATION DES HYDROGELS		
.....		147
I]	Fonctionnalisation des hydrogels de pullulane/dextrane	149
I.1)	Addition d'une protéine de la matrice extracellulaire.....	149
I.1.a)	Synthèse et caractérisation.....	150
I.1.b)	Modulation de la concentration en collagène.....	158
I.1.c)	Co-incorporation molécule A/collagène	160
I.2)	Fonctionnalisation par des charges positives	163
I.2.a)	Impact sur les propriétés physico-chimiques	164
I.2.b)	Interactions cellules/matériaux	168
I.3)	Conclusion sur la fonctionnalisation des hydrogels.....	169
II]	Preuve de concept	170
II.1)	Interactions cellules/matériaux	170
II.1.a)	Contact indirect.....	170
II.1.b)	Contact direct.....	171
II.2)	Interactions hôte/matériau	177

II.2.a)	Implantation sous-cutanée	178
II.2.b)	Implantation dans un modèle de plaie cutanée	181
III]	Conclusion de la preuve de concept des fonctionnalisations.....	187
CONCLUSION GENERALE		191
REFERENCES		197
LISTE DES FIGURES		221
LISTE DES TABLEAUX		231
ANNEXES		233
Annexe 1 : Tests mécaniques complémentaires		235
Annexe 2 : Etude de fractionnement de la molécule A		237
Annexe 3 : Publications scientifiques.....		241

LISTE DES ABREVIATIONS

2D : Bidimensionnel	LVR : Intervalle de viscoélasticité linéaire
3D : Tridimensionnel	MEB : Microscopie électronique à balayage (environnemental)
5-DTAF : 5-(4,6-dichlorotriazinyl)aminofluoresceine	MEC : Matrice extracellulaire
99mTc : Technétium-99m	MEM : Milieu minimum essentiel de Eagle
AUC : Aire sous la courbe	N/A : Non applicable
B/R : Bleu alcian/rouge nucléaire	Na₂CO₃ : Bicarbonate de sodium
CCM : Chromatographie sur couche mince	NaCl : chlorure de sodium
CMC : carboxyméthylcellulose	OCDE : Organisation de coopération et de développement économiques
DAPI : Diamidino-Phényl-Indol	PBS : Tampon phosphate salin (Phosphate-Buffered Saline)
dRi : Indice de réfraction	PG : Protéoglycane
Em/ex : Emission/excitation	pI : Point isoélectrique
EOPS : Exempt d'organisme pathogène spécifique	PMT : Photomultiplicateur
FA : Formaldéhyde	PTC : Pénétration transcutanée
FITC : Fluorescéine isothiocyanate	PuD : Pullulane/Dextrane
FHN : Fibroblastes humains	RMN : Résonnance magnétique nucléaire
G' : Module de stockage	Rpm : rotation par minute
G'' : Module de perte	RS : Rouge sirius
GAG : Glycosaminoglycane	SHG : Génération de seconde harmonique
HA : Acide hyaluronique	STMP : Sodium trimétaphosphate
HCl : Acide chlorhydrique	SVF : Sérum de veau fœtal
HE : Hématoxyline/éosine	TA : Température ambiante
HES : Hématoxyline/éosine/safran	TEER : Résistance électrique transépithéliale (Transepithelial electrical resistance)
HPSEC : Chromatographie d'exclusion stérique à haute performance	TEMP : Tomographie à émission monophotonique
Ip : Indice de polydispersité	TRITC : Tetramethylrhodamine B isothiocyanate
IV : Intraveineuse	UV : Ultraviolets
JDE : Jonction dermo-épidermique	
KHN : Kératinocytes humains	
LDH : Lactate déshydrogénase	
LS : Lumière diffusée	

INTRODUCTION GENERALE

La peau est le plus étendu des organes du corps humain, avec une surface de 1,5 à 2m² chez l'adulte [1], et assure plusieurs fonctions : protection, organe sensoriel, régulation thermo hydrique et respiration [2]. Cet organe est soumis tout au long de la vie à de nombreux dommages, provoqués par des facteurs extérieurs d'origine physique (coupures, abrasions), mécanique (ulcères), thermique (brûlures) ou chimique (radiations) [3]. Ces dommages peuvent atteindre toute la population mais les enfants en bas âge et les personnes âgées représentent une catégorie plus exposée et plus vulnérable [4]. Ces blessures conduisent alors à une rupture des structures anatomiques et fonctionnelles de la peau pouvant provoquer des dommages des tissus profonds, tels que les muscles ou les os [5]. L'interruption de la continuité des tissus cutanés peut retentir sur chacune des fonctions assurées par la peau.

Ces lésions cutanées entraînent une réaction physiologique du corps humain, appelée cicatrisation, qui a pour but de restaurer et réparer les tissus endommagés. Ce processus résulte d'une cascade d'évènements biologiques et biochimiques complexes, finement contrôlés et organisés en quatre phases principales qui se chevauchent dans le temps : l'hémostase, l'inflammation, la prolifération et le remodelage [6]. Le processus de cicatrisation suffit en général à guérir les plaies, mais la sévérité des dommages (trop profonds, trop étendus etc.) ainsi que d'autres facteurs tels que l'âge, le diabète et la nutrition [7], [8] peuvent ralentir et compromettre les mécanismes de réparation tissulaire. Ces facteurs impactent la régénération cutanée et conduisent à des risques de non ou mauvaise cicatrisation. Lorsque le délai de guérison est supérieur à 4 semaines, les plaies sont dénommées plaies chroniques [9], [10]. Les patients sont alors exposés à de nombreux risques (infections, douleurs, complications etc.) conduisant à une diminution de leur qualité de vie et pouvant aller jusqu'à engager leur pronostic vital.

Les plaies chroniques et compliquées, dues à l'échec de la cicatrisation normale, représentent par ailleurs, des coûts significatifs pour les systèmes de santé [11]–[13]. La prévalence et l'impact économique des plaies dans la population mondiale [14], révèlent une incidence élevée des plaies chroniques associée à un coût important. A titre d'exemple, aux Etats-Unis, l'incidence des plaies chroniques touche 2,5 à 4,5 millions de personnes par an représenterait un coût annuel de plus d'un milliard de dollars pour le système de santé américain [13], [15]. Dans l'Union Européenne, plus de 4 millions personnes par an sont affectées par des blessures sévères [10] qui représenteraient environ 2% des ressources financières européennes [16]. En France, ce sont plus de 2 millions de personnes qui sont atteintes de plaies chroniques, dont 43% d'ulcères, 25% de pieds diabétiques et 17% d'escarres [17]. Ces chiffres sont également destinés à croître avec l'augmentation de la prévalence

du diabète et de l'obésité, couplée au vieillissement général de la population, facteurs aggravant l'incidence des plaies chroniques [7].

La complexité du processus de régénération cutanée, la diversité étiologique des plaies ainsi que l'augmentation de l'incidence des plaies chroniques, ont conduit la recherche à développer de nouveaux traitements. En effet, depuis ces 20 dernières années, le marché mondial des traitements pour la cicatrisation des plaies connaît une grande expansion et les pays développés sont en forte demande pour des produits innovants et plus efficaces. Le développement de nouveaux traitements, plus adaptés, plus opérants, utilisant des procédés inédits est absolument essentiel afin d'améliorer la prise en charge de ces lésions, améliorer le processus de cicatrisation et ainsi diminuer le risque d'apparition de complications et de leurs conséquences sur la vie des patients.

Une innovation dans le domaine de réparation tissulaire a été d'élaborer et d'utiliser les biomatériaux, notamment pour la conception des pansements et des substituts cutanés. La volonté de mimer les propriétés de la matrice extracellulaire naturelle pour protéger et influencer les facteurs impliqués dans la régénération cutanée, a également encouragé le développement de matériaux tridimensionnels poreux. Ces matrices sont très prometteuses et sont étudiées pour différents domaines médicaux : cardiovasculaire, osseuse et cutanée. Ces structures 3D garantissent d'une part la protection du site de la plaie, maintenant des conditions favorables à la cicatrisation (maintien milieu humide, comblement de la perte de substance etc.) et possèdent d'autre part des propriétés physico-chimiques modulables et de multiples possibilités de fonctionnalisation avec des éléments actifs favorisant la cicatrisation.

Le projet de cette thèse CIFRE avec la société Silab s'inscrit dans l'amélioration des soins proposés pour la régénération cutanée des plaies sévères et chroniques dans une approche innovante avec comme but principal le développement des matrices tridimensionnelles poreuses fonctionnalisées par des molécules d'origine végétale. Cette stratégie sera évaluée dans deux contextes, à savoir : (i) plateforme de libération et (ii) substitut cutané. La conception et la caractérisation physico-chimique de ces biomatériaux s'accompagneront de l'évaluation de leur biocompatibilité et de leur efficacité sur des modèles *in vitro* et *in vivo*.

CHAPITRE I : REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I] La Peau et la cicatrisation

I.1) La physiologie de la peau

La peau est un organe complexe de par sa composition et sa fonction. Sa structure est constituée de trois principaux compartiments superposés, de la surface vers la profondeur : l'épiderme, le derme et l'hypoderme (Figure 1). Elle possède également plusieurs annexes, traversant une à plusieurs couches : les follicules pileux, les glandes sébacées excréant le sébum et les glandes sudoripares excréant la sueur.

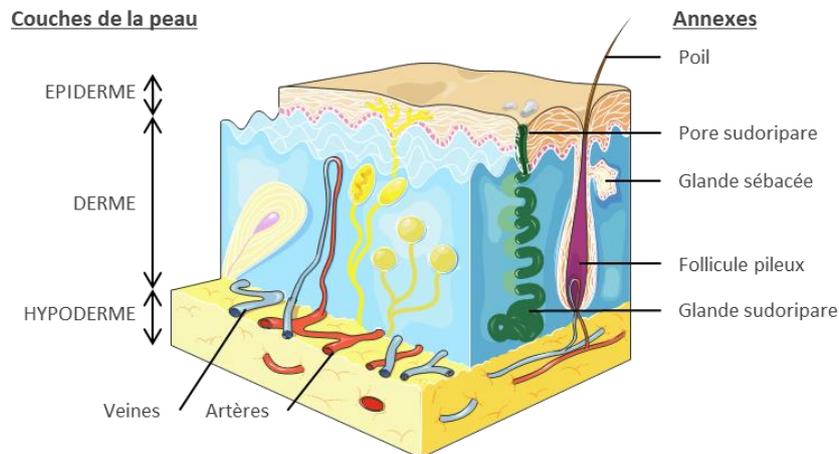


Figure 1 : Coupe schématique de la peau et ses annexes (adapté de « Servier Medical Art »)

Il s'agit de l'organe le plus étendu du corps humain représentant une surface de 2m² [18] et 15% du poids total d'un adulte [19]. Son épaisseur varie de 1 à 6 mm selon la zone du corps [20]. D'un point de vue chimique, la peau comprend en moyenne 70% d'eau, 27,5% de protéines, 2% de matières grasses et 0,5% de sels minéraux et oligo-éléments [2].

Cet organe possède de multiples fonctions indispensables à la vie [21]. En effet, la peau constitue la première barrière de l'organisme face aux agressions extérieures (mécaniques, rayonnement, thermiques, chimiques ou microbiennes). Elle a une fonction thermorégulatrice pour maintenir la température interne à 37°C. Elle permet également la synthèse de la vitamine D et est impliquée dans le métabolisme lipidique. Enfin, elle a un rôle sensoriel grâce à ses récepteurs (mécaniques, thermiques nociceptifs, proprioception). Ces différentes fonctions peuvent être modifiées voire altérées par des facteurs locaux ou systémiques.

La peau est organisée en 3 couches, subdivisées en plusieurs compartiments. Elle présente de nombreux types cellulaires et éléments structuraux qui interagissent entre eux et participent aux fonctions de la peau.

I.1.a) L'épiderme

I.1.a.i) Organisation

L'épiderme est la couche la plus fine et la plus superficielle de la peau. Ce tissu épithélial stratifié, de revêtement semi-perméable, et d'épaisseur d'environ 100 µm [19], se divise en quatre couches [2], [18], [22] : la couche cornée, la couche granuleuse, la couche épineuse et la couche basale. Quatre types cellulaires sont répartis au sein de ces différentes couches [18], [23] : les kératinocytes, les mélanocytes, les cellules de Langherans et les cellules de Merkel (Figure 2). Chacun de ces types cellulaires participe respectivement à la fonction barrière, photo-protectrice [19], la défense immunitaire [24] et au toucher.

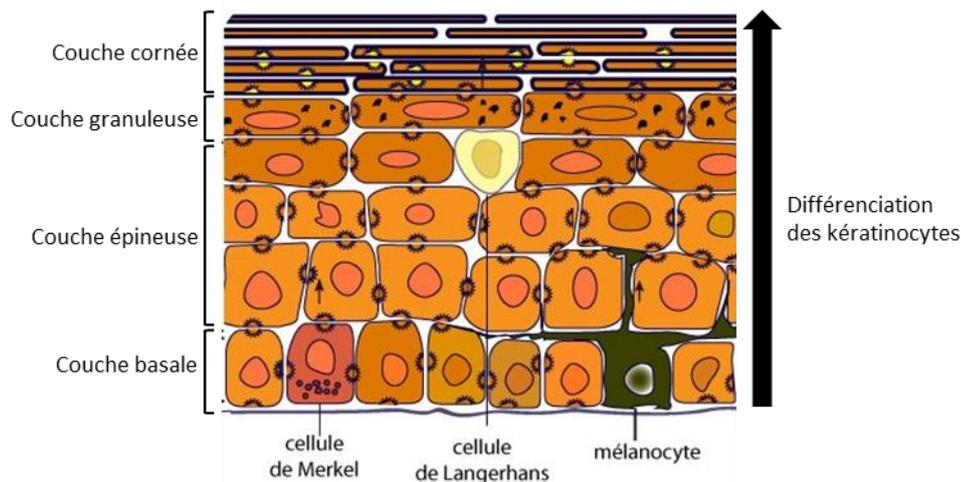


Figure 2 : Représentation schématique de l'épiderme [25]

I.1.a.ii) Kératinocytes

Les kératinocytes représentent au moins 80% de la population cellulaire de l'épiderme [26]. Ils naissent au niveau de la couche basale, migrent jusqu'à la couche cornée en se différenciant en cornéocytes et forment un épithélium stratifié, squameux en surface. Au cours de la différenciation, la synthèse en kératine augmente, les membranes des organites et noyaux se déstabilisent et les filaments de kératine s'agrègent ce qui rend l'enveloppe cellulaire cornée [27]. Entre-temps, les lipides exsudés dans l'espace intercellulaire forment une matrice lipidique continue, scellant les cornéocytes ensemble [27]. Les kératinocytes assurent trois fonctions principales [18] : la cohésion de l'épiderme avec une protection contre les agressions mécaniques, une fonction de barrière entre les milieux intérieur et extérieur grâce à la couche cornée, et la protection contre les radiations.

L'épiderme est un tissu en perpétuelle croissance. Le processus de renouvellement des cellules de la couche épidermique générées depuis la couche basale jusqu'à la couche cornée dure de 21 à 28 jours [28].

I.1.b) La jonction dermo-épidermique

L'interface entre l'épiderme et le derme est formée par une membrane basale poreuse : la jonction dermo-épidermique (JDE). La JDE est une unité fonctionnelle composée à la fois d'éléments cellulaires et extracellulaires (Figure 3) : la membrane plasmique des kératinocytes de la couche basale, des composants communs aux autres membranes basales (laminines, collagène de type IV, perlecan et nidogènes) et des protéines spécialisées [29].

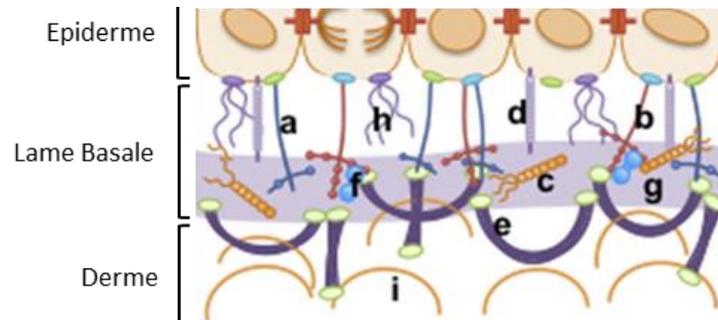


Figure 3 : Schéma représentatif de la lame basale avec les protéines qui la composent : a & b : laminines 332 et 511/521 ; c : perlecan ; d, e, g et i : collagènes XVII, VII, IV et I/III ; f : nidogène ; h : syndecan (adapté de Rousselle *et al.* 2018) [30].

Cette jonction permet des échanges de « cellules-fluides-nutriments », la polarité de la croissance cellulaire et assure la cohésion entre les deux couches de la peau [19]. Elle a une épaisseur de 50 à 100 nm et s'amincit avec l'âge, responsable en partie des signes visibles du vieillissement [31].

I.1.c) Le derme

Le derme est un tissu conjonctif, dense, très vascularisé et innervé. Sa forte vascularisation lui permet également de servir de support nourricier à l'épiderme par transfert passif des nutriments au travers de la JDE [2]. Le derme représente la couche la plus épaisse de la peau (200 à 3000 μm) et participe à la souplesse, l'élasticité et la résistance à la traction de la peau [28]. Il contribue à la protection contre les blessures mécaniques, retient l'eau, aide à la régulation thermique et possède des récepteurs sensoriels. Il est composé de matrice extracellulaire (MEC) et de plusieurs types cellulaires : les fibroblastes, les mastocytes et les dendrocytes dermiques [24]. Des cellules migrantes, provenant du sang, comme les monocytes et les polynucléaires peuvent également intervenir suite à un stress et à des phénomènes d'inflammation [32].

I.1.c.i) Les fibroblastes

Les fibroblastes sont le principal type cellulaire du derme. Ce sont des cellules présentant des prolongements cytoplasmiques parfois ramifiés [26]. Ils sont spécialisés dans la synthèse et le

remodelage des composants de la MEC. Ce sont des cellules essentielles à la cicatrisation. En se différenciant en myofibroblastes, elles jouent un rôle prépondérant dans la contraction des plaies [32].

I.1.c.ii) La matrice extracellulaire

Les propriétés mécaniques du derme découlent de sa matrice extracellulaire. Sa composition et sa structure permettent le soutien mécanique des tissus et régulent le comportement cellulaire. Elle est composée d'un enchevêtrement de molécules structurales, non structurales et d'eau (Figure 4). Les différents composants de la MEC cutanée sont regroupés, de manière non exhaustive, dans le Tableau 1.

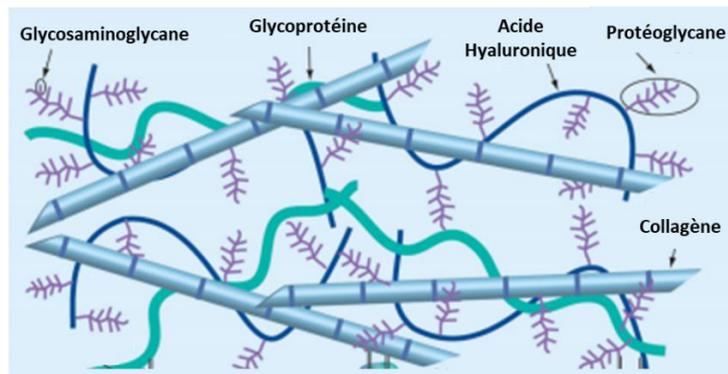


Figure 4 : Schéma de la structure tridimensionnelle complexe des macromolécules de la MEC (modifié de Zhu *et al*, [33])

La majorité des molécules structurales sont des protéines formant des fibres qui apportent un support tridimensionnel complexe et définissent la rigidité et l'élasticité du tissu [34]. Le collagène et l'élastine forment chacun des réseaux de fibres étendus dans l'espace extracellulaire où ils contribuent de manière significative à l'intégrité des tissus et fournissent une stabilité mécanique [35]. Les fibres de collagène représentent 70% du derme et assurent sa fermeté, sa solidité et comprennent les collagènes de type I, III, V [2]. Les fibres d'élastine, quant à elles, confèrent au réseau de collagène son élasticité.

Les molécules structurales non fibrillaires sont principalement des protéoglycane (PG) et des glycosaminoglycane (GAG) [31] (Tableau 1). Les protéoglycane sont constitués d'une protéine centrale liée à une ou plusieurs chaînes latérales de GAGs. Les GAGs sont des polysaccharides linéaires chargés négativement liés à un noyau de protéoglycane mais peuvent exister indépendamment. Les GAGs remplissent les espaces interstitiels du tissu, apportant un espace chargé, dynamique et osmotiquement actif à la MEC [34]. Leurs charges négatives permettent aux PGs de fixer l'eau, les ions et les facteurs de croissance [36].

Les protéines non structurales, appelées protéines matricellulaires, sont sécrétées localement par les cellules mais ne contribuent pas à la structure mécanique de la MEC. Elles interagissent cependant avec les éléments matriciels structuraux et sont impliquées dans la signalisation cellulaire de façon autocrine ou paracrine [37]. Elles sont principalement exprimées de manière transitoire au cours du développement et de la cicatrisation [34].

Tableau 1 : Molécules constitutives de la MEC [34], [36], [37]

Fibre		Structurales			Non structurales
Protéine	Glycoprotéine	Protéine	Protéoglycane	GAG	Non fibrillaire
Protéine	Glycoprotéine	Protéine	Protéoglycane	GAG	Protéine matricellulaire
Collagènes type I, III, V	Laminine	Collagènes type IV, VI, VII, XIV	Décorine	Acide hyaluronique	Thrombospondines
Fibrine	Fibronectine		Versican	Chondroïtine sulfate	Tenascines
Elastine	Vitronectine		Dermapontine	Dermatane sulfate	Fibulines
	Fibrilline			Héparine sulfate	

I.1.c.iii) Les dermes papillaires et réticulaires

Le derme présente deux subdivisions : le derme papillaire (superficiel) et le derme réticulaire (profond) [2] (Figure 5). Ces deux zones diffèrent à la fois par la densité cellulaire et la composition de leur MEC respective [38].

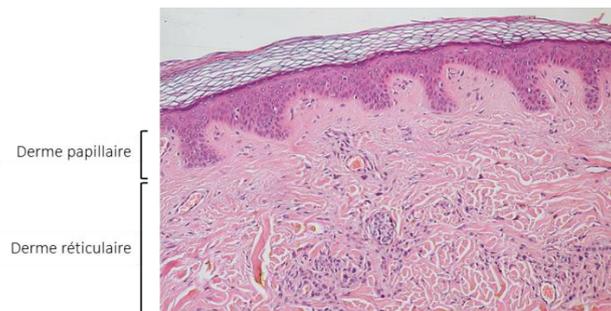


Figure 5 : Coupe histologique de la peau, coloration hématoxyline/éosine [39]

Le derme papillaire doit son nom aux saillies dermiques situées entre les crêtes épidermiques qui forment des papilles (Figure 5). Il est localisé à la surface du derme, proche de la JDE, dense en fibroblastes avec un réseau de fines fibres de collagène. Il est plus densément vascularisé que le derme réticulaire avec de nombreux capillaires [40]. Le derme réticulaire est la couche sous-jacente. Il est plus épais, composé de larges faisceaux de fibres de collagène et est moins dense en cellules que le derme papillaire. Sa vascularisation moins dense est assurée par un réseau au diamètre plus important que ce qui est trouvé dans le derme papillaire.

Le derme est suivi de l'hypoderme sans limite franche entre les deux ; ce dernier s'étend jusqu'aux plans aponévrotiques ou périostés. Certaines zones du corps, tels que les paupières, les oreilles et les organes génitaux masculins, ne possèdent pas d'hypoderme [22].

I.1.d) L'hypoderme

L'hypoderme est composé d'une couche épaisse de lobes adipeux subdivisés en lobules. Ces lobules sont séparés par des septums interlobulaires qui servent de passage aux vaisseaux et nerfs destinés au derme. L'hypoderme contient également des fibres de collagène et d'élastine provenant du derme [26]. C'est un tissu très vascularisé qui constitue une réserve de lipides stockés sous forme de triglycérides dans les adipocytes. L'hypoderme a également un rôle de protection mécanique de la peau, de thermorégulation, d'homéostasie et métabolique [41].

I.2) Les plaies

La peau est exposée à tous types de lésions au quotidien, provoquant des plaies cutanées. Ces plaies sont définies comme une interruption de l'intégrité du revêtement cutané ou muqueux et peuvent être d'étiologies très diverses [21]. La plupart des plaies résultent d'une altération des cellules cutanées et se réparent lors du processus physiologique de cicatrisation. Elles peuvent être localisées sur n'importe quelle zone du corps, de façon plus ou moins étendue et de profondeur plus ou moins importante.

I.2.a) Les types de plaie

Les blessures les plus répandues sont superficielles, limitées aux couches les plus externes de la peau. Certaines sont plus profondes et atteignent les tissus sous-jacents plus internes, tels que les vaisseaux sanguins, les nerfs, les muscles, les os et certains organes [21]. Elles sont en grande majorité le résultat d'une agression physique, mécanique, thermique ou chimique. Il existe un large spectre de plaies différentes, qui sont regroupées ci-dessous selon l'étiologie de la lésion.

I.2.a.i) Les plaies traumatiques

Ces plaies résultent de l'atteinte de la peau et des tissus sous-jacents, causée par une force mécanique extérieure. En général, selon la perte de substance, elles peuvent guérir spontanément en moins d'un mois grâce au processus de cicatrisation. Elles peuvent être regroupées en fonction de l'origine de la blessure [3] : abrasion, ponction, lacération et incision.

I.2.a.ii) Les brûlures

La brûlure est une destruction du revêtement cutané qui peut atteindre des tissus sous-jacents. Elle est consécutive à l'action d'agents thermiques, électriques, chimiques ou de radiations. Elle conduit à la disparition en partie de la peau ainsi que de ses propriétés. Les réactions physiologiques de la peau à cette agression sont impactées par ce type de lésion du fait de l'altération de la matrice sur la zone lésée [42]. Les brûlures peuvent persister pendant des mois voire des années avec des risques accrus d'infection.

I.2.a.iii) Les ulcères

Un ulcère est une perte de substance d'un revêtement épithélial, cutané ou muqueux, qui peut s'étendre jusqu'aux tissus sous-jacents [43]. Les ulcères ont des origines plurifactorielles [44] qui altèrent le processus de cicatrisation et empêchent la guérison. Ils sont souvent concomitants à une pathologie (diabète, obésité) [45]–[47]. Il existe plusieurs types d'ulcères présentés dans le Tableau 2.

Tableau 2 : Types d'ulcères

Type	Origine	Localisation	Référence
Artériel	Ischémie tissulaire résultat d'une insuffisance artérielle périphérique	Membre inférieur	[49]
Veineux	Stase du sang résultant d'une congestion ou hypertension veineuse chronique. Elle évolue en inflammation chronique et conduit à la nécrose tissulaire.	Membre inférieur	[49]
Pression (escarre)	Ischémie tissulaire résultat d'une compression de la peau qui interfère avec la circulation au point de contact. Entraîne la rupture de la peau, une invasion bactérienne subséquente et une réaction inflammatoire.	Saillies osseuses	[50]
Diabétique	Complication du diabète : neuropathie périphérique. Insensibilité avec la pression excessive et répétitive. Risque d'amputation du membre atteint	Saillies osseuses, plantaires	[48]

I.2.b) La classification

L'évaluation des blessures peut être répertoriée selon de nombreux critères [51] : temps de cicatrisation (aiguë ou chronique), état (propre ou infecté), origine (interne ou externe), couleur, taille et forme. Les plaies peuvent également être classées en fonction de leur profondeur et sont décrites par 4 stades d'escarres selon le comité de conseil national des ulcères de pressions (NPUAP) (Tableau 3).

Tableau 3 : Classification des plaies selon le stade d'après le NPUAP [52]

Stade	Caractéristiques
I	<ul style="list-style-type: none"> - Zone d'érythème ne pâissant pas sous la pression de la peau intacte - Deviendra le siège de la lésion cutanée
II	<ul style="list-style-type: none"> - Perte tissulaire partielle touchant l'épiderme, le derme ou les deux - Se présente comme une abrasion, une phlyctène ou un ulcère superficiel - Contours rouges, chauds et partiellement indurés ; souvent très douloureux - Absence de tissu nécrotique
III	<ul style="list-style-type: none"> - Perte tissulaire totale atteignant le tissu sous-cutané et pouvant s'étendre au fascia sous-jacent sans toutefois le pénétrer - Se présente sous la forme d'un cratère plus profond avec ou sans atteinte du tissu adjacent - Présence de nécrose et d'inflammation - Lit de la plaie non douloureux sauf s'il y a infection ou insuffisance artérielle
IV	<ul style="list-style-type: none"> - Perte tissulaire totale atteignant le muscle, l'os et les structures de soutien, telles que tendon et capsule articulaire - Destruction et nécrose importantes ; infection systémique possible

A la suite de cette interruption du revêtement cutané, et donc de la propriété barrière de la peau, un processus de réparation physiologique, la cicatrisation, se met en place.

I.3) La cicatrisation

Dans son sens le plus large, la régénération désigne tous les phénomènes de réparation au cours desquels un tissu retrouve son intégrité fonctionnelle et structurelle [53]. La cicatrisation, à proprement parler, est le processus mis en place pour refermer une plaie et aboutir à la formation d'un nouveau tissu conjonctif fibreux [54].

I.3.a) Les phases de la cicatrisation

La cicatrisation est un processus physiologique qui intervient à la suite d'une lésion de la peau et engendre la reconstruction des couches tissulaires endommagées et leur vascularisation. Il s'agit d'un phénomène complexe, dynamique et hiérarchisé comportant une cascade d'événements biochimiques et biologiques, hautement régulés [55]. Il implique de nombreux acteurs : des médiateurs solubles, différents types cellulaires et des composants de la MEC. La cicatrisation se déroule suivant quatre phases qui se chevauchent dans le temps [56] (Figure 6).

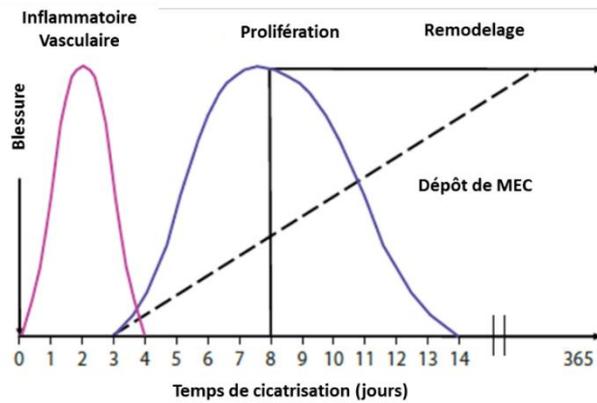


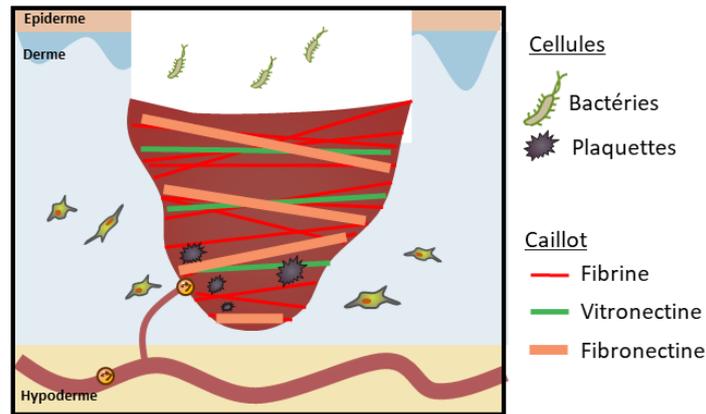
Figure 6 : Chronologie des différentes phases de la cicatrisation [57]

Les premières phases qui interviennent (de 0 à 4 jours) sont les phases vasculaire et inflammatoire [6], [58], [59]. Elles conduisent à la formation d'un caillot de fibrine dans la plaie, concomitant au recrutement des cellules inflammatoires qui assureront par la suite la détersion de la plaie. Ensuite a lieu la phase de réparation proliférative des tissus dermique et épidermique, aboutissant à la ré-épithélialisation de la plaie. La dernière phase est celle du remodelage, elle permet la maturation de la matrice extracellulaire néoformée.

I.3.a.i) Formation du caillot de fibrine

I.3.a.i.1 Phase vasculaire

La formation du caillot de fibrine repose dans un premier temps sur une phase vasculaire (Figure 7). C'est la réponse immédiate de l'organisme suite à une lésion pour arrêter le saignement de la plaie. En effet, une altération tissulaire provoque une perturbation vasculaire et une extravasation des constituants du sang au niveau de la plaie [13]. Le sous-endothélium vasculaire alors mis à nu, interagit avec les plaquettes circulantes qui vont s'agréger sur le site lésé pour aboutir à la formation du clou plaquettaire : c'est l'hémostase. Elle s'accompagne d'une vasoconstriction locale rapide des vaisseaux grâce à la contraction des cellules musculaires lisses [60]. Ce réflexe neuronal mécanique favorise une hémostase immédiate en ralentissant la fuite sanguine le temps que les autres réactions hémostatiques se mettent en place.

Figure 7 : Phase vasculaire (adapté de Sun *et al*, [61] et Tracy *et al*, [34])

L'extravasation sanguine apporte également de nombreux éléments (fibronectine, thrombine, facteur von Willebrand) sur le site de la plaie. Ils aboutissent à la formation du caillot de fibrine dérivé du fibrinogène soluble plasmatique [58]. Les molécules de fibrine et la fibronectine plasmatiques constituent les éléments principaux de cette matrice temporaire. La fibronectine présente des propriétés pour l'adhésion cellulaire et stimule la migration et l'adhésion des fibroblastes, des kératinocytes et des cellules endothéliales [62]. Ce processus s'achève par la coagulation du sang échappé des vaisseaux lésés du tissu endommagé. Il restaure ainsi une barrière physiologique protectrice temporaire, agissant comme matrice provisoire pour permettre l'invasion cellulaire par les neutrophiles, monocytes, fibroblastes et cellules endothéliales [63].

En plus de leur rôle dans la coagulation, les plaquettes, piégées dans cette matrice provisoire, libèrent des facteurs de croissance (PDGF, TGF- β et IGF-1) [6], [59] permettant d'induire la migration et l'activation des macrophages et des fibroblastes [64]. De nombreux médiateurs vasculaires et facteurs chimiotactiques sont générés pendant la coagulation, pour initier la phase inflammatoire [65]. Ces substances vont recruter les leucocytes inflammatoires, des cellules vasculaires et des fibroblastes [66], [67] au sein du caillot de fibrine.

Il existe par ailleurs un sous-ensemble de protéines, en plus des principaux composants structurels de la matrice provisoire, les matrikines et les matricryptines [68]. Elles apparaissent de manière transitoire pendant la cicatrisation, tout au long des différentes étapes du processus. Il s'agit de fragments bioactifs issus de la dégradation des composants structuraux de la MEC (d'origine plasmatique ou non) et des protéines matricellulaires [69]. Ils fournissent des informations contextuelles spécifiques aux cellules sur leur environnement matriciel lié aux phases de la cicatrisation.

I.3.a.i.2 Phase inflammatoire

La phase inflammatoire (Figure 8) a lieu dans les 10 à 15 minutes suivant la lésion tissulaire [59]. Elle a pour but majeur d'empêcher l'infection, de nettoyer la plaie des débris cellulaires et de préparer la phase de réparation.

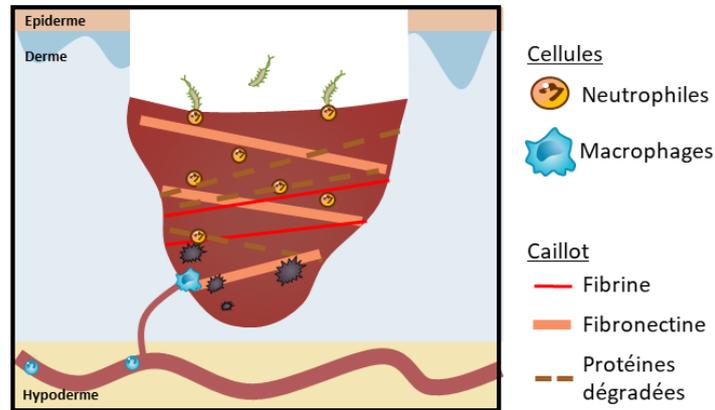


Figure 8 : Phase inflammatoire (adapté de Sun *et al*, [61] et Tracy *et al*, [34])

A la vasoconstriction rapide de la phase vasculaire, succède une phase de vasodilatation, augmentant la perméabilité vasculaire et permettant aux cellules circulantes du système immunitaire d'affluer dans le caillot de fibrine. Cette vasodilatation est médiée par plusieurs facteurs dont l'histamine, certains dérivés du complément (C3a et C5a) et les prostaglandines [70].

Les neutrophiles sont les premiers leucocytes présents dans la plaie, attirés par les médiateurs inflammatoires libérés par les plaquettes, les peptides bactériens, et les facteurs du complément [58], [60], [71]. Ils provoquent une inflammation aiguë du tissu qui maintient la perméabilité vasculaire pour permettre l'arrivée des cellules immunitaires. Ils assurent aussi la détergence locale des débris tissulaires nécrosés et des microorganismes, piégés par les propriétés adhésives des protéines du caillot (fibrine, fibronectine). Les neutrophiles sécrètent également des protéases (élastase, collagénase), qui dégradent la MEC endommagée et dénaturée [72]. Après 2-3 jours dans la plaie, les neutrophiles entrent en apoptose et sont remplacés par les monocytes [62].

Les monocytes sont attirés par les facteurs chimiotactiques issus du clou plaquettaire, les dérivés du complément et les facteurs issus des bactéries [60], [65]. Ils se différencient alors en macrophages et adhèrent aux protéines de la MEC provisoire mise en place dans l'étape vasculaire. Les macrophages présentent deux rôles dans la cicatrisation. D'une part ils nettoient la plaie, en éliminant les corps étrangers et les bactéries grâce à leur capacité de phagocytose, d'autre part, ils constituent une source essentielle de facteurs de croissance, dont l'IGF-1, le TGF β , le PDGF, et de cytokines inflammatoires

(IL-1, TNF α) [6], [58]. Ces médiateurs amplifient la réponse inflammatoire, stimulent le recrutement et l'activation des cellules cutanées et la production de collagène par les fibroblastes, pour aboutir à la formation du tissu de granulation [6], [65].

I.3.a.ii) Phase de réparation et de dépôt matriciel

Une fois la plaie nettoyée, les cellules peuvent migrer, proliférer et sécréter de la MEC dans la matrice provisoire (Figure 9), médiée par la sécrétion de cytokines et de facteurs de croissance. Cette phase aboutit à la fermeture de la plaie, résultat de plusieurs processus : la formation du tissu de granulation, la ré-épithélialisation et la néovascularisation [59].

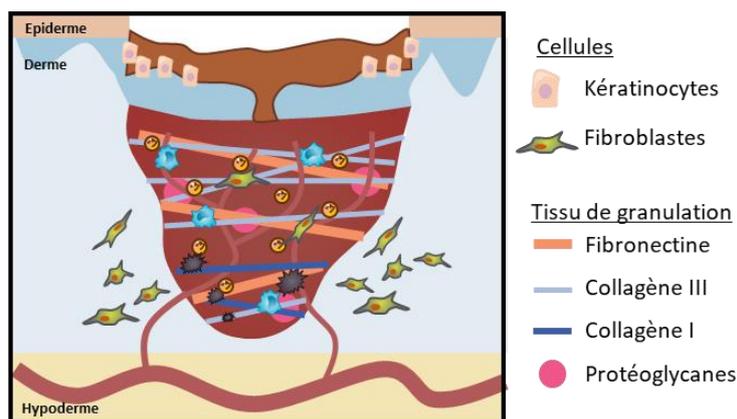


Figure 9 : Phase de prolifération (adapté de Sun *et al*, [61] et Tracy *et al*, [34])

I.3.a.ii.1 Formation du tissu de granulation

Le nouveau stroma, appelé aussi tissu de granulation, commence à envahir l'espace endommagé 4 jours après la lésion cutanée [6]. C'est la présence de nombreux capillaires dans ce tissu qui lui donne cet aspect granuleux. La formation de ce nouveau tissu dure entre 10 à 15 jours et correspond à la prolifération des fibroblastes et des cellules endothéliales ainsi qu'à la synthèse de matrice extracellulaire [73].

La MEC mise en place pendant les étapes vasculaire et inflammatoire, est principalement composée de fibrine, de fibronectine, d'acide hyaluronique et de protéoglycanes, servant de support pour l'infiltration cellulaire [74], [75]. Les fibroblastes migrent et prolifèrent dans cette matrice et y sécrètent des molécules de la MEC. Cette MEC riche en fibrine/fibronectine est progressivement remplacée par une matrice collagénique (collagène type I et III) plus dense, enrichie en PG, GAG et autres glycoprotéines [76]. Cette étape est sous la dépendance des cytokines excrétées par les plaquettes et les macrophages, notamment l'IGF1, l'EGF, le TNF α , le TGF β et le PDGF [58], [59] mais

également par les fibroblastes eux-mêmes *via* stimulation autocrine. La matrice est remodelée par des enzymes protéolytiques sécrétées par les fibroblastes et favorise aussi la migration cellulaire. Le tissu de granulation riche en fibroblastes est progressivement remodelé pour former une MEC mature [6].

Pendant la deuxième semaine de la cicatrisation, certains fibroblastes surexpriment l'actine α , devenant alors des myofibroblastes [77], [78]. Ces myofibroblastes possèdent des capacités accrues pour la contraction de leur environnement [79] et contractent rapidement la matrice de fibrine lâche. Ils utilisent cette matrice contractée comme surface pour la migration et le remodelage des tissus. Cette étape est appelée la contraction de la plaie. Elle implique une interaction complexe et très contrôlée entre les cellules, la MEC et les cytokines (TGF- β , PDGF) [80], [81]. Elle permet le rapprochement des berges de la plaie et réduit de façon mécanique la perte de substance, facilitant la recolonisation cellulaire et contribuant à la restauration plus rapide de la fonction barrière.

1.3.a.ii.2 La ré-épithélialisation

La reformation de la couche épidermique est essentielle pour la cicatrisation, la restauration de la fonction barrière et pour éviter la dessiccation de la peau. Elle débute au 3^{ème} jour qui suit la blessure, après la mise en place d'une matrice provisoire, et dure environ deux semaines [60], [65]. La principale source cellulaire qui va permettre la recolonisation se situe au niveau de l'épithélium des berges de la plaie et des annexes de la peau, situées autour de la zone lésée. Ces cellules sont attirées par les facteurs de croissance libérés par les cellules inflammatoires et les plaquettes (TGF- β , PDGF etc.) pendant la phase inflammatoire [58].

Les cellules épidermiques des berges de la plaie, présentent un phénotype altéré qui se traduit notamment par une dissolution des hémidesmosomes qui les lient à la membrane basale [6], [82] et par une suppression des jonctions intercellulaires. Ces cellules sont alors capables de migrer au travers ou en dessous de la matrice réarrangée par les fibroblastes, notamment via la fibronectine [29], [30]. En effet, les cellules cutanées expriment à leur surface des intégrines leur permettant d'interagir et de migrer sur les composants de la MEC (fibronectine, collagènes I et IV, thrombospondine) [6].

La migration des cellules nécessite la dégradation de la matrice. Cette dégradation dépend aussi bien de la production de collagénases par les cellules épidermiques [83], que de l'activateur de plasminogène (plasminogen activator) produit par ces mêmes cellules [84]. Ce dernier, active aussi des collagénases (métalloprotéinase 1) [85] ce qui facilite la dégradation des protéines matricielles.

Lorsque la plaie est refermée par une monocouche de kératinocytes, ceux-ci arrêtent leur migration, se multiplient et se différencient [59]. La JDE se reforme par sécrétion des protéines constitutives de la membrane basale (dont la fibronectine cellulaire, tenascine C, laminine) et par les cellules dermo-épidermiques. Elles apparaissent de façon séquentielle par rapport à leur migration : des berges vers le centre de la plaie [30]. Les kératinocytes retrouvent alors leur phénotype cutané normal ainsi que leurs fonctions et sont de nouveau attachés à la membrane basale [74]. Une fois la phase de ré-épithélialisation terminée, l'épiderme néoformé sera colonisé par les cellules de Langerhans et les mélanocytes.

I.3.a.ii.3 Néo-angiogénèse

La formation de nouveaux vaisseaux sanguins est essentielle pour apporter de l'oxygène et des nutriments au tissu granuleux en formation. La néo-angiogénèse est un processus complexe qui repose sur la migration et l'activation mitogénique des cellules endothéliales pour former des capillaires [86]. Ces cellules migrent à partir des vaisseaux sanguins les plus proches, sous la dépendance de plusieurs facteurs de croissance synthétisés par les fibroblastes, les macrophages et les cellules endothéliales (TGF- β , bFGF, VEGF etc.) au contact des composants de la MEC provisoire [60]. Cette migration est également stimulée par l'hypoxie tissulaire de la plaie et facilitée par les protéases qui dégradent la MEC [6], [87]. L'angiogénèse aboutit à la formation d'un réseau vasculaire immature (bourgeon charnu).

I.3.a.iii) Phase de remodelage

La phase de remodelage correspond à une maturation de la MEC (Figure 10). C'est un processus dynamique qui débute dès la fermeture de la plaie et se poursuit durant plusieurs années. Il s'agit de la plus longue phase de la cicatrisation. Le remodelage matriciel repose sur l'équilibre entre la dégradation, la production et la maturation (réticulation, clivage etc.) des éléments de la nouvelle MEC. De nombreux facteurs, tels que les métalloprotéases, leurs inhibiteurs, les protéases synthétisées par les fibroblastes, les polynucléaires et les macrophages, interviennent dans le remodelage matriciel [88].

La MEC du tissu de granulation secrétée par les fibroblastes est remodelée et s'accompagne d'une augmentation de la densité et de la résistance aux forces de traction [65]. Le processus de maturation du tissu de granulation comprend la réduction de la quantité des capillaires par agrégation en plus gros vaisseaux sanguins. La teneur en glycosaminoglycanes, protéoglycanes et en eau liée diminue également [62].

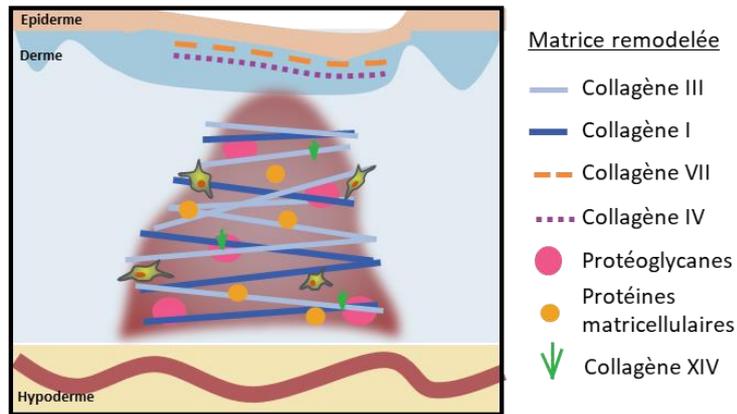


Figure 10 : Phase de remodelage (adapté de Sun *et al*, [61] et Tracy *et al*, [34])

La densité cellulaire et l'activité métabolique du tissu sont également réduites [89], [90]. La répartition en collagène est modifiée : la teneur totale en collagène augmente, la proportion est modifiée en faveur du type I. Le collagène se réorganise en une structure plus réticulée et donc plus dense, ce qui entraîne une augmentation de la résistance à la traction du tissu [53]. Les protéoglycannes et protéines matricellulaires (tenascine X) influencent l'orientation et la taille des fibrilles de collagènes formées [68].

La survenue d'une complication dans l'une des étapes de ce processus complexe qu'est la cicatrisation peut aboutir à un retard de cicatrisation et à l'évolution vers une plaie chronique ou à une cicatrice pathologique (excessive ou anormale).

1.3.b) Les types de cicatrisation

Dans des conditions physiologiques normales, l'épiderme est en renouvellement perpétuel. Ainsi, lorsque les couches supérieures de l'épiderme sont lésées à la suite d'un traumatisme léger, les cellules épidermiques basales prolifèrent de manière accélérée pour régénérer la portion détruite. Dans le cas de lésions plus profondes, où la majorité voire la totalité de l'épiderme et du derme sont lésés, la cicatrisation se déroule selon les phases décrites précédemment (voir §1.3.a). En fonction de leur profondeur (voir Tableau 3), les plaies peuvent cicatriser suivant trois processus [20] :

- Cicatrisation primaire : regroupe les plaies de classe I et II, dont l'épiderme et/ou le derme sont partiellement affectés avec une perte de substance minime, et dont les berges peuvent être refermées (sutures, agrafes etc.).
- Cicatrisation secondaire : concerne les plaies plus profondes de stade II et III guérissant par formation de tissu de granulation, contraction et épithélialisation. Des soins doivent être appliqués pour prévenir les infections et encourager la formation du tissu de granulation.

- Cicatrisation tertiaire : les plaies de stade IV subissent un retard à la fermeture primaire ou secondaire. Le mécanisme physiologique de cicatrisation est anormalement long, voire bloqué dans une de ses phases.

1.3.c) L'altération de la cicatrisation

Les blessures qui présentent des difficultés à cicatriser (cicatrisation tertiaire) regroupent les plaies étendues et profondes (de type III et IV), comme les brûlures et les plaies chroniques. La cicatrisation est alors lente voire inachevée. La fonction barrière n'est pas restaurée et les plaies sont exposées à des risques de complications telles que des infections sévères avec une détérioration de la plaie. Cela peut entraîner une diminution de la mobilité des membres endommagés, des amputations voire le décès des personnes atteintes.

Lorsque qu'une plaie ne suit pas le processus normal de cicatrisation [91] et échoue à reproduire l'intégrité anatomique et fonctionnelle physiologique de la peau, celle-ci devient alors une plaie dite chronique [92]. Ces plaies sont caractérisées par une reconstruction de la MEC défectueuse, un échec de la ré-épithélialisation et une inflammation prolongée [44].

Dans le cas des plaies chroniques, l'épiderme n'arrive pas à migrer sur la plaie et une hyperprolifération cellulaire apparaît au niveau des berges qui interfère avec la migration cellulaire normale [93]. Les molécules de la MEC (fibronectine et la thrombospondine) sont en surexpression, résultat d'un dysfonctionnement et d'une dérégulation cellulaires dans la plaie [94]. Par ailleurs, le fluide présent au sein de la plaie est biochimiquement distinct de celui d'une plaie aiguë. Il ralentit, voire bloque la prolifération cellulaire au détriment de la cicatrisation. Ce liquide a un taux élevé de cytokines inflammatoires et un taux plus faible en facteurs de croissance (PDGF, IL-6, TGF- α et TGF- β) [95]. Il est également plus riche en métalloprotéases et sérine protéases, conduisant à une rupture ou à une altération de la MEC provisoire, essentielle pour la ré-épithélialisation, ce qui favorise alors l'échec de la fermeture de la plaie [93].

Cette anomalie de la cicatrisation peut être la conséquence de facteurs locaux ou systémiques [7]. Les facteurs locaux représentent l'hypoxie et la présence d'agents infectieux au niveau de la plaie. Les facteurs systémiques concernent la santé générale du patient et affectent son habilité à guérir. C'est notamment le cas en présence de pathologies évolutives (diabète) et de comorbidités préexistantes (obésité, tabagisme, alcool). Tous ces facteurs peuvent alors avoir des effets régionaux et perturber ainsi le processus de cicatrisation [7].

Il est important d'identifier la gravité de ces lésions et les facteurs aggravants car cela conditionne la prise en charge, les traitements, et des soins plus appropriés et plus adaptés sont requis pour une guérison optimale.

I.4) Stratégies thérapeutiques

Aujourd'hui, le traitement des plaies par comblement de perte de substance repose sur l'application d'agents topiques, de pansements, de substituts cutanés et de greffes (Figure 11) :

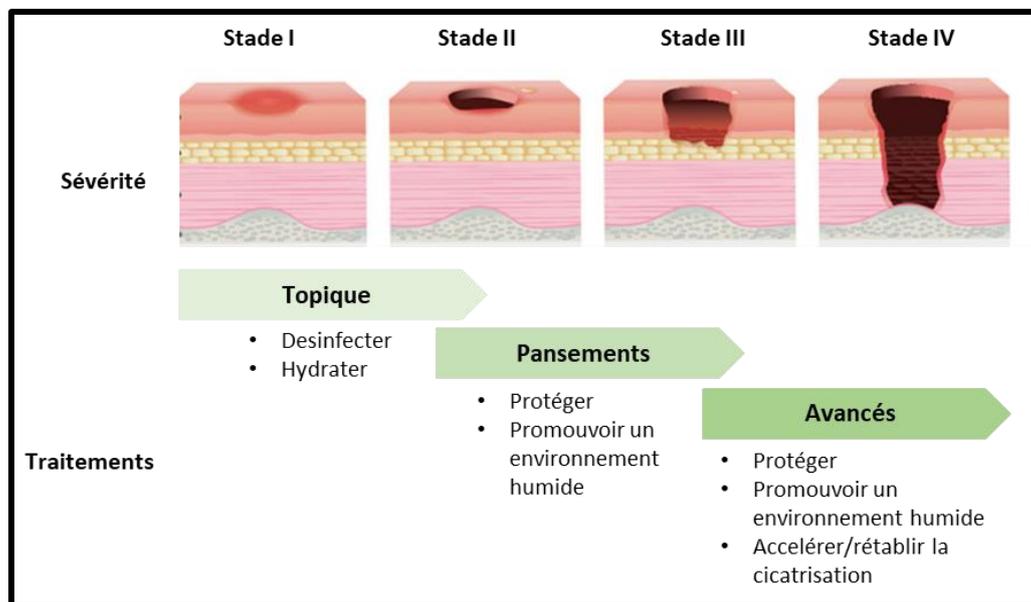


Figure 11 : Prise en charge en fonction de la sévérité de la plaie (adapté de [96], [97])

I.4.a) Formulations topiques

Les formulations topiques recouvrent un large panel de produits comprenant des solutions, des émulsions, des pommades ou des crèmes à base de solution saline stérile, de solutions de povidone-iodé, etc. [98]. Ces produits sont très utilisés pour la préparation du lit de la plaie tel que le débridement, l'hydratation pour éviter la macération et la désinfection. Du fait de leur forme galénique (liquide ou semi-solide), le temps de contact avec la plaie est réduit et le produit peut perdre en propriétés. Ces applications sont de très courte durée et à renouveler très fréquemment.

I.4.b) Pansements

Pour s'affranchir des problèmes rencontrés avec les agents topiques, des pansements sont très utilisés dans le traitement de plaies plus profondes (stade II et plus). Ils peuvent se présenter sous différentes formes physiques (Tableau 4) [99]. Leurs propriétés d'hydratation permettent d'apporter un environnement favorable à la cicatrisation. Ces pansements permettent d'une part, de restaurer la fonction barrière avec l'environnement extérieur et d'autre part, de réguler l'exsudat afin de

minimiser l'effet délétère des facteurs biochimiques, tout en évitant de provoquer une macération des tissus due à une humidité excessive [93]. Le choix du pansement repose sur un équilibre entre l'hydratation nécessaire de la plaie et l'absorption de l'excès d'exsudat afin d'être adapté à l'évolution de la plaie [100]. Ces pansements sont considérés comme un moyen complémentaire d'offrir un milieu de guérison local optimal, favorable à la cicatrisation.

Tableau 4 : Composition des pansements et application selon leurs propriétés [90]

Type	Description	Propriétés	Indications
Film	Polyuréthane perméable, adhésif, fin et transparent	Propriétés de débridement autolytique, imperméable aux liquides et bactéries	Plaies superficielle (I et II) avec exsudat limité
Mousse	À base de polyuréthane ou de silicone	Semi-perméabilité, isolation thermique et activité antimicrobienne	Plaies infectées
Alginate	Polysaccharides dérivés des algues brunes	Excellentes propriétés d'absorption de l'exsudat, homéostasie	Plaies infectées et non infectées avec une large quantité d'exsudat
Hydrocolloïde	Polymère hydrophiles et liés à un support adhésif et occlusif	Excellentes propriétés d'absorption de l'exsudat	Plaies exsudatives sévères
Hydrogel	Réseau tridimensionnel de polymères hydrophiles	Hydratation, élimination de tissu nécrotique	Ulcères de pression, plaies chirurgicales, brûlures, dermatite de rayonnement

Bien qu'il existe un large panel de produits pour la prise en charge des plaies, leurs activités sont restreintes à la désinfection, la protection et l'hydratation de la plaie. Il n'y a pas de données qui démontrent une action directe sur la cicatrisation [96], [101]. Les plaies chroniques nécessitent des traitements plus actifs pour améliorer ce processus.

1.4.c) Pansements actifs

Une des stratégies développées consiste à rendre les pansements bioactifs pour rétablir le processus normal de cicatrisation. En effet, de nombreux facteurs sont impliqués dans la cicatrisation, dont l'absence ou la surexpression peuvent conduire à une évolution en plaie chronique. Les composés incorporés dans les pansements sont destinés à être délivrés dans les plaies, de manière prolongée par rapport aux agents topiques. Ils peuvent être des médiateurs spécifiques d'une phase de la cicatrisation, des agents visant à éliminer l'infection et résoudre l'inflammation, ou des molécules thérapeutiques [102].

1.4.d) Substituts cutanés

Dans le cas de perte de substances très profondes, étendues et/ou chroniques, des substituts cutanés ont été développés dans le but de restaurer et accélérer le processus de cicatrisation. Ces produits sont des biomatériaux issus de l'ingénierie tissulaire, utilisés pour apporter une structure tridimensionnelle, avec ou sans cellules, afin de servir de matrice provisoire pour la migration et la

prolifération cellulaire. Ils se placent directement au contact du lit de la plaie où ils interagissent avec les tissus environnants pour stimuler la migration cellulaire, l'angiogenèse et l'épithélialisation [103].

I.4.e) Greffes

Les greffes de peau constituent le traitement de référence des pertes tissulaires importantes et étendues, notamment dans le cas des brûlures. Elles peuvent être de différentes origines :

- (1) Autologues, c'est-à-dire qu'une zone de peau saine est excisée et greffée sur l'aire endommagée d'un même individu.
- (2) Allogéniques, ce qui implique que le greffon provient d'un autre individu que le receveur
- (3) Xénogéniques, provenant d'une autre espèce.

Ces deux derniers types de greffe présentent des risques importants de rejets par le patient et des problèmes de fonctionnalité. Un autre problème majeur demeure la disponibilité de ces tissus et les risques d'altération de la structure par les traitements des peaux non autologues.

I.5) Conclusion sur la peau et la cicatrisation

Les blessures et traumatismes du tissu cutané peuvent conduire à des dommages, pouvant être aggravés par différents facteurs et conduire à une dégénération tissulaire nécessitant alors des traitements pour en faciliter la réparation. Bien que de nombreux traitements existent, ils possèdent encore de nombreuses limitations. C'est en réponse à ce besoin de fournir de nouvelles alternatives que des stratégies thérapeutiques innovantes ont émergé, notamment avec la science des biomatériaux.

II] Les biomatériaux pour la régénération cutanée

L'un des défis majeurs dans le domaine de la médecine régénérative est de favoriser la régénération tissulaire du corps humain en stimulant/renforçant sa capacité naturelle à se réparer après une blessure ou une maladie. De nouveaux outils thérapeutiques sont apparus pour améliorer la réparation tissulaire physiologique. Une des stratégies existantes repose sur la mise au point et l'utilisation de supports tridimensionnels analogues de la MEC que sont les biomatériaux.

II.1) Les biomatériaux

II.1.a) Définition

Les biomatériaux recouvrent plusieurs domaines d'application biomédicale allant des outils diagnostiques à l'ingénierie tissulaire (Figure 12). Ils représentent l'une des trois spécialités qui composent l'ingénierie tissulaire avec la thérapie cellulaire et la signalisation. Ces différents domaines peuvent être utilisés seuls ou en association les uns avec les autres [104].

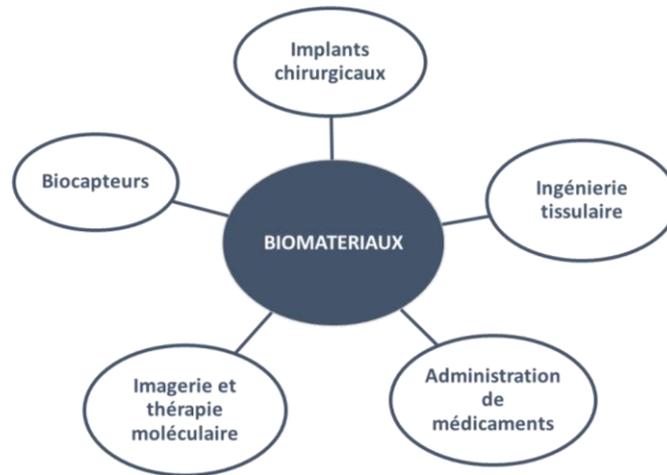


Figure 12 : Domaines d'application médicaux des biomatériaux [105]

Une première définition établie en 1986 par la Société Européenne des Biomateriaux décrivait les biomatériaux comme étant un « matériau non-vivant utilisé dans un dispositif médical et conçu pour interagir avec des systèmes biologiques » [106]. Elle a par la suite été étoffée en « toute substance ou combinaison de substances, autre que des médicaments, d'origine synthétique ou naturelle, pouvant être utilisée pour toute période de temps, pour remplacer partiellement ou totalement n'importe quel tissu, organe ou fonction du corps endommagé, dans le but de maintenir et d'améliorer la qualité de vie d'un individu » [107]. Cette définition étend l'objectif à des matériaux qui peuvent interagir avec les éléments tissulaires de manière appropriée, et non plus inerte, et biorésorbables [108]. Depuis quelques années, les biomatériaux visent non seulement à être bioactifs, intégrés et résorbés par l'environnement de l'hôte, mais cherchent aussi à fournir une réponse cellulaire au niveau moléculaire dans le but de régénérer un tissu fonctionnel [109]. Cela intègre les domaines les plus innovants de la médecine régénérative incluant les produits issus de l'ingénierie tissulaire et les organes artificiels hybrides dans lesquels des cellules vivantes peuvent être utilisées en association avec les matériaux. Dans ces travaux, l'attention s'est portée essentiellement sur l'utilisation de matrices poreuses tridimensionnelles.

II.1.b) Supports 3D

Un concept clé dans l'ingénierie des biomatériaux est de fournir un microenvironnement qui reproduise au mieux les paramètres structuraux nécessaires à la réparation tissulaire physiologique. En effet, les cellules isolées présentent une capacité limitée à reproduire l'architecture du tissu endommagé en raison de l'absence de matrice pour les guider lors de la reconstruction. C'est le cas lorsque les plaies sont trop étendues et trop sévères. Les cellules cutanées impliquées dans le

mécanisme de réparation tissulaire n'arrivent alors ni à migrer, ni à proliférer pour réparer la zone lésée. Le support tridimensionnel joue alors un rôle « d'échafaudage » pour la réparation tissulaire. Ces matériaux, apportent ainsi un support physique et un microenvironnement local qui mime la MEC provisoire [110] dans la zone de la plaie afin de faciliter l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaire [111].

Les matériaux doivent alors offrir une surface favorisant l'adhésion cellulaire, être mécaniquement stables pour supporter la migration cellulaire, permettre les échanges de nutriments et de gaz, être biodégradables pour laisser la place au tissu en formation et être biocompatibles [112]–[114]. Les caractéristiques physico-chimiques de ces matrices peuvent être modulées pour adapter au mieux les propriétés nécessaires en fonction du tissu visé [111].

II.1.b.i) Porosité

L'architecture des matrices utilisées pour l'ingénierie tissulaire constitue une caractéristique primordiale à prendre en considération lors de leur fabrication. Il est en général requis d'intégrer une structure très poreuse et interconnectée inspirée de la MEC naturelle [115] (Figure 13). Ceci permet d'assurer le transport de composés à travers la matrice [116] : cellules, solutés, facteurs de croissance, déchets et gaz [111]. Ce transport est corrélé à la composition chimique (charge, affinité) et aux paramètres structuraux qu'offrent la matrice. De ce fait, l'interconnexion et la taille des pores ont été reconnues comme des paramètres majeurs dans la conception des supports cellulaires [117]. Le volume et les caractéristiques spatiales des pores doivent ainsi être suffisants pour offrir aux cellules la possibilité d'occuper ces espaces vides dans le but de faciliter la colonisation cellulaire.

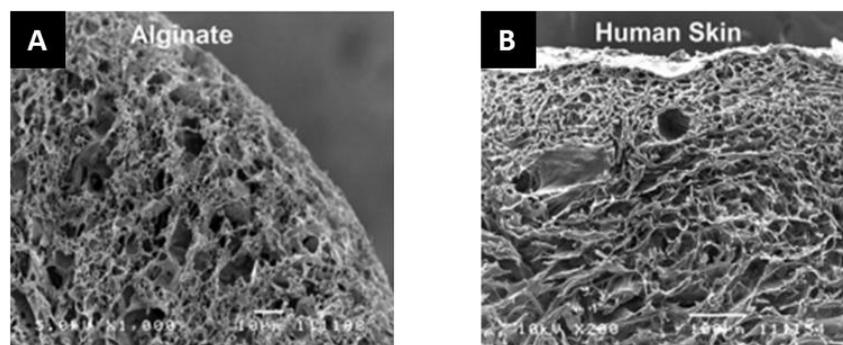


Figure 13 : Microscopie électronique à balayage des architectures internes de matrices poreuses à base d'alginate (A) et de peau humaine décellularisée (B) [112].

La taille des pores, la porosité (fraction poreuse dans le matériau), l'interconnectivité/tortuosité et le volume des pores fournissent le caractère tridimensionnel du

support dans lequel cellules et nutriments peuvent circuler. La porosité peut être mesurée par de nombreux équipements et logiciels utilisant la densité du matériau, la méthode d'intrusion de fluide couplées à des techniques d'imagerie (microscopie électronique à balayage, tomographie informatisée) [112]. Le choix de la taille des pores se fait en fonction du type cellulaire et du tissu impliqués dans la réparation. Dans le cas de la cicatrisation cutanée, la taille déterminée pour la régénération d'une peau de mammifère adulte (cochon d'inde) est comprise entre 20 et 125µm [114].

II.1.b.ii) Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques de la MEC impactent les fonctions macroscopiques des tissus et permettent également de réguler le comportement cellulaire par des signaux de mécano transduction [111]. Lors de la conception des supports 3D, des propriétés mécaniques proches de celles du tissu natif étudié sont souvent recherchées. Ces matériaux doivent fournir un microenvironnement propice à la synthèse et à l'organisation *de novo* de MEC, par les cellules de l'hôte ouensemencées. En plus de ces considérations, ils doivent être facilement manipulables pour l'implantation et capables de supporter temporairement les charges et contraintes du tissu en formation.

Les propriétés mécaniques des matériaux sont déterminées par la nature et la concentration des polymères utilisés, la méthode de réticulation (physique ou chimique) ainsi que la présence et la taille de pores. Elles doivent fournir une stabilité suffisante aux supports et être adaptées à la contrainte et à l'intégration appliquées par l'environnement.

II.1.b.iii) Dégradabilité

La biodégradabilité peut être définie comme la capacité d'un matériau à être dégradé et éliminé par l'organisme [118]. Ce phénomène peut entraîner des changements physico-chimiques de la matrice impactant sa résistance mécanique et son architecture interne [108]. La biodégradation de biomatériaux comprend la rupture de liens physiques ou chimiques présents dans la structure [114].

Cette propriété est devenue un critère crucial pour le choix des matériaux à utiliser pour la fabrication de ces matrices dans le cadre de l'ingénierie tissulaire. En effet, il est préférable que le matériau se dégrade afin de laisser les cellules endogènes synthétiser la MEC la plus physiologique possible. De plus, cela permet d'une part d'éviter de détériorer le nouveau tissu lors du retrait du dispositif et d'autre part d'obtenir un tissu régénéré exempt de résidus, qui pourraient en modifier la fonctionnalité [119]. Idéalement, cette dégradation doit être contrôlée dans le temps afin d'obtenir une synchronisation entre la dégradation du polymère et la prolifération du tissu en réparation.

Par conséquent, les capacités de dégradation sont une caractéristique primordiale du biomatériau, et déterminent le succès à long terme de la matrice. Un élément important dans la dégradation est d'évaluer la toxicité des produits de dégradation afin de s'assurer de l'innocuité du matériau. Ceci constitue un des points clefs de la biocompatibilité.

II.1.b.iv) Biocompatibilité

La biocompatibilité est définie comme « la capacité d'un biomatériau à effectuer les fonctions souhaitées dans le respect d'une thérapie médicale, sans engendrer d'effet local ou systémique indésirable chez le patient. Il doit générer une réponse cellulaire ou tissulaire bénéfique la plus appropriée à une situation spécifique et optimiser la performance clinique pertinente de la thérapie » [107]. La biocompatibilité se réfère à la capacité de la matrice à agir comme un substrat pour supporter une activité cellulaire tout en facilitant les systèmes de signalisation moléculaire et mécanique [120] impliqués dans le processus de réparation tissulaire.

La chimie et la nature des matériaux utilisés sont des facteurs qui définissent la biocompatibilité des supports d'ingénierie tissulaire [114]. Ils dépendent de la méthode de synthèse des polymères qui composent le matériau, de l'origine des constituants, des procédés de fabrication de la matrice et des conditions de stérilisation.

II.1.c) Classification

Une classification générale permet de répertorier les biomatériaux pour la cicatrisation en fonction de la nature de leurs composés [110], [121]. Ils peuvent être d'origine synthétique ou naturelle. Ils sont présentés succinctement dans le paragraphe suivant et développés au §II.2.c).

II.1.c.i) Synthétiques

Largement utilisés dans les plaies en pansements cicatrisants, les biomatériaux synthétiques sont préparés à partir de polymères hydrophiles ou hydrophobes [114]. Les polymères d'origine synthétique sont aisément contrôlables et reproductibles [122] avec une origine non-biologique qui facilite la production. Leurs caractéristiques sont modulables, et sont fonction de leur masse molaire, de leur structure chimique et de leur mode de réticulation [123]. Ils ne contiennent pas ou peu d'impuretés et sont généralement stables mécaniquement. Cependant, ils sont la plupart du temps inertes avec une faible bioactivité. Les produits issus de leur dégradation peuvent être mal tolérés par l'organisme [33], [124].

II.1.c.ii) Naturels

Les matrices d'origine naturelle peuvent être directement dérivées de tissus biologiques après traitement de décellularisation. Elles conservent ainsi les caractéristiques architecturales et biologiques proches des tissus natifs [125]. La décellularisation permet en effet de préserver la structure et la composition principale de la matrice extracellulaire [126], mais le caractère agressif de la méthode peut induire une perte de diversité protéique et des composants matriciels. La structure et les propriétés mécaniques de la MEC résiduelle peuvent alors être modifiées. Par ailleurs, ces matériaux présentent un inconvénient majeur qui est la faible disponibilité des échantillons.

Les polymères dérivés de matériaux biologiques sont issus d'organismes vivants. Ils peuvent être regroupés en fonction de leur nature : protéique, comme le collagène [127], et polysaccharidique [118], comme le chitosane [128] et les alginates [129]. Nombre d'entre eux sont des composants dérivés de la MEC ou peuvent être des produits par des procédés biotechnologiques. Leur similarité avec la MEC leur confère une bonne tolérance par l'organisme. Ces polymères apportent en effet peu de toxicité, sont facilement assimilables par l'organisme et certains sont dégradables par l'environnement tissulaire [130]. Ils peuvent également comporter une bioactivité intrinsèque [131], c'est-à-dire induire une réponse cellulaire spécifique [108]. Les produits issus de leur dégradation sont généralement bien tolérés par l'organisme cible et provoquent plus rarement des réponses toxiques. Les principaux inconvénients sont la variabilité liée à la source, les risques de contamination microbienne [132] et des propriétés mécaniques généralement plus limitées [133] que pour leurs homologues synthétiques.

La sélection du polymère est essentielle dans la conception et le développement des implants médicaux et des produits issus de l'ingénierie tissulaire. Les hydrogels sont une des formes pouvant être utilisées pour les biomatériaux. Ils ont démontré leur intérêt pour différentes spécialités médicales [134], [135] et plus particulièrement pour la cicatrisation et la régénération cutanée [136].

II.2) Les hydrogels

II.2.a) Définition

Les hydrogels sont formés d'un réseau tridimensionnel de polymères hydrophiles capables d'absorber de très grandes quantités de solvants aqueux, qui représentent plus de 90% de leur masse [115]. Grâce à cette hydratation et leur structure 3D, ils miment les caractéristiques de la MEC avec des propriétés mécaniques adaptées et modulables. Ils peuvent par ailleurs être utilisés à la fois comme support cellulaire et comme moyen d'administration de composés actifs [137], [138].

II.2.b) Contexte d'utilisation

La prise en charge efficace des plaies cutanées repose essentiellement sur l'environnement tissulaire. Pour ce faire, plusieurs critères doivent être idéalement respectés [45], [139] : le maintien d'un environnement humide sur le site de la plaie est essentiel pour prévenir une dessiccation [140], délétère à la cicatrisation [141]. De plus, l'exsudat produit par les plaies participe au débridement de la plaie et à la migration des cellules [95]. Il doit donc pouvoir être absorbé sans assécher les tissus environnants. Les échanges gazeux et de vapeur d'eau ainsi que la diffusion des nutriments doivent être conservés pour éviter la mise en place d'un environnement hypoxique. L'environnement doit également rester exempt de bactéries afin d'éviter toute infection au niveau du site de la plaie. Enfin, la plaie ou les couches cellulaires en formation ne doivent pas subir de traumatisme physique qui risquerait de compromettre leur intégrité.

Les pansements évoqués en (I.4.b) permettent de respecter un ou plusieurs de ces critères, avec des avantages mais aussi des limitations. Les hydrogels présentent toutefois des propriétés favorables au processus de reconstruction tissulaire [142]. Ils sont en effet capables de combler la perte de substance tout en apportant un environnement hydraté et perméable à la diffusion de nutriments, à la migration cellulaire et aux échanges gazeux [143].

Les critères classiques de sélection des hydrogels reposent sur la sécurité, la stabilité et la biocompatibilité du matériau ainsi que sur leur capacité à promouvoir la réparation tissulaire [144]. Le choix des polymères qui les constituent ainsi que la méthode de réticulation impactent ces critères ainsi que les propriétés physico-chimiques qui en découlent.

II.2.c) Polymères

II.2.c.i) Synthétiques

Les hydrogels à base de polymères synthétiques sont préparés à partir de polymères hydrophiles [114]. La présence de groupes fonctionnels polaires tels que carbonyle, carboxyle, ester, amino et/ou amide sur les matrices, augmente la composante polaire de l'énergie libre de la surface, ce qui rend ces dispositifs plus hydrophiles et apporte un environnement humide. Parmi les plus utilisés pour former des biomatériaux dans le cadre de la cicatrisation cutanée on retrouve : les polymères d'acide poly(α -hydroxylés) (P(G/L)A), le poly (éthylène glycol) (PEG), de poly(oxydes d'éthylène) (POE), de polyméthacrylate hydroxy éthyle (PHEMA) et poly(alcool vinylique) (PVA)[135].

Bien que les hydrogels issus de la réticulation de polymères synthétiques possèdent de bonnes propriétés mécaniques, qu'ils soient contrôlables et reproductibles, leur manque de bioactivité et de biodégradabilité par l'organisme constitue une limitation importante dans l'application cutanée.

II.2.c.ii) Protéiques

Les protéines sont les constituants majeurs de la MEC dans l'organisme. Leur nature, leur structure et leur répartition diffèrent en fonction du tissu considéré. En plus de leur rôle dans le maintien de l'intégrité des tissus, les protéines sont impliquées dans l'adhérence, la prolifération et la survie cellulaire [145]. Les protéines utilisées sont le plus souvent d'origine allogénique ou xénogénique ce qui peut conduire à des différences de composition et de structure [146]. Dans certains cas, les protéines peuvent être produites par des microorganismes après modification génétique. Les propriétés des hydrogels d'origine protéique sont très diverses et dépendent de la protéine et du mode de réticulation utilisé.

II.2.c.ii.1 Collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante chez l'Homme et dans la MEC du derme en particulier [118]. Dans le contexte de la conception de biomatériaux, le collagène le plus utilisé est le collagène de type I. Il est composé de trois hélices α avec une répétition des motifs glycines tous les trois résidus d'acides aminés [147]. Selon le type de collagène, les triples hélices du tropocollagène peuvent s'assembler en fibrilles, qui s'associent pour former des fibres (Figure 14). Le collagène peut être extrait de différents tissus animaux : tendons de bovins, peau de porc, poissons ou sources aviaires, et à partir de queues de rat [148]. Ces sources xénogéniques impliquent des variabilités entre les sources et nécessitent des traitements supplémentaires dans la production pour s'assurer de la sécurité des molécules.

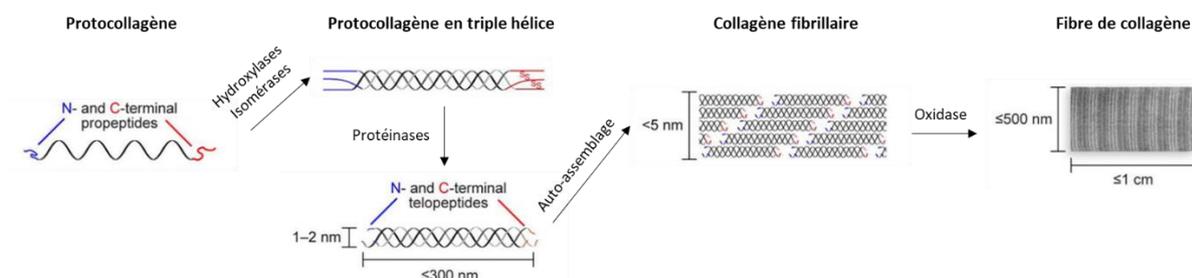


Figure 14 : Organisation structurale du collagène de type I (adapté de Chattopadhyay 2014)

Le collagène de type I apporte une fonction primordiale de soutien mécanique de la MEC pendant la phase de remodelage du processus de cicatrisation. Il permet une migration plus rapide des fibroblastes sur le site lésé [149]. Il présente alors un grand intérêt pour la fabrication de biomatériaux.

Ce collagène est principalement utilisé sous forme d'hydrogel après induction de la fibrillogenèse *in vitro* contrôlée grâce à des variations de pH, de la force ionique, de la température et de sa concentration [150].

II.2.c.ii.2 Gélatine

La gélatine est la forme dénaturée du collagène, dont les triples hélices ont subi un clivage chimique, physique ou enzymatique. La dénaturation est principalement réalisée après traitement acide ou alcalin, donnant, respectivement, la gélatine de type A ou B. Les propriétés mécaniques sont inférieures à celles du collagène. Le réseau physique de gélatine se liquéfiant à 37°C, il nécessite une réticulation ou une utilisation en association. La gélatine conserve cependant les capacités de promotion d'adhésion, de migration et de prolifération cellulaire [33]. Des études menées sur des matrices à base de gélatine formulées en pansements ont montré une amélioration de la formation du tissu de granulation [151].

II.2.c.ii.3 Kératine

La kératine est une protéine que l'on retrouve dans les phanères ainsi que dans l'épiderme [152]. Elle est caractérisée par l'abondance de cystine, entre 1 à 5% [121]. Le soufre et les aminoacides de cette structure peuvent former des liaisons disulfures, ce qui rend la protéine très résistante. L'abondance des ponts disulfures est également responsable de la faible solubilité de la kératine et est associée à un temps de dégradation plus long. La kératine est composée de chaînes qui s'assemblent pour former des filaments [153]. La structure est conservée entre les espèces, ce qui constitue un avantage puisque son immunogénicité est alors réduite. La kératine était extraite à faible coût de tissus animaux et plus récemment à partir de cheveux humains [154]. Elle est maintenant considérée comme un biomatériau très prometteur [155] et notamment pour la cicatrisation [156]. Outre la très bonne biocompatibilité de cette protéine, il a également été démontré qu'elle accélérât l'épithélialisation [157], et favorisait la migration des cellules ainsi que la synthèse de collagène [158].

II.2.c.ii.4 Fibrine

La fibrine est le produit final de la cascade de coagulation sanguine, et est issue de l'hydrolyse enzymatique du fibrinogène par la thrombine. Il s'agit d'une protéine circulant dans le sang, qui peut donc être utilisée facilement de manière autologue [159]. La fibrine forme une matrice, le caillot de fibrine, qui contribue à arrêter le saignement (voir §1.3.a.i) et agit comme support provisoire pour la MEC en formation [160]. Elle est déjà très utilisée dans des produits médicaux, notamment en tant que colle chirurgicale. La fibrine étant un substrat naturel pour les plaquettes, les cellules

endothéliales, les fibroblastes et les macrophages, elle peut stimuler la prolifération cellulaire et l'angiogenèse tout en modulant l'inflammation [161]. Elle regroupe un grand nombre de propriétés physiologiques impliquées dans le processus de cicatrisation des plaies. Les principaux inconvénients de la fibrine sont cependant ses faibles propriétés mécaniques et sa dégradation rapide dans l'organisme [108]. Ces inconvénients sont généralement compensés grâce à l'association avec d'autres polymères.

II.2.c.ii.5 Soie

Cela fait des siècles que les protéines de la soie sont utilisées, comme par exemple pour effectuer des sutures de plaies [162]. Les fibres de soie sont naturellement produites par certains vers (*Bombix Mori*) et araignées. Elles sont principalement composées de fibres de fibroïne enrobées d'une substance collante et hydrophobe, la séricine. La fibroïne est la partie la plus utilisée pour former des biomatériaux grâce à sa grande résistance mécanique [163]. Le procédé de purification nécessite alors l'élimination adéquate de la séricine [164].

La fibroïne est composée de chaînes légères (25 kDa) et lourdes (325 kDa) reliées par des ponts disulfures. La chaîne lourde est responsable des propriétés mécaniques de la fibroïne, grâce à des domaines hydrophobes répétitifs dans sa séquence qui forment des régions cristallines antiparallèles en feuillet β , et des domaines hydrophiles non répétitifs qui contribuent à l'élasticité des fibres [121] (Figure 15). Cependant ces zones cristallines rendent la dégradation plus lente [164] et la séquence en acides aminés [165] peut varier d'une espèce à l'autre entraînant des différences de propriétés chimiques et mécaniques selon la source.

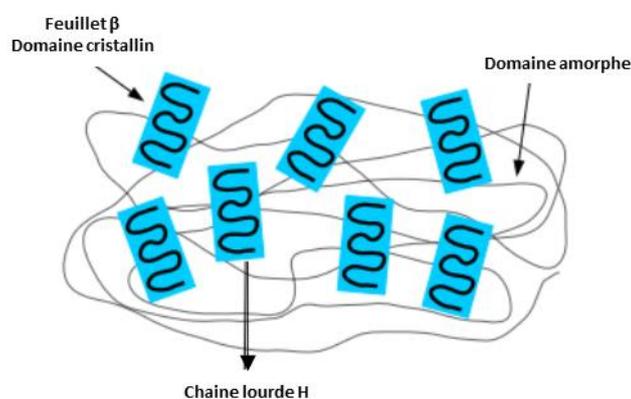


Figure 15 : Structure de la soie (adapté de Jao *et al.* [166])

La fibroïne est de plus en plus étudiée pour une application cutanée [166] car en plus de sa biocompatibilité et de sa biodégradabilité, elle possède des propriétés hémostatiques et stimule la synthèse de collagène par les fibroblastes [167], [168].

II.2.c.iii) Polysaccharides

Les polysaccharides sont les polymères les plus abondants dans la nature. Ils proviennent de sources renouvelables et représentent jusqu'à 75% des matières organiques. Ils peuvent être dérivés de sources végétales, animales ou de microorganismes. Leur origine peut cependant impacter leur structure, leur biodisponibilité et le procédé d'extraction du polymère. En général, l'extraction de polysaccharides à partir de plantes est peu coûteuse mais peut comporter des impuretés, tandis que la production par des souches bactériennes ont un meilleur niveau de pureté [121].

D'un point de vue chimique, les polysaccharides sont des polymères composés de répétition d'unités saccharidiques d'un seul (homopolysaccharides) ou plusieurs types (hétéropolysaccharides), liées linéairement ou ramifiées, pouvant conduire à des poids moléculaires élevés. Les différentes combinaisons de liaisons O-glycosidiques, de ramifications, de poids moléculaires ainsi que la nature des monomères confèrent aux polysaccharides une très grande variété de propriétés physico-chimiques. Ces propriétés regroupent le caractère hydrophile, la solubilité dans l'eau, l'activité biologique, la biocompatibilité et les propriétés de dégradation des polysaccharides. Toutes ces propriétés peuvent être modulées par modifications chimiques [169] grâce aux groupements hydroxyles, carboxyles et amines disponibles [132].

II.2.c.iii.1 Cellulose et dérivés

La cellulose est l'une des molécules les plus abondantes dans la nature car elle est le principal composant des parois cellulaires des plantes, des algues, des champignons ; elle peut être également issue de source bactérienne. Ce polymère est composé de chaînes d'unités D-glucose liées en β - (1,4) (Figure 16) qui s'agrègent pour former des fibrilles, induisant une structure hautement cristalline. Les structures formées sont généralement insolubles dans l'eau mais sont très hydrophiles.

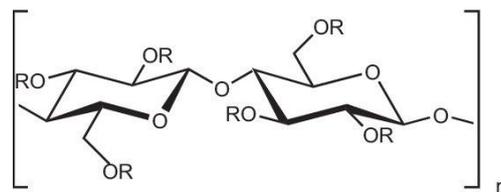


Figure 16 : Structure chimique de la cellulose

La cellulose bactérienne présente une meilleure pureté, est plus biocompatible et moins toxique que la cellulose d'origine végétale [170]. Les deux types de cellulose possèdent de nombreuses zones cristallines responsables de la rigidité du polymère [132]. La carboxyméthylcellulose (CMC) est l'un des dérivés semi-synthétique les plus courants de la cellulose. Le polymère est modifié chimiquement

par addition de groupes carboxyméthyles ce qui a permis, entre autres, d'améliorer la solubilité du polymère. La CMC est notamment utilisée pour la fabrication de pansements hydrocolloïdes. Elle favorise la cicatrisation des plaies par absorption des fluides présents sur le site, et contrôle les infections microbiennes [171], [172].

II.2.c.iii.2 Pullulane

Le pullulane est un exopolysaccharide produit par le champignon de type levure *Aureobasidium pullulans*. Il s'agit d'un polysaccharide non ionique composé de trois monomères α - (1,6) maltotriose, unités liées linéairement par des liaisons α - (1,4) glycosidiques (Figure 17).

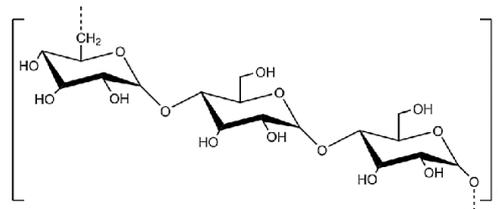


Figure 17 : Structure chimique du pullulane

Le pullulane est hautement soluble et hydrophile, non toxique, non immunogène et facilement éliminé par l'organisme [173]. Il peut être dérivé sous plusieurs formes par substitution des groupements hydroxyles afin de modifier ses propriétés [174]. Le pullulane et ses dérivés sont très utilisés dans des applications biomédicales notamment pour l'imagerie, l'ingénierie tissulaire, les vaccins et le revêtement de capsules de médicaments [175], [176]. Par ailleurs, il aurait la capacité d'augmenter la synthèse de collagène et la contraction des plaies [177]. Ses principaux inconvénients sont l'absence de propriétés antimicrobiennes et une faible capacité à soutenir l'adhésion cellulaire. Pour ces raisons, il est principalement utilisé en association avec d'autres polymères.

II.2.c.iii.3 Dextrane

Le dextrane est un homopolysaccharide formé par un enchainement de motifs « D-glucose » reliés par des liaisons glycosidiques α -(1,6) (Figure 18). Il est synthétisé par des bactéries à partir de sucres (sucrose ou maltodextrine). Il est non toxique, biocompatible et biodégradable par des enzymes spécifiques, les dextranases, présentes dans la salive et le tractus gastrointestinal chez l'homme [179]. Ses produits de dégradation par les enzymes sont des unités glucosidiques et non toxiques. Il peut subir des modifications chimiques pour introduire par exemple des groupes aldéhydes, méthacrylates ou thiol phénol [180].

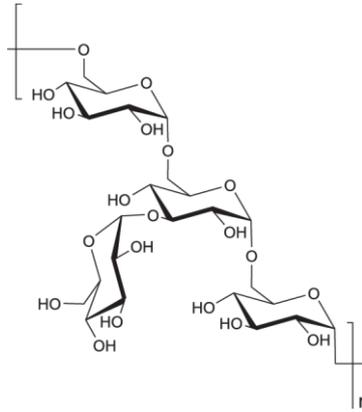


Figure 18 : Structure chimique du dextrane

Grâce à ses propriétés hydrophiles et sa biocompatibilité, ce polysaccharide a suscité un intérêt croissant dans les domaines pharmaceutiques et des biomatériaux. Le dextrane est en effet utilisé comme expansateur du volume plasmatique, dans les solutions ophtalmiques, pour préserver les tissus avant greffes et comme revêtement pour améliorer la biocompatibilité des biomatériaux [181]. Il est également capable de diminuer la thrombose vasculaire, de réduire la réponse inflammatoire et l'excès d'activation plaquettaire [178]. Enfin, dans des travaux de recherche, le dextrane, formulé en hydrogel, a permis d'améliorer la réponse angiogénique et de promouvoir la régénération dans le contexte de brûlures [182]. Un inconvénient pour une très large diffusion est son coût.

II.2.c.iii.4 Chitosane

Le chitosane est un polysaccharide composé de β -(1,4)glucosamine et de N acétyl-D glucosamine (Figure 19). Il est le résultat de la desacétylisation partielle ou totale de la chitine [133], polysaccharide naturel le plus abondant après la cellulose [180]. Il est présent dans la carapace des crustacés, des insectes ainsi que dans les champignons [183]. Il possède à la fois des groupements acétyles et amines. Les amines libres peuvent se protoner dans des conditions acides, améliorant sa solubilité dans l'eau.

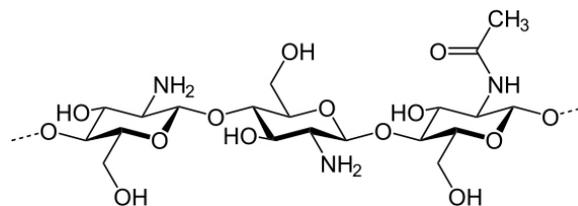


Figure 19 : Structure chimique du chitosane

Le chitosane possède des caractéristiques similaires à celles des glycosaminoglycane (GAG), naturellement présents dans la MEC [184] et est dégradé par les lysozymes. Il possède des propriétés

hémostatiques, pro-inflammatoires, antibactériennes [185]–[187] et permettrait d'améliorer la formation du tissu de granulation [188]. Cependant son utilisation reste limitée par sa faible solubilité à pH physiologique liée à la perte de sa nature cationique [189]. Il est alors souvent utilisé en association avec d'autres polymères dans le but de renforcer les propriétés biologiques des matériaux grâce à sa bioactivité [190].

II.2.c.iii.5 Alginate

L'alginate est un polysaccharide dérivé des algues brunes, dont la structure varie en fonction de l'espèce. Il est composé d'unités acide β -D mannuronique et acide α -L guluronique, associés en « blocks » dont la répartition dépend de l'origine [133] (Figure 20). Les interactions des unités glucuroniques avec des ions bivalents (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} ou Co^{2+}) permettent d'obtenir un gel [121].

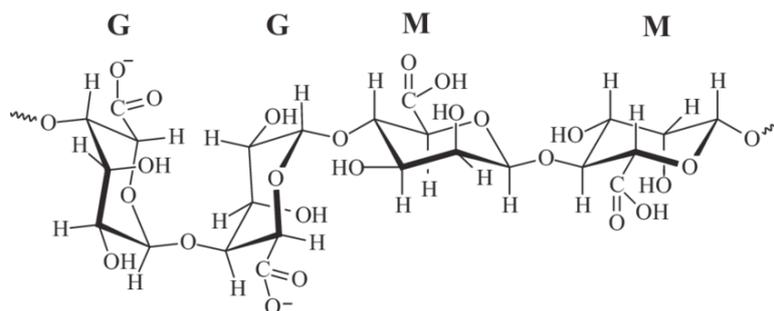


Figure 20 : Exemple de structure chimique de l'alginate avec (G) acide glucuronique et (M) acide mannuronique

L'alginate est un matériau très polyvalent pour la cicatrisation des plaies et peut être préparé sous forme d'hydrogels, de films et d'éponges [191]. Il est utilisé en tant que pansement pour les plaies très exsudatives [192] du fait de ses grandes capacités de gonflement [193]. Il présente des propriétés mécaniques ajustables en fonction du pH et des ions, particulièrement intéressantes pour la libération de molécules [194]. Il aurait par ailleurs démontré des capacités antivirales par ses charges anioniques, une efficacité hémostatique, antioxydante et antiinflammatoire [195]. Cependant, ce polymère d'origine naturelle n'est pas dégradé chez les mammifères en raison de l'absence de son enzyme spécifique « l'alginate » [195]. Les propriétés mécaniques de l'hydrogel, formé par des interactions ioniques, sont également peu stables dans l'organisme du fait de la présence de nombreux chélateurs.

II.2.c.iii.6 Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (HA) est un glycosaminoglycane non sulfaté composé alternativement d'acide D-Glucuronique et d'acide D-n-acetylglucosamine (Figure 21) liés ensemble alternativement

par des liaisons glycosidiques β -1,4 et β -1,3 [133]. L'acide hyaluronique est classiquement extrait de sources animales (bovine ou isolé de la crête du coq). Par ailleurs les méthodes d'extraction employées peuvent être délétères pour le poids moléculaire de la molécule finale, dont dépend son activité. Il existe aujourd'hui des souches bactériennes recombinantes de *Bacillus spp.*, *Agrobacterium spp.*, *Lactococcus lactis* et *E. coli* capables de le synthétiser, palliant ainsi les limitations évoquées précédemment [181].

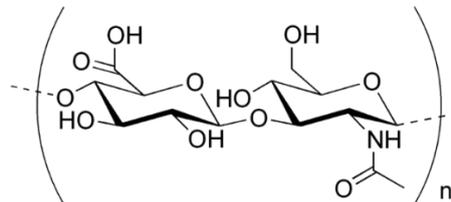


Figure 21 : Structure chimique de l'acide hyaluronique avec acide D Glucuronique à gauche et l'acide D-N acétylglucosamine à droite

L'acide hyaluronique est l'un des composants de la matrice extracellulaire des tissus conjonctifs et est biodégradable par l'organisme. Il possède de nombreux rôles physiologiques tels que l'hydratation tissulaire grâce à ses charges négatives, la stimulation de la migration et de la prolifération des kératinocytes [33] et des fibroblastes [196] ainsi que l'interaction avec d'autres composants matriciels. Il est également capable de réguler l'inflammation, en fonction de sa taille [197], [198] et aurait des propriétés bactériostatiques [199].

II.2.c.iii.7 Polysaccharides sulfatés

Avec l'acide hyaluronique, les polysaccharides sulfatés sont des composants de la MEC et des tissus conjonctifs [200]. La chondroïtine sulfate, le dermatane sulfate, l'héparane sulfate, l'héparine et le kératane sulfate partagent des similitudes structurelles (Figure 22) : ils sont tous acides, chargés négativement et sont identifiés comme des GAGs.

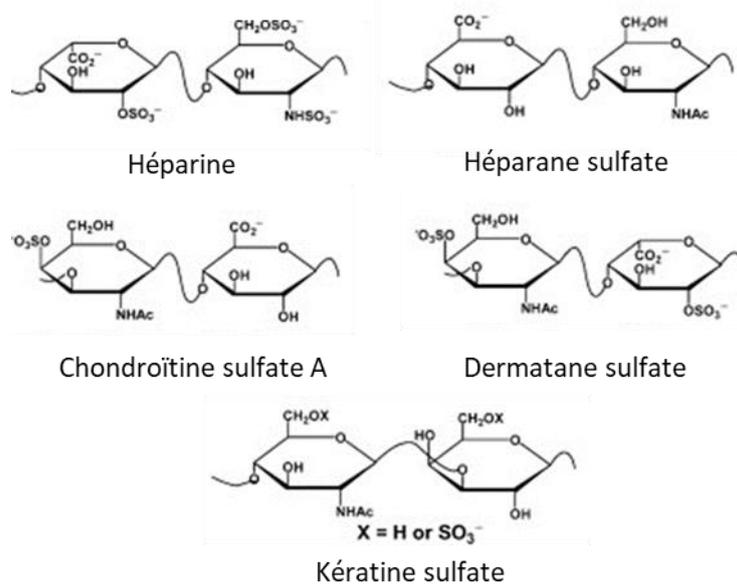


Figure 22 : Exemples de structure chimique des GAGs (Modifié de Zhang et al. 2010)

Dans le cadre des biomatériaux, les polysaccharides sulfatés se trouvent généralement associés à des protéines ou à d'autres polysaccharides. Ils possèdent plusieurs activités intrinsèques : résistance à la compression des tissus, stimulation de la migration cellulaire, effet anti-inflammatoire, anti-thrombogénique et pro-angiogénique [121]. Tous les GAGs sont impliqués dans le processus de cicatrisation cutanée [201] en fournissant une hydratation et un support structural favorisant ainsi la migration cellulaire.

II.2.c.iv) Hybride

Il est possible d'associer différents types de polymères dans le but d'améliorer les propriétés des biomatériaux. En fonction des stratégies sélectionnées, il est possible de simplement additionner les propriétés des polymères ou permettre d'obtenir une véritable synergie amenant à l'émergence de nouvelles caractéristiques. Les associations peuvent se faire exclusivement entre polymères naturels ou synthétiques, mais également de manière mixte, entre un polymère naturel et synthétique. Par exemple, la combinaison du collagène avec d'autres composants naturels comme la soie a été décrite comme permettant de conserver les propriétés biologiques de la protéine tout en améliorant les propriétés mécaniques du substitut [202].

Bien que les polymères synthétiques confèrent de très bonnes propriétés mécaniques aux matériaux et que des approches ont été proposées pour améliorer leur bioactivité et leur dégradabilité [203], les polymères d'origine naturelle restent privilégiés pour des applications biomédicales [204] [205], de par leur polyvalence, leur biocompatibilité et leurs propriétés biologiques [130], [131], [206].

L'association de biopolymères pour former des hydrogels a par ailleurs permis d'améliorer les propriétés mécaniques, notamment avec les GAG, la fibrine ou le chitosane [207], [208], et de les rendre plus stables [209].

Les caractéristiques physico-chimiques des hydrogels peuvent être adaptées pour maximiser les réponses cellulaires et tissulaires [111]. Elles sont directement liées à la structure de leur réseau, qui dépend du type de liaisons mises en jeu et de la méthode de préparation. En effet, les polymères peuvent être réticulés entre eux suivant différents procédés et former un hydrogel réticulé.

II.2.d) Réticulation

Les hydrogels sont constitués de groupes de polymères assemblés en un réseau tridimensionnel stable par un processus de réticulation. La présence de points de réticulation dans le réseau permet le maintien de cette structure 3D des hydrogels dans leur état hydraté. La densité de réticulation est caractérisée par le poids moléculaire entre deux points de réticulation (M_c) [210] (Figure 23). Ces liens conduisent à la formation d'espaces entre les différentes chaînes de polymères, appelés mailles (ξ) (Figure 23). Le taux de réticulation conditionne la taille des mailles (ξ) dont découlent les propriétés élastiques et la capacité de gonflement du matériau en milieu aqueux.

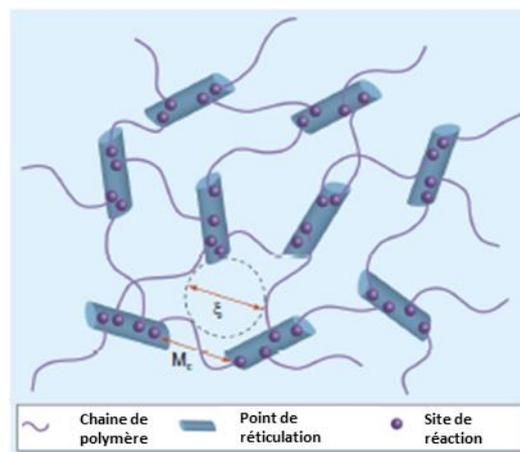


Figure 23 : Représentation schématique d'un hydrogel hydrophile réticulé (adapté de Zhu *et al.* [33])

Pour former ces hydrogels à partir d'un ou plusieurs types de polymères, deux méthodes de réticulations ont été décrites : par création de liaisons covalentes entre les chaînes, la réticulation chimique ; ou bien par interaction de faible énergie ou enchevêtrement, la réticulation physique [211].

II.2.d.i) Chimique

Dans les hydrogels réticulés chimiquement, les chaînes de polymères linéaires sont liées de manière permanente les unes aux autres via des ponts covalents ou des petites molécules. Cette réticulation peut être formée grâce à la présence de groupes réactifs complémentaires, activation radicalaire, processus d'irradiation ou par réaction enzymatique.

II.2.d.i.1 Groupes réactifs

La réticulation chimique des polymères hydrophiles est l'une des principales méthodes de préparation d'hydrogel. Elle peut se faire par addition de petites molécules agissant comme agent de réticulation [212] : le glutaraldéhyde, les composés époxy, la génipine, le sodium trimétaphosphate (STMP) peuvent être utilisés pour ponter des polymères [213], [214]. Elle peut également être réalisée par réaction de condensation, tel que la réaction EDC/NHS, utilisant un dérivé carboimide (EDC) sur des groupements amides [215]. Deux groupes chimiques complémentaires présents sur les chaînes de polymères peuvent également réagir facilement dans certaines conditions appelées « chimie click ». Cela regroupe, entre autre, les réactions de Diels-Alder, la formation de base de Schiff et l'addition de Mickael [216]. Ces groupes ne sont pas présents initialement sur les polymères et doivent alors être ajoutés par modification chimique préalable ajoutant des étapes supplémentaires à la synthèse.

Cette méthode de réticulation convient à la préparation d'hydrogels à partir de polymères hydrophiles, naturels ou synthétiques, grâce à leurs fonctions hydroxyle, acide carboxylique ou amine [215]. Beaucoup d'agents de réticulation sont cependant toxiques, et il faut alors s'assurer que les molécules n'ayant pas réagi ont été éliminées, notamment par des rinçages extensifs. Certains agents de réticulation peuvent ne réagir que partiellement et deviennent difficiles à éliminer risquant de rendre l'hydrogel toxique.

II.2.d.i.2 Radicalaire

La réticulation par radicaux libres est une technique qui se base sur la capacité des polymères à générer des groupes radicalaires tels que les acrylates, les amides et les lactames de vinyle capables de former des liaisons covalentes [217]. Ces groupements peuvent être activés grâce à l'utilisation d'initiateurs chimiques, thermiques ou photosensibles. Cette technique peut également être utilisée sur des polymères naturels à condition qu'ils possèdent des groupes polymérisables par voie radicalaire, ajoutés après modification chimique. Les radicaux libres sont produits par dissociation homolytique des liaisons faibles ou par réactions d'oxydo-réduction [218].

II.2.d.i.3 Irradiation

La réticulation par irradiation permet de synthétiser des hydrogels et peut être utilisée comme procédé de stérilisation dans certaines conditions [219]. Les faisceaux d'électrons et les rayons γ ont une énergie suffisamment élevée pour ioniser des liaisons insaturées le long des chaînes de polymères en formant des ponts intermoléculaires [220]. Contrairement à d'autres méthodes de réticulation chimique, aucun catalyseur ou additif n'est nécessaire à la réaction. Cette méthode s'applique surtout aux polymères synthétiques [221]. Elle est facilement contrôlable en variant la dose d'irradiation mais nécessite toutefois des installations conséquentes. Cependant, au cours du phénomène d'irradiation, il se produit à la fois une dégradation du polymère par scission de chaîne et la réticulation. L'un de ces phénomènes peut prendre l'ascendant sur l'autre, parfois au détriment de la réticulation et le procédé n'est pas applicable à tous les polymères, ce qui en limite l'utilisation [222].

II.2.d.i.4 Enzymatique

La réticulation enzymatique offre la possibilité de moduler la cinétique de la formation de gel *in situ* par contrôle de la concentration des enzymes, du substrat, de la température et du pH. Elle permet la formation de liaisons covalentes, non toxiques et dans des conditions physiologiques [216]. Un exemple de réaction enzymatique est la réaction de la transglutaminase (Tgase) avec les ions calcium comme cofacteurs qui favorisent la formation de liaisons amides entre les groupes carboxamide et amine [223].

II.2.d.ii) Physique

Les hydrogels physiques sont des matériaux comportant des interactions intermoléculaires majoritairement réversibles telles que l'enchevêtrements des chaînes, les interactions hydrophobes, les liaisons hydrogènes ioniques ou la formation de zones cristallines [216].

II.2.d.ii.1 Interactions ioniques

La réticulation par interactions ioniques ou électrostatiques pour former des hydrogels est largement utilisée dans le domaine des biomatériaux. Elle repose sur l'interaction entre deux charges électriques opposées. Cette technique est beaucoup utilisée avec les polysaccharides naturellement chargés tels que l'alginate, chargé négativement ou le chitosane chargé positivement. Ils forment des complexes polyélectrolytes dont la stabilité varie en fonction du pH, de la force ionique et de la présence d'agents chélateurs dans l'environnement. Nombre de facteurs peuvent impacter les propriétés des hydrogels ainsi formés, tels que la densité de charge des polymères, le ratio entre chaque polymère, et le microenvironnement [216]. Les interactions ioniques ont la capacité de se

reformer après avoir été rompues. L'avantage de cette méthode est que certains hydrogels peuvent reprendre forme après avoir été cassés par un stress important, mais cela représente également un inconvénient puisque si les interactions ne sont pas assez fortes, la résistance mécanique de l'hydrogel formé est trop faible.

II.2.d.ii.2 Interactions hydrophobes

Des interactions hydrophobes pour la réticulation de polymères hydrophiles sont possibles après copolymérisation avec des monomères hydrophobes [224]. Ces interactions hydrophobes sont plus stables que les autres interactions moléculaires faibles (van der Waals, liaisons hydrogènes) [218]. Une variation des paramètres environnementaux (température) peut conduire à l'exposition des zones hydrophobes et permet de créer ces interactions. Ce processus de réticulation est notamment utilisé pour la soie *via* ses feuillets bêta [165].

II.2.d.ii.3 Liaisons hydrogènes

Des liaisons hydrogènes entre les chaînes de polymères peuvent permettre la formation d'hydrogels. Il s'agit de la liaison non-covalente la plus répandue. Une liaison hydrogène est formée par l'association d'un atome d'hydrogène et d'un groupe fonctionnel d'électronégativité élevée [212]. Les groupes de type amide, urée, acide carboxylique, pyrrole, carbazole et hydroxyle sont capables de réaliser ces liaisons [216]. Les liaisons hydrogènes restent cependant des liaisons faibles dont les réseaux se délient et se dispersent généralement en quelques minutes ou quelques heures [218], rendant les hydrogels adaptés pour la formulation de systèmes de libération rapide.

II.2.d.ii.4 Zones cristallines

Les zones cristallines formées entre les chaînes des polymères agissent comme une réticulation physique [216]. Cette caractéristique est surtout utilisée pour réticuler le PVA grâce à la répétition de cycles de congélation/décongélation [225]. Les propriétés mécaniques des cryogels ainsi formés dépendent de la densité et de la régularité des liaisons formées. Cela permet d'obtenir des hydrogels rigides mais en général peu dégradables et l'utilisation de cette technique reste limitée.

L'intérêt des hydrogels physiques réside dans l'absence d'utilisation d'agents de réticulation ce qui facilite la synthèse et diminue le risque de toxicité résiduelle. La majorité des hydrogels physiques sont fragiles et moins stables à l'état hydraté ce qui peut poser problème pour la régénération des tissus, notamment pour la peau. Les hydrogels chimiques, quant à eux, présentent une meilleure stabilité dans les conditions physiologiques, avec des propriétés mécaniques renforcées et la

possibilité de moduler leur comportement de dégradation. En conséquence, la réticulation chimique à partir de biopolymères est largement préférée pour développer des matrices destinées à la régénération tissulaire.

II.2.e) Formation de pores

Les matrices peuvent être fabriquées par différentes méthodes : moulage, électrofilage, émulsion, prototypage rapide ou compression [181]. A partir d'un « bloc » d'hydrogel, il est possible de créer une structure poreuse interconnectée. Plusieurs techniques existent à cet effet : la lixiviation de particules, le dégagement gazeux, la lyophilisation et la séparation de phases.

II.2.e.i) Lixiviation de particules

La création de pore par lixiviation d'agents porogènes est une méthode très utilisée pour la préparation de matrices poreuses. Cette méthode consiste en la dispersion d'un agent porogène, qu'il soit sous forme particulaire ou sous forme de poudre, dans une solution de polymères. Son élimination résulte de la dissolution des cristaux de sels après gélification du mélange [112].

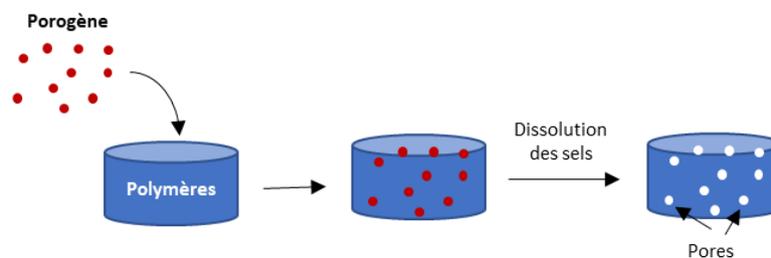


Figure 24 : Représentation schématique de la lixiviation des particules (adapté de Turnbull *et al.* 2017)

La mise en forme de la solution de polymères peut se faire par réticulation ou par moulage avec évaporation de solvant [226]. Il est possible d'utiliser des particules de sels dont la variation en taille et en concentration permettent de contrôler respectivement la porosité et la fraction poreuse du matériau [227]. Cependant, la forme des pores obtenus et l'interconnectivité de la fraction poreuse ne sont pas contrôlées.

II.2.e.ii) Libération de dioxyde de carbone (CO₂)

Dans cette technique, le gaz est utilisé comme agent porogène pour obtenir des éponges macroporeuses [118]. Le dégagement gazeux est généré soit chimiquement, soit physiquement. Dans le premier cas, la décomposition de l'agent porogène dans un solvant adapté libère du CO₂ [228]. Dans le second cas, du dioxyde de carbone est injecté dans les hydrogels sous haute pression pour permettre la saturation des polymères. La diminution de la pression conduit à une instabilité de la

phase gazeuse et à la croissance de bulles d'air qui vont être rapidement libérées [229]. Dans les deux cas, les pores sont formés par la création de bulles à l'intérieur du gel pour libérer le CO₂. Cette technique permet de former des pores de grandes tailles (100-500 µm) mais avec souvent peu d'interconnectivité. Elle est alors souvent utilisée en combinaison avec la technique de lixiviation des sels.

II.2.e.iii) Lyophilisation

Les matrices biologiques sont souvent déshydratées par sublimation (lyophilisation) ou par évaporation avant stérilisation terminale. La lyophilisation est un procédé très répandu pour des applications alimentaires et pharmaceutiques [230]. Cette déshydratation a tendance à rendre les matériaux plus facilement manipulables et transportables avec une durée de conservation plus longue. La lyophilisation est un processus pendant lequel l'eau est éliminée de l'hydrogel par sublimation des cristaux de glace formés après une phase de congélation, créant ainsi des pores [231] (Figure 25). Elle est réalisée grâce à des rampes de température sous basse pression. La cinétique et les paramètres de l'étape de congélation contrôlent la porosité et l'interconnectivité des matrices [232].

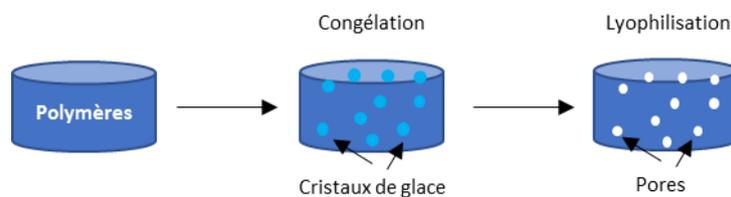


Figure 25 : Représentation schématique de la lyophilisation

II.2.e.iv) Séparation de phases

La technique dite de séparation des phases pour la conception des matrices poreuses repose sur une séparation thermodynamique, qui divise la solution en deux phases distinctes [118] : pauvre et riche en polymère. La phase riche en polymères est ensuite réticulée, formant la matrice, tandis que la phase pauvre en polymère crée des pores suite à l'élimination du solvant [230] (Figure 26). Le solvant peut être éliminé par extraction, évaporation ou lyophilisation.

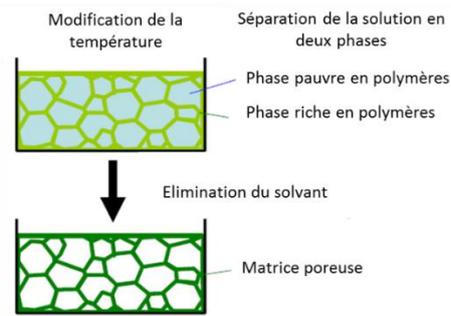


Figure 26 : Représentation schématique de la technique de fabrication de matrice poreuse par séparation de phases adapté de [233]

Toutes ces méthodes permettent de former des pores après réticulation des hydrogels, dont la taille, la répartition et le nombre varient en fonction de plusieurs paramètres. Ils peuvent être utilisés seuls ou combinés pour augmenter la porosité et leur interconnectivité.

II.2.f) Exemples d'hydrogels à base de biopolymères

Les propriétés des hydrogels en tant que biomatériaux pour l'application cutanée reposent sur la nature des polymères, la méthode de réticulation et la présence de pores. Comme décrit en II.2.c), il existe un large choix de polymères, dont les biopolymères qui présentent de nombreux avantages. Les différents procédés de synthèse évoqués précédemment permettent également de moduler ces propriétés afin d'être les plus appropriées à l'application visée. Cela offre une multitude de possibilités pour la conception de biomatériaux pour la régénération cutanée, dont quelques exemples à base de biopolymères sont répertoriés dans le Tableau 5 :

Tableau 5 : Exemples de formulation de biomatériaux à base de polymères naturels

Hydrogels	Réticulation	Polymères	Formation de pores	Références
Chimiques		HA	-	[234]
	Radicalaire	Kératine	Lyophilisation	[235]
		Dextrane	-	[236]
		Gélatine	Lixiviation /Lyophilisation	[237]
	EDC/NHS	Soie/HA/Alginate	Lyophilisation	[238]
		Collagène/chondroïtine sulfate/HA	Lyophilisation	[239]
	Glutaraldéhyde	Collagène	Lyophilisation	[240]
	Addition de Michael	HA	Lixiviation de particules	[146]
	Enzymatique	Fibrine	-	[241]
	Base de Schiff	Dextrane/HA	Lyophilisation	[242]
	Dérivé succinilique	Pullulane/HA	Lyophilisation	[243]
	STMP	Pullulane/collagène	Séparation de phase	[244]
	NMNO	Cellulose	Lixiviation de particules	[245]
	Epichlorhydrine	CMC	Lyophilisation	[240]
Génipine	Chitosane	-	[246]	
Physiques		Alginate/chitosane	Séparation de phases	[247]
	Interactions électrostatiques	Chitosane/Chondroïtine sulfate	-	[248]
		Chitosane/HA	-	[248]
		Collagène	-	[249]
	Interactions hydrophobes	Soie	Lyophilisation	[250]
		Soie/kératine	Lyophilisation	[251]

II.3) Applications

Dans le contexte de la régénération des plaies cutanées, les matrices permettent à la fois de combler la perte de substance grâce à leur structure 3D, d'apporter et de maintenir un milieu humide. Elles peuvent être utilisées telles-elles ou alors être optimisées avec divers composés. En effet, dans les plaies étendues et graves (stade III et IV), les pertes sont massives et la recolonisation par les

cellules devient difficile, ce qui peut provoquer un retard à la cicatrisation. Une stratégie thérapeutique consiste alors à apporter des facteurs directement sur le site de la plaie pour améliorer la réparation. Les hydrogels peuvent ainsi agir comme plateforme de libération locale (facteurs de croissance, cytokines, médicaments) [252] et/ou être combinés à des cellules formant une construction cellulaire implantable [253].

II.3.a) Plateforme de libération

II.3.a.i) Principe

Une des stratégies utilisées afin d'accélérer la régénération des tissus consiste à utiliser des composés bioactifs capables d'agir sur le processus de cicatrisation [102]. La MEC physiologique est un réservoir de facteurs de croissances qui participent à la réparation des plaies. Elle permet à la fois de protéger les activités de ces composés et de les libérer spatialement et temporellement de manière contrôlée. Le désir de mimer les propriétés fonctionnelles de la MEC a conduit à l'élaboration d'hydrogels enrichis en facteurs favorables à la cicatrisation [102]. Grâce à leurs propriétés de gonflement, leur réseau polymérique modulable et leurs conditions de synthèse relativement douces pour les composés, les hydrogels sont très largement utilisés pour incorporer des agents bioactifs [254].

Selon l'application visée, les hydrogels peuvent être modifiés afin de contrôler à façon la libération des molécules à apporter sur le site de la plaie pour les libérer au moment approprié. Les hydrogels peuvent intégrer différents types de composés ayant par exemple pour action d'accélérer la guérison, de restaurer et/ou améliorer les propriétés de la peau à différentes étapes de la cicatrisation [255]. Ces dispositifs combinés peuvent être également utilisés afin d'éliminer une infection (antiseptiques, antibiotiques) [98], moduler l'inflammation (anti-inflammatoires et antioxydants) [256] ou améliorer la migration et la prolifération cellulaire (FGF [257], PDGF [258]).

II.3.a.ii) Interactions molécules-polymères

Les molécules actives peuvent être incorporées dans les hydrogels de plusieurs manières : par liaisons chimiques (Figure 27) ou par interactions physiques (Figure 28) [252]. Certains polymères possèdent des groupements chimiques pouvant être modifiés afin de permettre ou d'amplifier une interaction avec les composés d'intérêt. La libération des composés se fera suivant des mécanismes tels que la diffusion, la dissolution, la dégradation du support, ou encore *via* des stimuli externes (UV, infrarouge, ultrasons) [111].

II.3.a.ii.1 Liaisons covalentes

Une des stratégies consiste à lier les molécules actives à la structure de l'hydrogel. La molécule est reliée au réseau de polymères par des ponts covalents, stables ou clivables [252]. Ces interactions reposent sur des procédés similaires à la réticulation chimique des polymères, évoquée précédemment (voir §II.2.d.i). Lorsque la liaison est stable (liaison amides, thiol-ene, etc.), la molécule est alors retenue jusqu'à la dégradation du réseau. Les liens clivables, peuvent inclure des liaisons par des petites molécules (liaisons esters et disulfides) et des macromolécules comme par exemple des liaisons avec des séquences peptidiques [252]. La molécule est alors libérée après rupture de la liaison qui peut être contrôlée par des facteurs environnementaux (pH, enzyme, etc.).

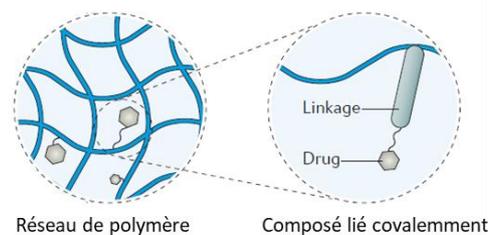


Figure 27 : Incorporation par liaisons covalentes (adapté de Li *et al.* [252])

II.3.a.ii.2 Interactions physiques

Les composés peuvent être également retenus par des interactions physiques : encombrement stérique, interactions électrostatiques/hydrogènes et interactions hydrophobes [252] (Figure 28). Ces liaisons dépendent bien évidemment de la nature et de la structure de la molécule active d'intérêt.

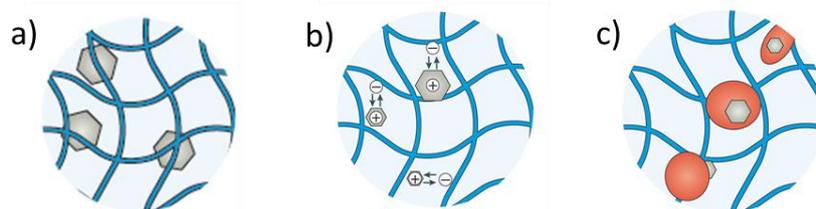


Figure 28 : Incorporation par (a) interactions stériques, (b) interactions électrostatiques et (c) interactions hydrophobes (adapté de Li *et al.* [252])

Ces interactions reposent sur le même principe que les procédés de réticulation physiques des polymères exposés au §II.2.d.ii). La rétention de la molécule par encombrement stérique repose sur le paramètre de maille de l'hydrogel. Si la molécule est plus grande que la taille des mailles, elle sera plus retenue et inversement, ce qui va influencer la cinétique de libération du composé [252]. Cette

rétenion par taille peut être combinée à des interactions électrostatiques et hydrophobes. Les interactions électrostatiques reposent sur l'association de charges opposées portées par les polymères et la molécule. Le composé est libéré lorsque des ions de l'environnement interagissent avec les charges du système [252]. Enfin, les interactions hydrophobes reposent sur l'incorporation de composés hydrophobes dans le réseau de polymères pouvant interagir avec la molécule d'intérêt [252]. Ce procédé recourt notamment à l'utilisation de cyclodextrines [259], [260], qui comportent à la fois un caractère hydrophile (externe) et hydrophobe (interne) dans lequel la molécule peut se loger, sans impacter les propriétés hydrophiles de l'hydrogel. La libération se fait alors par répartition de la molécule solubilisée entre l'hydrogel et le milieu [259].

II.3.a.iii) Profils de libération

La diffusion des molécules est conditionnée par le paramètre de maille. Il est modulé par le taux de réticulation, la concentration en polymères et le gonflement, ainsi que le type de liaisons mises en place et par des facteurs extérieurs tels que la température et la composition chimique (enzymes, ions) du milieu. La libération des composés des hydrogels suit trois mécanismes [261], [262] :

- (1) Système contrôlé par la diffusion : régi uniquement par la diffusion des molécules à travers le réseau de polymères
- (2) Système contrôlé par le gonflement : amélioration de la diffusion par gonflement des polymères et donc dépendant du paramètre de maille et sensible à la nature du milieu
- (3) Système contrôlé chimiquement : la diffusion dépend de l'intégrité du réseau de polymères, médiée par l'hydrolyse ou le clivage enzymatique des polymères, des points de réticulation ou des interactions entre la molécule et le réseau de polymère

Il existe par ailleurs différents modèles mathématiques qui permettent d'identifier le mode de libération des composés [263].

Plusieurs technologies ont été développées pour formuler des plateformes de libération en fonction du type de réseau, de la nature de la molécule et du profil de libération. Ces hydrogels peuvent voir également leurs propriétés renforcées par leurs compositions en polymères. En effet, l'utilisation de polymères bioactifs rend alors les matrices capables d'assurer, par leurs propriétés intrinsèques, l'adhésion, la prolifération, et la migration cellulaire. Elles sont alors destinées à supporter la réparation tissulaire au sein de leur structure, et sont alors définies comme substituts cutanés.

II.3.b) Substituts cutanés

Les substituts cutanés ont pour but de favoriser la réparation des tissus cutanés endommagés. Ils s'implantent au niveau du site lésé, recouvrent la plaie et combler la perte de substance. Ces matériaux agissent comme structure de soutien imitant la MEC provisoire pour faciliter la migration et la prolifération cellulaire au niveau de la zone lésée (Figure 29).

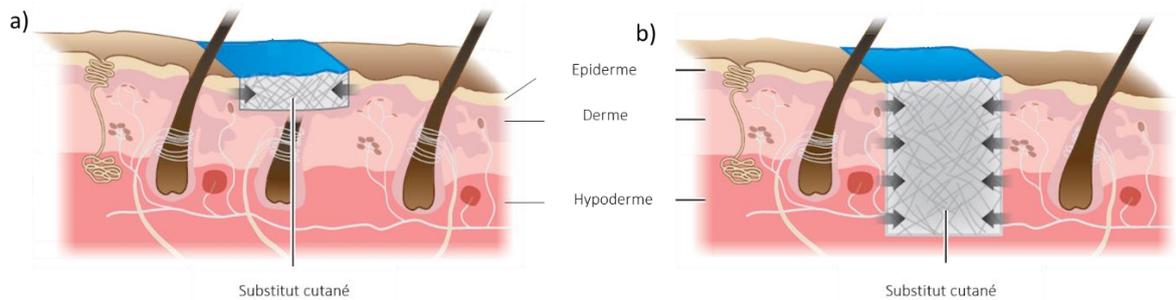


Figure 29 : Modélisation utilisation d'application des biomatériaux en tant que substituts cutanés dans le cas d'un modèle de perte partielle (plaie stade I à II) (a) ou totale (plaie stade III à IV) (b) de peau [264]

Lors de la conception des biomatériaux comme substituts cutanés, un grand nombre de propriétés doit être pris en compte [113], [118]. Les matrices doivent se rapprocher le plus possible des caractéristiques idéales d'un substitut cutané [265], récapitulées dans le Tableau 6.

Tableau 6 : Relation entre les propriétés attendues d'un substitut cutané idéal et des propriétés apportées par un biomatériau

Propriétés d'un substitut cutané idéal [265]	Propriétés des matrices [113], [118]
Assurer la fonction barrière	Géométrie du matériau Résistance mécanique Résistance à la dessiccation Maintien sur le site de la plaie (suturabilité)
Être perméable aux échanges gazeux	Paramètre de maille, géométrie Taille des pores, porosité et interconnectivité des pores
Stabilité spatiale pendant la régénération cutanée	Propriétés mécaniques Dégradabilité
Combattre les infections	Nature des matériaux Agent actif
Apporter un support comme matrice provisoire	Structure tridimensionnelle
Biocompatibilité	Nature des matériaux et méthodes de fabrication utilisées
Conformable et facile d'utilisation	Méthodes de fabrication et propriétés mécaniques
Peu coûteux et facile à stocker	

Les propriétés mécaniques et chimiques ainsi que la topologie du matériau influencent le comportement cellulaire [266]. Faire varier les propriétés physico-chimiques du substitut cutané

notamment par le choix du matériau, de la méthode de réticulation, et de la structure permet de moduler les caractéristiques et se rapprocher au mieux des propriétés désirées.

II.3.b.i) Classification

L'ingénierie tissulaire pour les substituts cutanés repose sur la conception et la fabrication de supports tridimensionnels en accord avec les objectifs fonctionnels attendus. Elle s'appuie sur la création de matrice dermiques et/ou épidermiques artificielles implantables (Tableau 7) dans le but de remplacer la peau sur une zone lésée et de promouvoir la cicatrisation cutanée.

Il existe différentes classifications de ces substituts qui se recoupent [267] : en fonction de la structure anatomique qu'ils sont destinés à réparer (épidermique, dermique ou dermo-épidermique), de la durée d'utilisation (temporaire, semi-permanent ou permanent), de la nature du substitut (biologique ou synthétique) et de leur colonisation par des cellules. Ils sont présentés selon cette dernière classification à savoir acellulaires etensemencés.

II.3.b.ii) Acellulaires

Les substituts acellulaires agissent comme support de la migration et de la prolifération cellulaire. Ils apportent un environnement qui permet aux cellules de l'hôte d'envahir l'implant. Ces cellules sécrètent par la suite des facteurs de croissance et des protéines de la matrice extracellulaire, permettant ainsi d'accélérer le processus de cicatrisation. Ces substituts peuvent être de nature synthétique mais sont majoritairement composés de polymères naturels (Tableau 7). Lorsque le produit est implanté, la matrice doit pouvoir supporter et promouvoir la migration et la prolifération des cellules endogènes, ainsi que permettre le remodelage du tissu néo formé en derme/épiderme.

Les produits pour le remplacement dermique sont acellulaires, basés sur des matériaux d'origine allogénique ou xénogénique (Tableau 7). Ces produits sont faciles à manipuler, moins chers et plus rapides à la fabrication en grande quantité, quand ils ne comportent pas de matériel vivant. De plus ils ont également démontré une efficacité dans les plaies plus profondes et sévères [267]. Malheureusement, ils n'aboutissent pas encore à la restauration complète des fonctions et de l'esthétique de la peau. Ils sont majoritairement utilisés pour préparer le lit de la plaie à une greffe autologue de peau [268].

II.3.b.iii) Ensemencés

Les matrices peuvent contenir des cellules autologues ou allogéniques cultivées *in vitro* et sont adaptées à la structure anatomique qu'elles tendent à reproduire [124]. Les cellules peuvent également être introduites en coculture dans le support, formant un dispositif plus complexe, dermo-épidermique, pour guider la régénération fonctionnelle de la peau. Le but de ces supports est de fournir un matériau pour délivrer des cellules et apporter des médiateurs actifs, participant à la cicatrisation et facilitant la synthèse d'une nouvelle MEC au niveau de la peau endommagée. Les substituts dermo-épidermiques ensemencés sont les produits les plus sophistiqués et les plus difficiles à produire. Bien qu'ils soient très prometteurs, ils sont aujourd'hui surtout utilisés comme pansements biologiquement actifs, temporaires, pour préparer le site lésé à la greffe de peau.

II.3.b.iv) Produits commercialisés

Plusieurs produits pour la peau issus de l'ingénierie tissulaire sont actuellement disponibles pour le traitement des plaies aiguës et chroniques et sont présentés dans le Tableau 7 en fonction de leur structure anatomique.

Les substituts cutanés disponibles sur le marché ont démontré une augmentation des taux de guérison de certaines plaies chroniques en clinique. Cependant, aucun n'a jusqu'à présent fourni de résultats comparables à ceux d'une autogreffe. Cette constatation est notamment dû à un retard à la vascularisation du matériau.

Tableau 7 : Substituts cutanés commercialisés, compositions et applications

Structure anatomique	Dénomination	Type cellulaire	Composition	Applications
Epidermiques	Bioseed-S®	Kératinocytes autologues	Colle de fibrine	Ulcères veineux de jambes résistants aux traitements/ Brûlures
	Laserskin®	Kératinocytes autologues	Membrane d'acide hyaluronique	Blessures de profondeur partielle
	My skin®	Keratinocytes autologues	PVC avec une surface plasma polymérisée	Ulcères neuropathiques, de pression et de pied diabétique
Dermiques	Alloderm®	-	Peau de cadavre décellularisée	Brûlure aiguës
	Biobrane®	-	Collagène porcin incorporé dans une structure en nylon recouvert d'un film de silicone	Brûlures partielles Plaies chroniques
	Dermagraft®	Fibroblastes allogéniques néonatales	Réseau de polygalactine biodégradable	Brûlures Ulcères
	EZ Derm®	-	Collagène d'origine porcine réticulé avec des aldéhydes	Ulcérations et abrasion de la peau
	Grafjacket®	-	Derme décellularisée allogénique	Brûlures superficielles et profondes
	Hyalograft®	Fibroblastes autologues	Dérivés de l'acide hyaluronique allogénique ou recombinant	Ulcères Brûlures
	Hyalomatrix®	-		
	Intégra®	-	Réseau de collagène bovin de type I et chondroïtine sulfate associé à une couche externe de silicone	Brûlures Ulcères chroniques
	Karoderm® SureDerm®	-	Derme décellularisée allogénique	Modification de cicatrices hypertrophiques Brûlures
	Matriderm®	-	Matrice de collagène bovin enduit d'α-élastine	Améliore la prise de greffe partielle
	Oasis Wound Matrix®	-	Matrice produite à partir de sous-muqueuse du petit intestin porcin	Stimulation de fermeture des plaies
	Permacol®	-	Matrice dermique décellularisée dérivée du porc, réticulée avec du diisocyanate	Reconstruction de la paroi abdominale
	Pelnac Standard Type	-	Couche de collagène porcin sur film de silicone	Brûlure au 3 ^e degré Défauts de la peau
Terudermis®	-	Collagène bovin lyophilisé associé à une membrane de silicone	Brûlures profondes	
Transcyte®	Fibroblastes néonatales allogéniques	Collagène porcin incorporé dans une structure en nylon recouvert d'un film de silicone	Escarre de brûlures	
Dermo-épidermiques	Allograft®	Kératinocytes et fibroblastes allogéniques	Peau humaine de cadavre	Brûlures
	Apligraf®	Kératinocytes et fibroblastes néonatales allogéniques	Collagène bovin de type I	Ulcères
	Karoskin®	Kératinocytes et fibroblastes allogéniques	Peau humaine de cadavre	Brûlures
	OrCell®	Kératinocytes et fibroblastes néonatales allogéniques	Collagène bovin de type I	Traitement des sites donneurs pour les brûlures
	PolyActive®	Kératinocytes et fibroblastes autologues	Polyéthylène oxydeteréphthalate/Polybutylène terephthalate	Traitement des sites donneurs pour les brûlures Plaies partielles
	Tissue Tech Autograft System (Hyalograft 3D + Laserskin)	Kératinocytes et fibroblastes autologues	Membrane d'acide Hyaluronique microperforée	Ulcères

Plusieurs limitations impactent l'utilisation des substituts cutanés. Les matériauxensemencés, implantés tels quels ou décellularisés, ne sont pas productibles aisément à grande échelle. De plus, leur temps de fabrication est long et présente des contraintes de stockage et de transport importantes. Par ailleurs, les dispositifs comportant des éléments d'origine allogénique et xénogénique possèdent des risques immunogéniques et infectieux qui requièrent des traitements drastiques pour s'assurer de leur sécurité mais risquent d'altérer leur structure. Les dispositifs acellulaires ont un potentiel plus intéressant pour une fabrication et une utilisation rapide dans le cas des plaies profondes avec de plus grandes facilités de stockage.

Ces dispositifs médicaux sont destinés à être implantés dans l'organisme. Leur biocompatibilité doit alors être évaluée afin d'attester de la sécurité des matériaux et poursuivre leur développement. L'interaction entre le biomatériau et l'hôte peut être analysée après contact avec des cellules spécifiques du tissu visé et par implantation dans des modèles animaux.

II.4) Modèles d'étude animaux

Différentes méthodes d'évaluation *in vitro* de la cicatrisation cutanée existent. Elles visent à mimer la complexité et l'interaction cellulaire existantes dans les tissus et au cours de la cicatrisation [269]. Malgré des avancées majeures de ces modèles, les tests *in vivo* restent essentiels pour évaluer en toute sécurité l'efficacité biologique des dispositifs implantables. La cicatrisation, est un processus complexe et les méthodes d'analyse *in vitro* ne prennent pas en considération les contributions locales et systémiques qui interagissent dans le processus. La vascularisation du lit de la plaie, les phénomènes inflammatoires, les réponses immunitaires ainsi que les infections ne peuvent être actuellement étudiées autrement qu'*in vivo*. Les modèles animaux ne peuvent être remplacés car il n'existe pas à ce jour de méthodes alternatives pour reproduire la réparation cutanée.

Un modèle animal est destiné à étudier et à déterminer la sécurité et l'efficacité des traitements médicaux. [270]. Pour être pertinent et fiable, le modèle de cicatrisation cutanée se doit donc d'être sélectionné sur la base de similitudes démontrées entre les structures cutanées humaines et animales, et leur mécanisme cicatriciel. Pour les mêmes raisons, les différences existantes entre les deux systèmes doivent être connues afin d'identifier précisément les domaines d'utilisation et leurs limites.

II.4.a) Réaction de l'hôte

La sélection des biomatériaux pour les applications cliniques implique la validation de la sécurité des biomatériaux, ainsi que de leurs produits de dégradation au contact du tissu de l'hôte. Cette évaluation est classiquement réalisée sur des modèles d'implantation sous-cutanée, intrapéritonéale et intramusculaire de rongeurs (souris et rats) [181]. Le modèle d'implantation sous-cutanée chez la souris est particulièrement utilisé car leur peau est « lâche », ce qui permet d'introduire très facilement des implants [271]. Ces études permettent d'observer la réaction de l'hôte à l'introduction d'un biomatériau. Cette réaction est étudiée au travers de la réponse inflammatoire, la présence d'une capsule fibreuse et la vascularisation des tissus environnants et du site d'implantation [272].

II.4.b) Modèles de plaie

Les modèles de cicatrisation cutanée peuvent être réalisés sur différents mammifères. Le porc semble être le modèle idéal pour étudier la réparation de la peau [273]. La structure de sa peau est plus proche de celle de l'Homme, en opposition aux modèles murins. De plus, le processus de cicatrisation est comparable à l'humain contrairement aux rongeurs où la réparation se produit plus rapidement et principalement par contraction [271]. Cependant, l'utilisation des rongeurs dans la littérature est très référencée pour les modèles de plaies cutanées [274]–[276]. En effet, les modèles murins sont plus faciles à mettre en œuvre (nombre, coût, infrastructure) et les plaies étendues cicatrisent rapidement [277], [278] permettant d'une part la mise au point du modèle de plaie et d'autre part une sélection rapide des dispositifs étudiés pour poursuivre les études pré-cliniques.

II.4.b.i) Induction de plaies

Les incisions et les excisions de profondeur totale au niveau dorsal de l'animal sont des modèles très utilisés [279]. Les excisions permettent la mise en place du processus de cicatrisation de seconde intention avec formation du tissu de granulation (voir §1.3). Des modèles de brûlures thermiques [280], [281], électriques [282] et plus rarement chimiques [283] sont également étudiés. Ces dernières doivent être reproductibles, ce qui reste difficile en pratique. Ces modèles de plaies « aigües » chez des animaux sains peuvent être rendues chroniques [277] par induction de facteurs locaux ou systémiques responsables d'une perturbation du processus de cicatrisation (voir §1.3.c). Il est en effet possible de travailler sur plaie chez des souris diabétiques [284] et ou infectées [285] qui présentent un temps de fermeture retardé [286].

II.4.b.ii) Paramètres d'évaluation

La fermeture des plaies peut être suivie macroscopiquement par photographie avec mesure des aires [287]. Les temps de fermeture est estimé entre 14 à 16 jours [276], [288]–[290] chez les rongeurs sains. Plusieurs caractéristiques peuvent être évaluées au niveau microscopique en histologie afin d'analyser le processus de fermeture de la plaie [277], [287] :

- (1) La cinétique de la réponse inflammatoire de 1h jusqu'à 14 jours
- (2) La réépithélialisation pendant 7 jours après formation de la plaie
- (3) L'apparence du tissu de granulation par observation de marqueurs de la vascularisation (VEGF) au cours des 7 premiers jours
- (4) La qualité de la zone cicatrisée après fermeture totale de la plaie

III] Conclusion de la revue bibliographique

La plupart des plaies cutanées peuvent guérir grâce au processus normal de cicatrisation. Cependant, lorsque les dommages infligés à la peau sont trop importants et/ou irréversibles (plaie chronique), l'utilisation de biomatériaux pour aider à la réparation tissulaire cutanée est une stratégie thérapeutique séduisante en médecine régénérative.

De par leur capacité de rétention de l'eau, de biocompatibilité et de dégradation, les hydrogels réticulés chimiquement peuvent être utilisés à la fois comme pansement avec des propriétés de libération [137], [252] et comme substitut cutané [291], [292]. Les biopolymères sont des matériaux de choix pour formuler ces hydrogels notamment grâce à leurs propriétés physico-chimiques et bioactives permettant d'accélérer la réparation cutanée. Le pullulane et le dextrane sont des polysaccharides d'origine naturelle qui ont été choisis pour former la base technologique de ce projet. Ils offrent un large choix de modifications chimiques intéressantes pour des fonctionnalisations tels que l'ajout de groupements acides (carboxylate, sulfate, phosphate), des amines (éthylène-amine, la diéthylamine, la propylamine), ou de groupes hydrophobes (alkyl benzyle). Ils peuvent être réticulés chimiquement par du STMP, agent de réticulation non toxique, et les hydrogels lyophilisés offrent une porosité importante [293]. Ils peuvent également être sensibles à des altérations physico-chimiques (pH, salinité...), permettant de faire varier leurs propriétés. Le contrôle et l'optimisation des paramètres de porosité et de réticulation, peuvent être modulés afin d'optimiser l'infiltration de cellules, la diffusion des nutriments ainsi que la rétention d'eau et de biomolécules. Le pullulane et le dextrane sont capables de se résorber après implantation, aussi bien dans des modèles d'infarctus du myocarde chez le rat [294], que sur des sites osseux chez les petits ou gros animaux [295] ou encore en site sous-cutané [296]. Par ailleurs, les produits sont des dérivés du glucose, bien tolérés et facilement éliminés par les organismes vivants.

L'ajout de composés spécifiques pour améliorer la bioactivité de supports 3D, constitue un axe de recherche largement étudié pour la régénération cutanée. Ils sont capables d'agir sur le processus de cicatrisation dans le but d'améliorer et/ou le débloquent le déroulement physiologique. Dans ce projet, des ingrédients actifs d'origine naturelle issus de la cosmétique, ont été sélectionnés. Ils ont en effet démontré dans des modèles *in vitro* des capacités à promouvoir l'activité de différentes cellules cutanées. Ces composés de nature saccharidique et peptidique, d'origine végétale, ont montré des effets métaboliques qui en font des candidats intéressants pour apporter une bioactivité aux hydrogels de pullulane/dextrane.

CHAPITRE II : MATERIELS ET METHODES

I] Réactifs chimiques, solvants, enzymes et protéines utilisés

Nom	Fournisseur	n°CAS
5-DTAF	Life science	51306-35-5
Fluorescéine isocyanate	Sigma Aldrich	3326-32-7
1-Butanol	Sigma Aldrich	71-36-3
NaOH	Fisher Scientific	1310-73-2
HCl 37%	Cooper	7647-01-0
Acétone	Carlo Erba	67-64-1
Acide sulfurique 95%	Merk	7664-93-9
Phénol >99.5%	Aldrich'	108-95-2
Mannose	Sigma Aldrich	3458-28-4
Glycine >99%	Fluka	56-40-6
Carbonate de sodium	Carl Roth	497-19-8
Acide pricylsulfonique	Sigma Aldrich	2508-19-2
Pullulane Mw 500 kDa	Nagase	9057-02-7
Dextrane Mw500 KDa	Pharmacosmos	9004-54-0
STMP	Sigma Aldrich	7785-84-4
NaCl	Fisher Chemical	7647-14-5
Acide acétique	VWR	64-19-7
Gélatine, bloom 300	Sigma Aldrich	9000-70-8
Glycérol	OLEON	56-81-5
Collagène type I (Bovin)	Collagen solution	9007-34-5
Dextrane FITC 500 kDa	TdB consultancy	60842-46-8
Dextrane TRITC 500 kDa	TdB consultancy	N/A
Ammonium metavanadate 99%	Sigma Aldrich	7803-55-6
Acide nitrique 70%	Sigma Aldrich	7697-37-2
Ammonium molybdate tetrahydrate	Sigma Aldrich	12054-85-2
Acide phosphorique>99%	Sigma Aldrich	7664-38-2
Formaline 10%	Diapath	50-00-0
Triton 100X	Sigma Aldrich	9002-93-1
Pullulanase	Sigma Aldrich	9075-68-7
Dextranase	Sigma Aldrich	9025-70-1
Nitrate de sodium	ReagentPlus	7631-99-4
Chlorure de potassium	Sigma Aldrich	7447-40-7
Cryomount	Histolab	N/A
PBS 10X	Gibco	N/A
Ethanol absolu	VWR	64-17-5
Xylène	VWR	1330-20-7
Acide ascorbique	Sigma Aldrich	50-81-7
Chlorure d'étain (II)	Sigma Aldrich	10025-69-1
2-butanone	Sigma-Aldrich	78-93-3

II] Caractérisation des molécules à délivrer

II.1) Molécules d'intérêts

II.1.a) Molécule A

L'actif Silab référencé sous la dénomination « molécule A » - pour des raisons de confidentialité - est un polysaccharide riche en oligogalactomannanes extrait du caroubier (*Ceratonia siliqua*). Ce polysaccharide a une masse molaire de 3 kDa. Il est composé de 70% d'unités de mannose liés en β 1,4 et substitués en position 6 par 30% d'unités de galactose liées en α (Figure 30).

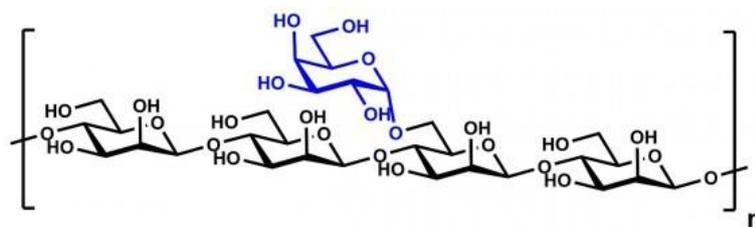


Figure 30 : Molécule de galactomannanes

II.1.b) Molécule B

L'actif Silab référencé sous la dénomination « molécule B » - pour des raisons de confidentialité - est une fraction protéique extraite du riz. Elle est purifiée par une succession de digestions enzymatiques et est composée de séquences peptidiques de taille inférieure à 3,5 kDa.

II.2) Marquage des molécules par un fluorophore

Pour permettre des études de rendement d'incorporation et d'imagerie, les molécules A et B sont marquées par des fluorophores. Deux agents fluorescents appartenant à la famille de la fluorescéine sont utilisés : le 5-DTAF et le FITC (Figure 31) respectivement pour les molécules A et B.

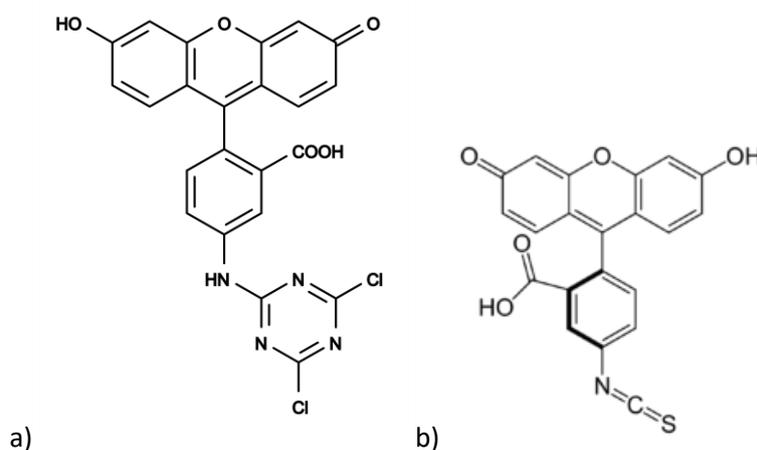


Figure 31 : (a) Molécule de 5-DTAFet (b) molécule FITC

II.2.a) Marquage de la molécule A

L'actif A est solubilisé dans l'eau à une concentration de 100mg/mL. Le pH de la solution est ajusté à pH 11 par addition de NaOH 1M pour déprotomer les fonctions alcools primaires des oses. Du DTAF (495 Da) en poudre est ajouté dans la solution à 1,5 % (m/m) par rapport à la molécule A. La solution est ensuite placée sous agitation pendant 48H à température ambiante (TA). La réaction de greffage est arrêtée en ajustant le pH à 5,5 par de l'HCl 1M. Le mélange est purifié par séparation de phases du 1-butanol à un ratio de 1:1 dans une ampoule à décanter. Six lavages successifs de la phase aqueuse

sont effectués avant analyse. Le produit final, nommé « A-DTAF », est filtré sur 0,2µm, lyophilisé et conservé à TA sous atmosphère sèche.

II.2.b) Marquage de la molécule B

L'actif B est solubilisé dans l'eau à une concentration de 100mg/mL. Le pH de la solution est ajusté à pH 11 par addition de NaOH 1M pour déprotoner les fonctions amines primaires des peptides. Du FITC en poudre est ensuite ajouté à 1,5 % (m/m) par rapport à l'actif B. La solution est maintenue sous agitation 24H à TA. La réaction est arrêtée en ajustant le pH à 5,5 par de l'HCl 1M. Le mélange réactionnel est purifié par séparation de phases avec du 1-butanol à un ratio de 1:1 dans une ampoule à décanter. Huit lavages successifs de la phase aqueuse sont effectués avant caractérisation. Le produit final, nommé « B-FITC », est filtré sur 0,2µm, lyophilisé et conservé à TA sous atmosphère sèche.

II.3) Radiomarquage de la molécule A

Le composé A est radiomarqué par du technétium-99m (Tc-99m) (Laboratoire de médecine nucléaire, FRIM U1149). Le Tc-99m est obtenu à partir d'un générateur Mo-99/Tc-99m sous forme de solution stérile de pertechnétate de sodium [Tc-99m] dans une solution saline (Na^{99m}TcO₄ dans NaCl 0,9%) dont l'activité est mesurée à de 2,4 MBq/µL. Les étapes principales du radiomarquage consistent à l'addition et l'homogénéisation de la molécule A (5 mg/mL) et du ^{99m}TcO₄ à 20% (v/v) auxquels 41% (v/v) de solution de chlorure d'étain (II) (60µg/mL) et d'acide ascorbique (50µg/mL) sont ajoutés (d'après Chauvierre *et al.* [297]). La solution résultante est incubée 30 min à TA avant utilisation et le composé A radiomarqué est référencé « A-99mTc ».

II.4) Caractérisation des molécules

II.4.a) Chromatographies

II.4.a.i) Chromatographie sur couche mince (CCM)

II.4.a.i.1 Pureté du marquage fluorescent

La qualité de la purification par décantation et le greffage des actifs fluorescents sont caractérisés par chromatographie sur couche mince. La migration est réalisée sur gel de silice supporté par une plaque d'aluminium (Merck®, ref. F254). La solution de molécule greffée a été déposée sur la plaque avec pour control du fluorophore seul en solution (0,1mg/mL). La plaque de chromatographie est placée dans une cuve saturée en acétone puis est révélée par ultraviolets (UV) à 365 nm (Fischer Scientifique, Ref. UVP021).

II.4.a.i.2 Pureté radiochimique

La stabilité et la pureté du radio marquage de la molécule A par du 99mT sont évaluées par CCM à T0 et T5h. Quelques gouttes de solution sont déposées sur un gel de silice (Agilent Technologies®, ref. iTLC SG) et éluées avec du 2-butanone et comparé à du technétium non réduit pour contrôle. La radioactivité est mesurée à l'aide d'un radiochromatographe (MiniGita Raytest). La pureté radiochimique de la molécule A-99mT est calculée à partir des aires sous la courbe (AUC) enregistrées.

II.4.a.ii) Chromatographie d'exclusion stérique haute performance (HPSEC)

Les masses molaires moyennes et les distributions de masse molaires de la molécule A marquée et non marquée sont déterminées à TA par HPSEC (Thermo Scientific Dionex, Ultimate 3000) couplée à un détecteur de lumière laser diffusée multi-angles (MALLS) et un réfractomètre différentiel. Une solution de NaNO₃ à 0,15M filtrée sur 0,1 µm est utilisée comme phase mobile. Deux colonnes d'exclusion stérique sont branchées en série (OHpak SB-802.5 et OHpak SB-803 HQ, ShowaDenko) précédées d'une colonne de garde (OHpak SB-G) pour la séparation. L'ensemble des données, lumière diffusée (LS) et indice de réfraction différentiel (dRI), sont enregistrées et traitées avec le logiciel Astra v6.1 (Wyatt Technology). Les échantillons sont préparés à une concentration de 20 mg/ml dans du NaNO₃ 0,15M et filtrés sur 0,22µm avant injection. Un volume de 100 µL est injecté et élué à un débit de travail de 0,5 ml/min.

II.4.b) Dosages colorimétriques

II.4.b.i) Mannose

La teneur en mannose de l'actif A est quantifiée par un dosage des sucres totaux d'après la méthode de Dubois [298]. Des échantillons à 100mg/mL sont mélangés à un ratio de 1 :1 avec du phénol 5%. De l'acide sulfurique 95% est ajouté au mélange avec un ratio de 5:2 (v/v) pour un volume final de 2,8mL. La solution est versée dans des macrocuvettes (Clearline®, Ref. 030100) et chauffée à 100°C pendant 5 min. En présence de phénol et d'acide sulfurique concentré, les oses se transforment en un composé coloré jaune orangé, absorbant à 490 nm. L'absorbance est mesurée par un spectrophotomètre (Safas, UVMC2). La quantité en mannose est déterminée après régression linéaire d'une gamme d'étalonnage de mannose en 5 points de 0 à 125 mg/L ($R^2 > 0.99$).

II.4.b.ii) Amines primaires

Le taux de greffage de l'actif B par le fluorophore est caractérisé par dosage colorimétrique (TNBS) de sa teneur en amines primaires non liées. Les échantillons sont dilués à 20 µg/mL dans un

tampon carbonate de sodium 0.1M. De l'acide picrylsulfonique est ajouté dans les échantillons à un ratio de 0,5% v/v. Les fonctions amines libres sont révélées par la formation d'une coloration jaune mesurée par spectrophotométrie à 420 nm (Infinite M200 Pro, TECAN®). Le taux de greffage est évalué après comparaison des valeurs d'absorbance à une gamme étalon de glycine en 5 point de 0 à 100 $\mu\text{molNH}_2/\text{mL}$ avec un $R^2 > 0.99$. Il est calculé par l'équation suivante :

$$\text{Amine liée (\%)} : \frac{\text{NH}_2 \text{ B} - \text{NH}_2 \text{ B FITC}}{\text{NH}_2 \text{ B}} \times 100$$

Avec « $\text{NH}_2 \text{ B}$ » la teneur en amines libres de la molécule B et « $\text{NH}_2 \text{ B-FITC}$ » la teneur en amines libres de la molécule B-FITC

II.4.c) Potentiel Zeta

La charge de surface de la molécule B est mesurée par diffusion électrophorétique de la lumière grâce à un Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments). Les valeurs de potentiels zeta (ζ) sont calculées par le logiciel DTS Nano v.6.30. La molécule B est dissoute à 5g/L dans du KCl 1mM. La charge de la molécule B est étudiée à différents pH de 2,8 à 7. Le pH est ajusté par addition d'HCl 1M. Le potentiel ζ des différentes solutions est mesuré dans une cellule DTS1070 (Malvern). Une courbe de titration du potentiel Zeta en fonction du pH est ainsi obtenue.

III] Synthèse des matériaux

III.1) Synthèse de l'hydrogel

La préparation des hydrogels est basée sur une méthode brevetée du laboratoire [299] : du pullulane (200kDa) et du dextrane (500 kDa) sont solubilisés dans une solution aqueuse. Un agent porogène est ajouté. Les polymères sont réticulés chimiquement par du sodium trimétaphosphate (STMP) après activation des fonctions alcools après addition de NaOH 10M. La réticulation est réalisée à différentes températures. La réaction de réticulation est stoppée *via* une succession de rinçages par des solutions aqueuses. Les matériaux obtenus sont lyophilisés selon le programme décrit au §III.1.b). Au cours de cette étude, plusieurs paramètres sont modulés : ratio pullulane/dextrane, porogène et concentration en agent réticulant (décrits plus loin au §III.2).

III.1.a) Réaction chimique de synthèse

Dans un premier temps, le pullulane et le dextrane sont solubilisés dans de l'eau à deux ratios et en présence d'un agent porogène. Les fonctions alcools des polysaccharides sont transformées en fonctions alcoolates par addition de NaOH à 1M final ($\text{pH} > 13,9$). La solution est incubée pendant 15 min à TA. L'agent réticulant, le STMP, est ajouté à différentes concentrations dans la solution. L'homogénéisation est réalisée par agitation magnétique. Les fonctions alcoolates permettent

l'ouverture du cycle du STMP [300] qui peut lier une autre fonction. Le pontage de deux fonctions alcoolates permet la réticulation et la formation d'un réseau de polymères (Figure 32).

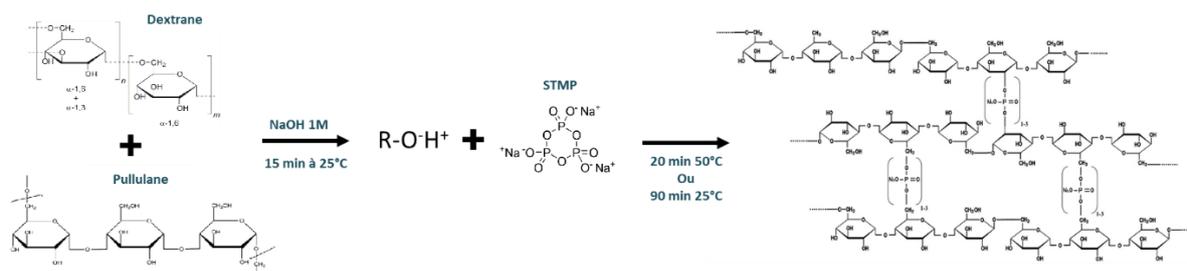


Figure 32 : Réaction chimique de réticulation des polysaccharides par le STMP

Le mélange est ensuite versé dans un moule fait de deux plaques de verres et avec un espaceur en silicone de 1mm ou 250 μm d'épaisseur. Le moule est placé soit à 50°C pendant 20 min, soit à TA pendant 90 minutes (Figure 33). L'hydrogel est ensuite découpé en disques à l'aide d'emporte-pièces de diamètres 0,4 cm, 0,8 cm ou 4 cm. Les matériaux sont neutralisés jusqu'à équilibre à pH 7,4 puis rincés pour éliminer les porogènes. Les étapes de rinçages sont suivies par conductimétrie (détaillées au §III.2.b). Les hydrogels sont enfin lyophilisés et stockés à TA.

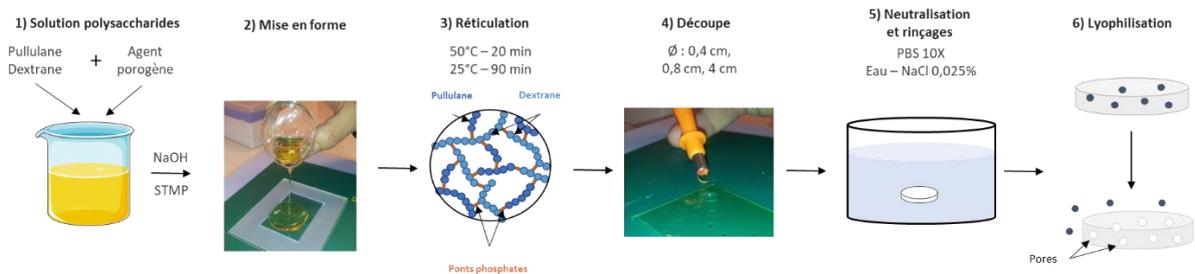


Figure 33 : Etapes de synthèse des matrices de pullulane/dextrane

III.1.b) Lyophilisation

Le procédé de lyophilisation repose sur trois étapes effectuées dans un lyophilisateur MUT (Cryotec®) : une première étape de congélation des échantillons, suivie d'une étape de lyophilisation primaire puis d'une étape de lyophilisation secondaire (Figure 34). La température des échantillons est mesurée par des sondes placées en contact direct avec les hydrogels. Tous les matériaux ont été lyophilisés avec le même programme.

III.1.b.i) Congélation

La température de chargement des matériaux est de 15°C. La congélation est imposée par les plateaux du lyophilisateur et jusqu'à -20°C. La température est maintenue à -20°C pendant 1h30.

III.1.b.ii) Lyophilisation primaire

La lyophilisation primaire permet la sublimation de l'eau libre retenue dans les hydrogels après congélation sous un vide relatif de 5Pa.

III.1.b.iii) Lyophilisation secondaire

La lyophilisation secondaire permet la sublimation de l'eau liée retenue dans les hydrogels. Elle est réalisée sous un vide relatif de 0,1Pa avec une température des plateaux imposée à 30°C pendant minimum 1h. Les échantillons doivent avoir atteint une température supérieure ou égale à 25°C pour considérer le processus de lyophilisation terminé.

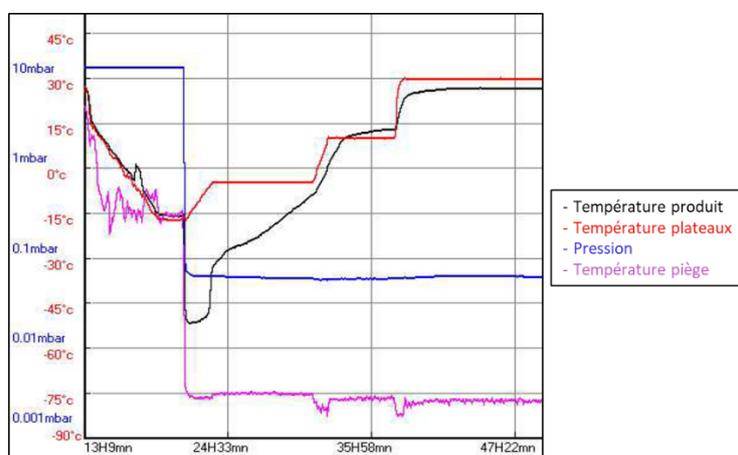


Figure 34 : Exemple de cycle de lyophilisation

III.2) Modulations des propriétés physicochimiques

Plusieurs paramètres de la synthèse des hydrogels ont été modulés au cours de cette étude. Les formulations obtenues sont référencées dans le Tableau 8.

III.2.a) Ratio des polysaccharides

La proportion de pullulane par rapport au dextrane est utilisée à deux ratios : 75 :25 et 50 :50. Les ratios massiques finaux en polysaccharides dans les solutions sont répertoriés dans le Tableau 8.

III.2.b) Porosité

Deux techniques pour former la porosité sont utilisées : la lixiviation des sels et le dégagement gazeux. Elles sont réalisées par introduction de différents agents porogènes : le chlorure de sodium (NaCl) et le bicarbonate de sodium (Na₂CO₃) respectivement.

III.2.b.i) Lixiviation des sels

Le NaCl est introduit sous forme de poudre dans la solution de polysaccharides (Figure 33, étape 1). Après l'étape de réticulation, les disques d'hydrogels sont neutralisés à pH 7,4 par du PBS 10X. Ils sont rincés ensuite par des bains successifs de NaCl 0,025 % (m/v) de 30 min chacun jusqu'à obtenir une conductivité de 540 μ S.cm⁻¹ (ThermOrion®) qui correspond à celle du solvant.

III.2.b.ii) Dégagement gazeux

Le Na₂CO₃ est aussi introduit directement dans la solution de polysaccharides (Figure 33, étape 1). Les hydrogels sont immergés dans de l'acide acétique 12M pendant 30 min (Figure 33, étape 5). Un dégagement gazeux se produit suite à la décomposition du sel selon l'équation suivante : CH₃COOH + Na₂CO₃ = CH₃COO⁻Na⁺ + H₂O + CO₂. Les matrices sont ensuite neutralisées à pH 7,4 par du PBS 10X et rincées par des bains successifs d'eau déionisée jusqu'à obtention d'une conductivité <10 μ S.cm⁻¹, correspondant à celle de l'eau.

III.2.c) Taux de réticulation

Trois taux d'agent réticulant sont utilisés pour les synthèses. Le STMP dilué à 3 concentrations est introduit au moment de l'étape de réticulation (Figure 33, étape 2) : les concentrations finales respectives de 1,5 % (m/v), 2,25% (m/v) and 3% (m/v) sont obtenues (Tableau 8).

III.2.d) Récapitulatif des formulations sans actifs

Tableau 8 : Composition des différentes formulations étudiées

Nom	Ratio polysaccharides (m/m)		Agent porogène		Concentration finale STMP (m/v)	Temp
	Pullulane (Pu)	Dextrane (D)	NaCl	Na ₂ CO ₃		
μ PuD _(75:25) 3	10,8%	3,6%	+	-	3 %	50°C
μ PuD _(75:25) 2.25	10,8%	3,6%	+	-	2,5 %	50°C
μ PuD _(75:25) 1.5	10,8%	3,6%	+	-	1,5 %	50°C
MPuD _(75:25) 3	12,6%	4,2%	-	+	3 %	50°C
MPuD _(75:25) 2.25	12,6%	4,2%	-	+	2,25 %	50°C
MPuD _(75:25) 1.5	12,6%	4,2%	-	+	1,5 %	50°C
μ PuD _(50:50) 2.25	7,2%	7,2%	+	-	2,25 %	50°C
MPuD _(50:50) 2.25	8,4%	8,4%	-	+	2,25 %	25°C

III.3) Incorporation des molécules A et B

L'addition des composés A et B est effectuée à différentes étapes de la synthèse des matrices (Figure 33). Pour le suivi de la libération de ces molécules en fluorescence, l'utilisation de molécules marquées par des fluorophores est privilégiée, pour des questions de sensibilité. Les molécules marquées (A-DTAF et B-FITC) sont ainsi utilisées dans les synthèses, en substitution totale de la molécule non marquée.

III.3.a) Méthode 1 : incorporation *in situ*

Les molécules A et B, marquées et non marquées, sont ajoutées en début de synthèse (Figure 33, étape 1) à la solution de polysaccharides à une concentration de 2,2% (m/v) (Figure 35). La suite de la synthèse est réalisée comme décrit précédemment (§III.2). La méthode d'incorporation « *in situ* » est identifiée « **Ax** » et « **Bx** » respectivement pour les composés A et B.

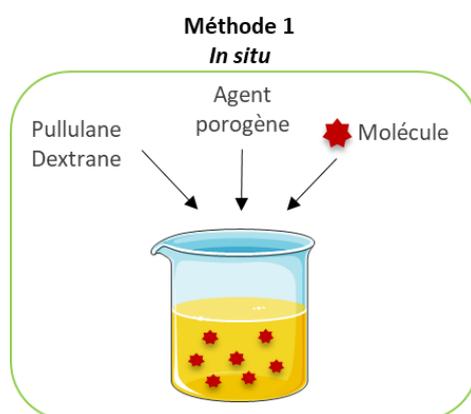


Figure 35 : Méthode d'incorporation « *in situ* »

III.3.b) Méthode 2 : Incorporation par diffusion inverse

L'incorporation des composés s'effectue après réticulation des hydrogels, découpés, neutralisés et rincés (Figure 33, étape 5). Ils sont placés à un ratio de 1 :10 dans une solution concentrée en actif A ou B à 5mg/mL pendant 24h à 4°C sous agitation (Figure 36). Les matrices résultantes sont lyophilisées puis conservées à TA sous atmosphère sèche. La méthode d'incorporation par diffusion inverse est identifiée « **Ad** » et « **Bd** » respectivement pour les molécules A et B.

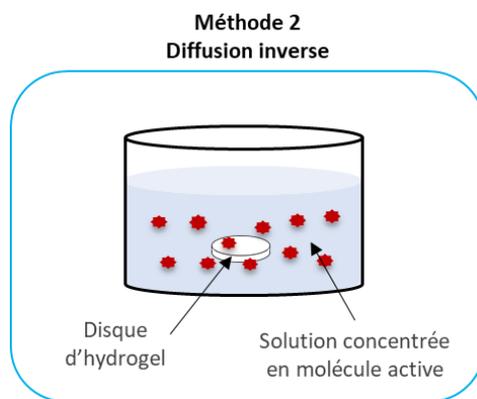


Figure 36 : Méthode d'incorporation « diffusion inverse »

III.3.c) Méthode 3 : Incorporation par imprégnation

L'incorporation par imprégnation consiste en l'hydratation des matrices lyophilisées par 30 μ L/mg de solution concentrée en molécule A (Figure 37). Les hydrogels imprégnés d'actif sont ensuite lyophilisés par le programme décrit §III.1.b) en puis conservés à TA sous atmosphère sèche. Les matrices imprégnées par la molécule A-99mT ne sont pas lyophilisées. Cette méthode est utilisée uniquement pour la molécule A est référencée « Ai ».

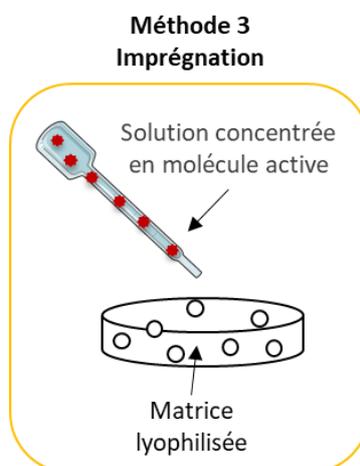


Figure 37 : Méthode d'incorporation « Imprégnation »

III.3.d) Tableaux récapitulatifs des dénominations

Le composé A est incorporé dans les 6 formulations décrites dans le Tableau 8 par les trois méthodes décrites en §III.3). Il en résulte 18 formulations (Tableau 9).

Tableau 9 : Tableau récapitulatif des dénominations des formulations réalisées avec l'actif A

Agent porogène	Méthode d'incorporation		
	<i>In situ</i>	Diffusion inversée	Imprégnation
NaCl	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3 \text{ Ax}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3 \text{ Ad}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3 \text{ Ai}$
	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Ax}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Ad}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Ai}$
	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Ax}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Ad}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Ai}$
Na ₂ CO ₃	$\text{MPuD}_{(75:25)}3 \text{ Ax}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}3 \text{ Ad}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}3 \text{ Ai}$
	$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Ax}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Ad}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Ai}$
	$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Ax}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Ad}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Ai}$

La molécule B a été introduite dans les 6 formulations décrites dans le Tableau 8 par les méthodes 1 et 2 décrites dans la §III.3). Douze formulations ont ainsi été synthétisées (Tableau 10).

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des dénominations des formulations réalisées avec l'actif B

Agent porogène	Méthode d'incorporation	
	<i>In situ</i>	Diffusion inversée
NaCl	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3 \text{ Bx}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3 \text{ Bd}$
	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Bx}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Bd}$
	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Bx}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Bd}$
Na ₂ CO ₃	$\text{MPuD}_{(75:25)}3 \text{ Bx}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}3 \text{ Bd}$
	$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Bx}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Bd}$
	$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Bx}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5 \text{ Bd}$

III.4) Fonctionnalisations des hydrogels

III.4.a) Addition d'une protéine de la matrice extracellulaire

Une protéine de la matrice extracellulaire, du collagène de type I d'origine bovine est introduite dans la formulation « $\text{MPuD}_{(50:50)}2.25$ » de deux façons différentes :

III.4.a.i) Incorporation *In situ*

Une solution de collagène est ajoutée à 2 concentrations au mélange de polysaccharides (Figure 38). Les étapes suivantes de synthèse se sont déroulées comme décrit précédemment au §III.2).

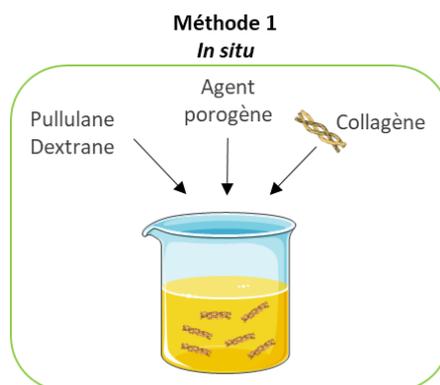


Figure 38 : Méthode d'incorporation de la méthode "in situ"

III.4.a.ii) Incorporation par Imprégnation

Une matrice lyophilisée est hydratée par une solution de collagène à trois concentrations respectivement nommées COLLi 1%, COLLi 0,5% et COLLi 0,1%(Figure 39). Les matrices résultantes sont neutralisées dans du PBS 1X à pH 7,4 et lyophilisées à nouveau puis conservées à TA.

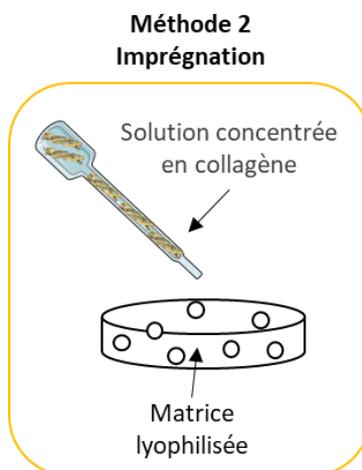


Figure 39 : Schéma de la méthode d'incorporation du collagène

Deux formulations ont ainsi été obtenues avec le collagène incorporé *in situ*, référencée **MPuD_(50:50)COLLx** et le collagène imprégné, référencée **MPuD_(50:50)COLLi**.

III.4.b) Synthèse de systèmes combiné : molécule A/Collagène

Une co-incorporation molécule A avec du collagène est étudiée dans la formulation « MPuD_(50:50)2.25 ». Deux méthodes d'incorporation décrites aux §III.3) et §III.4), soit « *in situ* » et par imprégnation, sont utilisées permettant d'obtenir 4 systèmes combinés (Tableau 11).

III.4.b.i) Système 1 : MPuD_(50:50)AxCOLLi

La molécule A est incorporée dans la solution de polysaccharides à 2,2% (m/v). Les matrices synthétisées suivant le procédé décrit en §III.1) et §III.2) sont lyophilisées puis imprégnées par la solution de collagène concentrée (Figure 40). Les matériaux sont neutralisés à pH7,4 par du PBS 1X puis lyophilisés et conservés à TA.

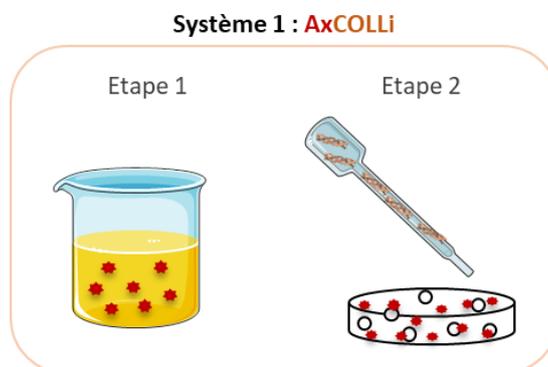


Figure 40 : Schéma de la co-incorporation du système combiné 1

III.4.b.ii) Système 2 : MPuD_(50:50)AxCOLLx

Cette combinaison résulte de l'introduction simultanée de 2,2 % (m/v) de composé A et de solution de collagène dans la solution de polysaccharides (Figure 41). La solution est ensuite réticulée comme décrit précédemment (Figure 33), les matrices neutralisées, rincées puis lyophilisées pour conservation à TA.

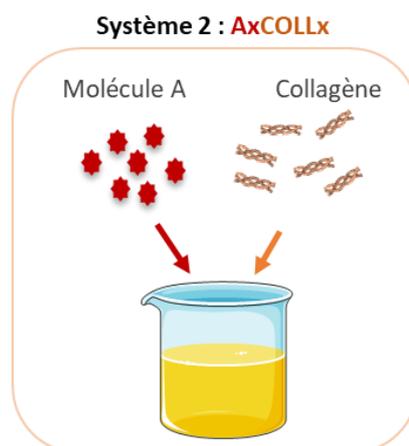


Figure 41 : Schéma de la co-incorporation du système combiné 2

III.4.b.iii) Système 3 : MPuD_(50:50)AiCOLLi

Dans ce système combiné, les deux composants ont été ajoutés dans la matrice lyophilisée (Figure 42). Les matrices sont d'abord imprégnées par 0,2µl/100mg de solution de collagène 0,5 mg/mL puis neutralisées à pH 7,4 par du PBS 1X. Elles sont ensuite immergées à un ratio de 1 :10 dans

une solution concentrée à 5mg/mL d'actif A pendant 24h à 4°C avant d'être lyophilisées et conservées à TA.

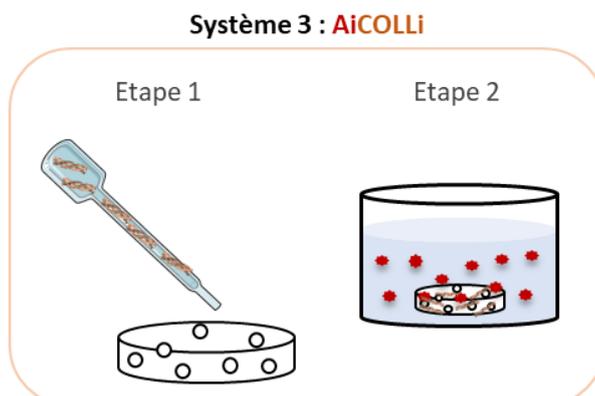


Figure 42 : Schéma de la co-incorporation du système combiné 3

III.4.b.iv) Système 4 : MPuD_(50:50)AiCOLLx

Dans cette formulation, 0,2 % (m/v) de solution de collagène sont directement ajoutés dans la solution de polymères (Figure 43). Après réticulation, les matrices neutralisées rincées et lyophilisées sont hydratées par la solution de composé A. Les hydrogels sont lyophilisés pour conservation à TA.

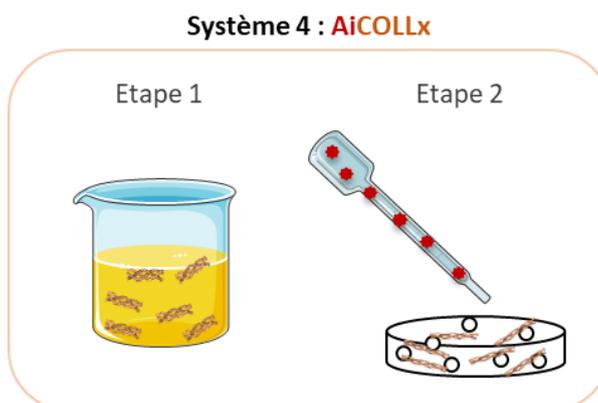


Figure 43 : Schéma de la co-incorporation du système combiné 4

Tableau 11 : Tableau récapitulatif des compositions en molécule A et collagène des systèmes combinés

Nom	Concentrations finales	
	Molécule A	Collagène
MPuD _(50:50) 2.25 AxCOLLi	2,2% (m/v)	0,02% (v/m)
MPuD _(50:50) 2.25 AxCOLLx	2,2% (m/V)	0,2% (m/v)
MPuD _(50:50) 2.25 AiCOLLi	10% (v/v)	0,02% (v/m)
MPuD _(50:50) 2.25 AiCOLLx	0,022% (v/m)	0,2% (m/v)

III.4.c) Fonctionnalisation par des charges positives

III.4.c.i) Introduction de charges positives

Afin de modifier les propriétés de libération des molécules par la matrice, des charges positives sont greffées dans le réseau de polymères. Pour cela, du dextrane modifié (D+) a été choisi. Il est utilisé dans la formulation des hydrogels par remplacement du dextrane non modifié dans les formulations $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25$ et $\mu\text{PuD}_{(50:50)}2.25$ (Tableau 8). Les matrices obtenues sont dénommées $\mu\text{PuD}^+_{(75:25)}2.25$ et $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}2.25$.

III.4.c.ii) Incorporation de la molécule B

Pour étudier l'effet de la fonctionnalisation sur la rétention de molécules, le composé B est incorporé dans les formulations « $\mu\text{PuD}^+_{(75:25)}2.25$ » et « $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}2.25$ » par diffusion inverse (§III.3.b) Figure 36). Les formulations obtenues sont référencées « $\mu\text{PuD}^+_{(75:25)}2.25$ Bd » et « $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}2.25$ Bd »

IV] Propriétés physico-chimiques

IV.1) Morphologie

IV.1.a) Structure et surface

IV.1.a.i) Microscopie électronique à balayage (MEB)

La structure interne et la surface des matrices lyophilisées sont analysées en utilisant un microscope électronique à balayage (JOEL CarryScope) sous vide partiel 10^1Pa . Les échantillons lyophilisés sont coupés transversalement et longitudinalement avec une lame de rasoir et observés avec un mode électron secondaire BED-C à un voltage de 20 kV.

Pour l'observation du collagène les formulations « $\text{MPuD}_{(50:50)}$ », « $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{COLLx}$ » et « $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{COLLi}$ » sont recouvertes d'or pendant 1 min sous vide (Smart coater, DII-29030SCTR). Les échantillons sont ensuite observés au MEB sous vide total (10^{-4} à 10^{-2} Pa) avec un mode SED à 10 kV.

IV.1.a.ii) Microscopie électronique à balayage environnemental

Des analyses de surface à l'état hydraté sont également réalisées sur les formulations $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$, et $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}$ grâce à un microscope électronique à balayage environnemental (Philips XI30 ESEM-FEG, SAPC de l'UTC Compiègne). Les matrices lyophilisées hydratées dans de l'eau déionisée sont placées sur un support en silicone, puis laissées quelques minutes sécher à l'air avant observation sous vide à un voltage de 20 kV.

IV.1.b) Porosité

Pour observation en fluorescence, les matrices sont préparées par introduction de 1% (m/v) de dextrane FITC (500 kDa) dans la solution de polysaccharides avant synthèse (Figure 33, étape 1). Les échantillons sont hydratés dans du PBS 1X, puis analysés en microscopie confocale (Carl Zeiss® LSM 780, objectif 10x). Des acquisitions $2.10^6 \mu\text{m}^2$ de surface et de $150\mu\text{m}$ d'épaisseur sont ensuite réalisées sur quatre échantillons par formulation. La quantification de la porosité est réalisée avec le logiciel ImageJ® après ajustement des histogrammes (Otsu) et transformation en image binaire.

IV.2) Caractérisation des propriétés physico-chimiques

IV.2.a) Taux de gonflement

Le taux de gonflement représente la capacité de l'hydrogel à se gonfler d'une phase sol. Ce rapport est évalué par la pesée d'une matrice lyophilisée. Cette matrice est ensuite immergée soit dans un tampon PBS soit dans de l'eau déionisée pendant 10j à TA pour s'assurer d'un gonflement à l'équilibre. La matrice à l'équilibre est prélevée, l'excès de liquide éliminé et la masse mesurée. Le taux de gonflement est calculé par la relation suivante [301] :

$$G = \frac{M_h - M_i}{M_i}$$

Avec « G » le taux de gonflement, « M_h » la masse de la matrice hydratée et « M_i » la masse de la matrice lyophilisée.

IV.2.b) Dosage de phosphore

La teneur en phosphore est quantifiée pour évaluer le taux de réticulation des hydrogels [296]. Le dosage est réalisé sur 50 mg d'échantillons lyophilisés, incubés dans 5ml d'acide nitrique (HNO_3) 8,7M à 105 °C pendant 4H. Puis 0,2 mL d' HNO_3 58,6M, 1mL de métavanadate d'ammonium 21mM et 1mL (v/v) d'heptamolybdate d'ammonium 40,5 mM sont successivement ajoutés à 0,5 d'hydrolysats QSP 5mL par de l'eau. La présence de phosphore est caractérisée par une coloration jaune des solutions et est mesurée à 405 nm par spectrophotométrie (Infinite M200 Pro, TECAN®). La teneur en phosphore est déterminée d'après la régression linéaire d'une gamme d'étalonnage d'acide phosphorique en 5 points de 0 à 400 $\mu\text{g}/\text{mol}$ d' H_3PO_4 ($R^2 > 0.99$).

IV.2.c) Dégradation enzymatique

Les matrices lyophilisées sont hydratées dans du tampon PBS pendant 10 jours à TA jusqu'à l'équilibre. Les échantillons sont pesés et placés dans des inserts cellulaires préalablement tarés (inserts CellCrown™24 Scaffoldex®, toile nylon de $100\mu\text{m}$). Les échantillons sont ensuite immergés dans une solution d'enzymes de pullulanase (91 U/mL) et de dextranase (3,8 U/mL) puis incubés dans une étuve

à 37°C sous agitation. Les matrices sont pesées toutes les 10 minutes après élimination d'excès de solution, jusqu'à ce qu'il n'y ait plus de perte de masse significative. Le taux de dégradation des matrices est calculé selon l'équation suivante :

$$M_t = \frac{M_e}{M_i} \times 100$$

Où « M_t » est le pourcentage de masse résiduelle au temps t , « M_i » est la masse initiale de l'échantillon hydraté et « M_e » est la masse pesée de l'échantillon. Le temps auquel il reste 50% de masse résiduelle ($t_{1/2}$) est déterminé par régression linéaire des courbes de dégradation.

IV.2.d) Tests mécaniques

Des disques d'hydrogel de 25 mm de diamètre et d'environ 1 mm de hauteur sont synthétisés pour effectuer les essais mécaniques après réhydratation à l'équilibre dans du sérum physiologique. Les tests de cisaillement en oscillation sont réalisés sur un Discovery HR2 (TA Instrument®) équipé d'une géométrie plan/plan jetable en aluminium (25 mm de diamètre). Du papier de verre imperméable (Dexter 600®) est fixé sur les géométries supérieure et inférieure avec du ruban adhésif double face. Les modules de stockage et de perte (respectivement G' et G'') des échantillons sont enregistrés *via* le logiciel TRIOS.

L'intervalle de linéarité des valeurs est déterminé par les tests suivants :

- (1) Compression : Augmentation progressive de la force normale appliquée de 0,1 à 1N. A chaque étape, une déformation de 0,1% est appliquée à une fréquence de 1Hz, (résultats en annexe 1).
- (2) Balayage d'amplitude : le domaine de déformation linéaire est étudié par application d'oscillations, d'amplitudes de déformation comprises entre 0,01 et 10%, à une fréquence constante de 1 Hz.
- (3) Balayage en fréquence : les G' et G'' sont mesurés à une plage de fréquences comprises entre 0,01 et 10Hz sous une contrainte de déformation de 0,1%

Les résultats des tests mécaniques sont présentés avec une force normale appliquée de 0,3N ($\pm 0,1$), une fréquence de 1Hz et 0,1% de déformation.

Les propriétés des différentes formulations sont évaluées et comparées sur un minimum de trois échantillons par formulation.

IV.3) Analyse de la fonctionnalisation

IV.3.a) Molécules A et B

Dans ces études, les formulations sont synthétisées par substitution totale des molécules (A ou B) par leur équivalent greffé à un fluorophore respectivement le A-DTAF et le B-FITC.

IV.3.a.i) Rendement d'incorporation

Pour connaître le rendement d'incorporation, les échantillons lyophilisés contenant les actifs fluorescents sont dégradés chimiquement dans des conditions alcalines. Ils sont placés à 0,1% (m/v) dans du NaOH 1M dans une étuve à 50°C pendant 4h. La concentration en fluorescence des lysats de matrice est mesurée par fluorescence (em/ex 495/530nm, Infinite M200 Pro, TECAN®). La concentration en molécule incorporée est déterminée par régression linéaire de la gamme d'étalonnage de A-DTAF ou B-FITC en 5 points, de 0 à 160µg/ml ($R^2 > 0,99$). Les résultats ont été moyennés sur 4 échantillons par formulation.

IV.3.a.ii) Libération *in vitro*

Afin d'étudier les propriétés de libération des composés incorporés dans les matrices, les matrices lyophilisées sont pesées puis immergées dans du PBS 1X préalablement incubé 30 min dans une étuve 37°C. L'ensemble est incubé à 37°C sous agitation pendant 24h. 50µL de surnageants sont prélevés aux temps 15min, 30 min, 1h, 2h, 4h, 6h et 24h. Ces échantillons sont dilués au 10^e dans du PBS puis analysés en fluorescence (em/ex 495/530nm, Infinite M200 Pro, TECAN®). Trois échantillons par formulation ont été étudiés.

La concentration de molécule active libérée est déterminée par régression linéaire de la courbe d'étalonnage en 5 points de A-DTAF ou B-FITC, de 0 à 50 µg/mL ($R^2 > 0,99$) réalisée pour chaque temps de prélèvement. Les valeurs des quantités libérées sont normalisées par rapport aux rendements d'incorporation (§IV.3.a.i).

IV.3.b) Collagène

La répartition du collagène dans les formulations « MPuD_(50:50) » « MPuD_(50:50)COLLx » et « MPuD_(50:50)COLLi » (§III.4.a) est étudiée.

IV.3.b.i) Coloration rouge Sirius

L'incorporation de collagène dans les matériaux est évaluée par coloration au rouge Sirius. Les matrices lyophilisées sont hydratées par une de solution de rouge Sirius pendant 45 min à TA. Après

avoir enlevé l'excès de colorant, les matrices réhydratées sont rincées 3 fois par heure avec du PBS 1X à 3,5% (v/v) à TA puis conservées à 4°C. La présence de collagène à l'intérieur des matériaux est déterminée macroscopiquement par leur coloration rouge et microscopiquement par fluorescence (Ex/Em : 560/630 nm, [302]) (Zeiss LSM 780, objectif 10x). La quantité de collagène a été évaluée qualitativement par la surface occupée par le signal fluorescent des formulations « MPuD_(50:50)COLLi1%, COLLi MPuD_(50:50)0,5% et MPuD_(50:50)COLLi0,1% ». L'analyse est réalisée par le logiciel ImageJ® après ajustement des histogrammes (Otsu) sur 3 échantillons pour chaque formulation.

IV.3.b.ii) Génération de seconde harmonique

Afin d'analyser l'organisation du collagène, la génération de second harmonique (SHG) est observée par microscopie biphotonique (Leica SP8, objectif 25x). La SHG est un signal émis par les collagènes fibrillaires à 440nm suite à une excitation à 880nm par un laser femtoseconde [303]. Pendant l'analyse, les échantillons sont maintenus hydratés par du gel échographique.

IV.3.c) Charges positives

La quantité de groupements dans les matrices est mesurée par analyse élémentaire (service de microanalyse I.C.S.N), résultats non montrés. Le pourcentage en poids apporté par la modification du dextrane dans les formulations « $\mu\text{PuD}^{+}_{(75:25)}2.25$ » et « $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}2.25$ » (§III.4.c) est déterminé en utilisant une méthode de combustion avec détection catharométrique (CHNS Vario EL III, Analyseur Élémentaire). Après réticulation, neutralisation et rinçage, les hydrogels sont broyés avant d'être lyophilisés pour analyse. Le résultat est comparé à la teneur théorique dans les formulations calculées d'après le degré de substitution du dextrane modifié.

V] Etudes cellulaires

V.1) Culture cellulaire

Les formulations étudiées sont toutes préalablement traitées 45 min sous UV avant mise en contact avec les cellules.

Tableau 12 : Tableaux des produits pour la préparation des milieux de culture

Nom	Fournisseur	Référence
MEM	Gibco™	41090-028
SVF	Gibco™	26140079
Sérum de chèvre	Sigma®	G9023
Streptomycine/pénicilline	Corning®	30-001-CI
Amphotéricine B	Gibco™	15290-26
Epilife	Gibco™	MEPI500CA
HKGS kit	Gibco™	S001K

Tableau 13 : Liste des kits et réactifs pour réaliser les immunomarquages

Nom	Fournisseur	Référence	Dilution
LDH	Sigma®	TOX7 kit	1/3 (v/v)
Live/dead	In Vitrogen®	R37601	1/4 (v/v)
Reszurin	Sigma®	TOX8-1KT	10% (v/v)
Cristal violet	Sigma®	V5265	1% (v/v)
Dapi	Fisher®	D1306	0,1µg/mL
Phalloïdine A488	Invitrogen®	A12379	25 µg/mL
Phalloïdine A555	Invitrogen®	A34055	1/100 ^e (v/v)
Collagène 3	Sigma®	C7805	2/200 ^e (v/v)
Fibronectine	Sigma®	F0916	1/250 ^e (v/v)
Acide hyaluronique	Merck®	385911	1/100 ^e (v/v)
Alexa 488 anti-mouse	Fisher®	A11017	1/400 ^e (v/v)
Straptavidine Alexa 488	Jackson	016-540-084	1/200 ^e (v/v)
Dako antibody diluent	Agilent technologies	S080983-2	QSP

V.1.a) Cellules

Les fibroblastes et kératinocytes utilisés sont des cellules primaires isolées à partir de prélèvements de peau chez des patients sains grâce à des accords mis en place entre Silab et la Clinique des Cèdres.

V.1.a.i) Fibroblastes (FHN)

Les fibroblastes dermiques papillaires sont isolés à partir de tissus mammaires humains adultes. Ils sont conservés à -150°C à passage 2 puis amplifiés jusqu'à passage 5 pour les études *in vitro*. Le milieu de culture utilisé est composé de milieu minimum essentiel de Eagle (MEM) supplémenté à 10% (v/v) par du sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 1% (v/v) de streptomycine/pénicilline et 0,1% d'amphotéricine B (v/v) (Tableau 12).

V.1.a.ii) Kératinocytes (KHN)

Les kératinocytes sont isolés à partir de tissus mammaires humains adultes. Ils sont conservés à -150°C à passage 1 puis amplifiés jusqu'à passage 3 pour les études. Le milieu de culture utilisé est composé de milieu Epilife mélangé à un kit HKGS supplémenté à 10% (v/v) par du sérum de veau foetal (SVF) décomplémenté, 1% (v/v) de streptomycine/pénicilline et 0,1% d'amphotéricine B (v/v) (Tableau 12).

V.1.b) Conditions d'ensemencement

V.1.b.i) Culture 2D

Ces études sont réalisées avec des fibroblastes humains (FHN). Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits traitées pour la culture cellulaire (Costar®) à une densité de 15 000 cellules par puits pendant 24h avant analyse. Des contrôles sont ajoutés aux conditions étudiées :

- Contrôle de toxicité « Ctrl négatif » : induction de mort cellulaire par addition de triton 0,1X pendant 10 minutes à 37°C dans les puits.
- Contrôle sans matériaux « Ctrl positif »: milieu de culture mis en contact du milieu neuf non pré-incubé avec des matériaux.

V.1.b.ii) Migration 2D

Les FHN ont étéensemencés dans des chambres de culture double (Ibidi®, Ref. 81176) à une densité de 86 cellules/ μ L/chambre. Les cellules subissent ensuite une période de sevrage de 24h par incubation avec du milieu de culture enrichi à 1% en SVF.

V.1.b.iii) Culture 3D

Les matrices sontensemencées par hydratation des matériaux lyophilisés avec une suspension cellulaire de densité de 250000 cellules par matériaux (FHN et KHN). Les échantillons sont placés dans des plaques de culture non traitées (costar®) incubés à 37°C avec 5% CO₂ pendant 4 à 8 jours.

V.1.b.iv) Fixation des cellules

Les matériauxensemencés et les tapis cellulaires 2D sont fixés avec du formaldéhyde 4% (FA, formaline 10%) pendant 30 minutes à 4°C. Les échantillons sont ensuite rincés 3 fois 15 min par du PBS 1X puis conservés à 4°C.

V.2) Etudes de cytotoxicité

V.2.a) Tapis cellulaire 2D

Du milieu de culture est pré-incubé avec les matériaux pendant 24h à 37°C et 5% de CO₂. Le milieu pré-incubé, duquel les matrices sont retirées, est ensuite mis en contact avec le tapis cellulaire.

V.2.a.i) Mesure de la lactate déshydrogénase

Pour chaque condition étudiée, 300 μ L de milieu sont prélevés après les 24h de contact. Les surnageants sont stockés à -80°C jusqu'à utilisation. Les réactifs (enzyme, substrat et révélateur) du kit de lactate déshydrogénase (Tableau 13) sont mélangés à un ratio de 1:3. 100 μ L de surnageants par puits sont incorporés avec 50 μ L de la solution reconstituée, l'ensemble incubé 20 min à TA.

La LDH est une enzyme libérée par les cellules endommagées. Elle réduit les sels de tétrazolium en formazan (produit rouge) contenu dans le kit. La réaction est stoppée par l'addition

d'HCl 1N. La coloration rouge est mesurée par spectrophotométrie à 490 nm (Infinite M200 Pro, TECAN®). Le pourcentage de cytotoxicité est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ Cytotoxicité} = \frac{(Do \text{ Echantillon} - Do \text{ Ctrl Positif})}{(Do \text{ Ctrl Négatif}) - (Do \text{ Ctrl Positif})}$$

Avec : « Ctrl positif » contrôle de sans matrice et « Ctrl négatif » contrôle de mort cellulaire (§V.1.b.i)

V.2.a.ii) Live-dead

Le bromure d'éthidium et la calcéine du kit sont reconstitués comme décrit par le fabricant. Le mélange est ensuite dilué au ¼ avec du milieu de culture puis réparti dans les puits contenant les tapis cellulaires. L'ensemble est incubé 15 min à 37°C et 5% CO₂. Les puits sont rincés avec du milieu complet avant d'être observés au microscope (Zeiss AxioCam 208, objectif 10x). Des images de 10,7.10⁶µm par 13,4.10⁶µm sont acquises avec deux laser : em/ex 488/515 nm pour la calcéine et 570/602 nm pour le bromure d'éthidium.

La proportion de mort et vie cellulaires est calculée avec le logiciel ImageJ® : les cellules vivantes (vertes) et les cellules mortes (rouges) sont comptées séparément après ajustement des histogrammes (Otsu). Le rapport est calculé par la relation suivante :

$$\text{Viabilité cellulaire (\%)} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre de cellules total}} \times 100$$

V.2.b) Activité métabolique

L'évolution de l'activité métabolique des FHN ensemencés en 3D dans les matériaux (voir §V.1.b.iii) est évaluée à l'aide d'un kit à base de résazurine (Tableau 13). Aux jours 1, 4 et 8 de culture cellulaire, 10% (v/v) de réactifs sont mélangés à du milieu de culture et mis à incuber 4h avec les matériaux (37°C avec 5% de CO₂). En présence de cellules vivantes la résazurine, violette, est réduite en résosufurine qui donne une coloration rose, mesurable par fluorescence (ex/em : 560/590 nm, infinite pro Tecan®). Après analyse, les matrices sont soit remises en culture soit fixées et conservées à 4°C pour observation en microscopie. L'activité métabolique est quantifiée par régression linéaire à partir d'une gamme d'étalonnage en 5 points (R²>0,98) de 0 à 10 000 cellules. Les valeurs des jours 4 et 8 sont rapportées par rapport à la valeur obtenue au J1 après ensemencement. Un minimum de 3 échantillons est étudié pour chaque formulation par jour d'analyse.

V.3) Migration

Après avoir retiré les chambres de cultures (§V.1.b.ii), le milieu pré-incubé avec les formulations est mis en contact pendant 24h avec les tapis cellulaires de migration. Les cellules sont ensuite

marquées au cristal violet pendant 10 min puis rincées 3 fois à l'eau courante. Les images sont acquises par microscopie (Zeiss Axiocam 208, objectif 10x). Les mesures de migration ont été réalisées par mesure des aires séparant les fronts des tapis cellulaires grâce à un programme interne à l'entreprise Silab®.

V.4) Immunomarquages

Les matériauxensemencés en culture 3D par les FHN et FHN sont fixés aux temps 4 et 8 jours.

V.4.a) Marquages Dapi/phalloïdine

Les cellules fixées sont perméabilisées par une solution de triton 100X 0,1% et sérum de chèvre 5% pendant 1h30 à TA, sous agitation. Les cellules sont ensuite incubées toute la nuit dans une solution contenant du DAPI (Diamidino-Phényl-Indol), de la phalloïdine (488 ou 555) et 5% de sérum (Tableau 13). La solution de marquage est éliminée par 3 lavages de 5 min au PBS 1X puis les matériaux sont observés à l'aide d'un microscope à fluorescence confocale (Carl Zeiss LSM 700, objectif 10x). Les acquisitions sont réalisées avec le logiciel ZEN® et traitées par le logiciel ImageJ®.

V.4.b) Immunomarquages (anticorps primaires et secondaires)

Tous les marquages sont réalisés suivant le même protocole et en association avec le marquage au Dapi. Comme décrit précédemment, les échantillons sont perméabilisés par une solution de triton 100X 0,1% et sérum de chèvre 5% pendant 1h30 à TA, sous agitation. Les échantillons sont ensuite incubés avec la solution d'anticorps primaires, dilués dans du Dako Antibody Diluent, à 4°C sous agitation, sur la nuit. La solution de marquage est éliminée par 3 lavages de 5 min au PBS 1X. Les matériaux sont ensuite incubés dans la solution d'anticorps secondaires diluée (Dako Antibody Diluent) pendant 2h à TA sous agitation. Enfin, après élimination de la solution de marquages par 3 lavages, les matrices sont observées à l'aide d'un microscope à fluorescence confocale (Carl Zeiss LSM 700, objectif 10x). Les acquisitions sont réalisées avec le logiciel ZEN® et traitées par le logiciel ImageJ®.

VI] Études *ex vivo* : Pénétration transcutanée (PTC)

Les études de pénétration transcutanée (PTC) consistent en l'évaluation de la capacité d'un actif à traverser la barrière cutanée (ligne directrice OCDE 428). L'étude est réalisée à Silab dans des cellules de Franz (Figure 46) sur de la peau de cochon.

VI.1) Préparation des peaux

VI.1.a) Prélèvement des peaux

Des oreilles de porc sont récupérées quelques heures après sacrifice des animaux. La partie externe de l'oreille est prélevée par séparation du cartilage en évitant de prélever du tissu graisseux, des fibres musculaires ou des vaisseaux sanguins. Chaque peau est tondue et nettoyée avec du PBS 1X puis découpée en plusieurs disques de 4cm de diamètre.

VI.1.b) Résistance transépithéliale (TEER)

La TEER (Millicell®, ERS-2 AC power source) est une technique permettant de mesurer quantitativement l'intégrité de la barrière cutanée [304]. La résistance transépithéliale (R_{te}) est déterminée par une modification de voltage (ΔV) au travers d'une membrane après application d'un courant alternatif (ΔI), mesuré grâce à une paire d'électrodes connecté à un voltmètre (Figure 44) [305]. La relation est décrite par l'équation suivante :

$$R_{te} = \frac{\Delta V}{\Delta I} [306]$$

Plus la valeur de la TEER est grande, plus la peau est considérée comme intègre, à l'inverse, plus elle est basse, plus la peau est perméable. Cette technique est ici utilisée pour valider les échantillons de peau saine sélectionnés avant dégradation, et dont la valeur doit être supérieure à 3 K Ω [307].

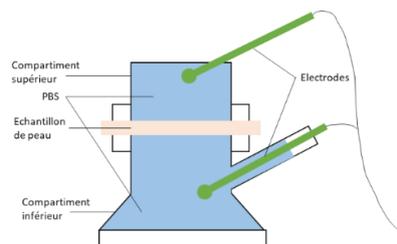


Figure 44 : Schéma du montage pour mesure de la TEER

VI.2) Altération de la barrière cutanée

Deux méthodes d'altération des peaux ont été choisies suite à des études préalables de dégradation réalisées dans l'entreprise Silab à savoir un cycle de congélation/décongélation et des microperforations.

VI.2.a) Cycle de congélation/décongélation

Les peaux sont congelées directement après avoir été prélevées sur les oreilles pendant 1 semaine à -20°C. Elles sont décongelées à 4°C pendant 3h avant utilisation.

VI.2.b) Micro-perforations

Pour réaliser ces micro-perforations, un dermaroller (Zgts-0.3 MM) à aiguille de longueur 0,3 mm (Figure 45) est appliqué. Ce dispositif est utilisé en cosmétique pour augmenter la pénétration des actifs dans la peau par altération de la barrière épithéliale. Vingt passages de dermaroller sont ainsi réalisés sur chaque échantillon de peau décongelée.



Figure 45 : Illustration d'un « dermaroller »

VI.2.c) Caractérisation des méthodes d'altération

L'effet des méthodes de l'altération sur l'intégrité de la fonction barrière est évalué par mesure des valeurs de TEER. Elles sont relevées après chaque étape d'altération (§VI.1.b). Trois échantillons par condition, peau saine ou altérée, sont évalués.

VI.3) Etude de libération

VI.3.a) Préparation des échantillons

Pour pouvoir évaluer la rétention des molécules dans les différents compartiments de la peau et de la cellule de Franz, les composés marqués A-DTAF et B-FITC sont utilisés lors de la synthèse des matrices pour un suivi en fluorescence de la libération.

VI.3.a.i) Formulation crème

La formulation crème est la formulation de référence développée par Silab pour les études de PTC. La concentration en ingrédient actif incorporée a été calculée d'après le rendement retrouvé dans les formulations en hydrogel (voir §III.3). Elles sont référencées Cr-A et Cr-B et contiennent respectivement les composés A-DTAF et B-FITC.

VI.3.a.ii) Formulations biomatériaux

Les matrices « $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Ax}$ », « $\text{MPuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Ax}$ », « $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25 \text{ Ad}$ », sont étudiées en PTC. Les hydrogels font 1,3 cm de diamètre afin de s'insérer facilement dans le compartiment donneur de la cellule de Franz.

VI.3.b) Montage du système

VI.3.b.i) Mise en place des peaux

Après avoir été altérées, les peaux sont placées dans les cellules de Franz (Figure 46) de façon à ce que la face dermique soit en contact avec une solution réceptrice située dans le compartiment receveur. Cette dernière est composée de PBS 1X supplémenté en antibiotiques (2% (v/v) penicilline/streptavidine et 0,2% (v/v) fungizone).

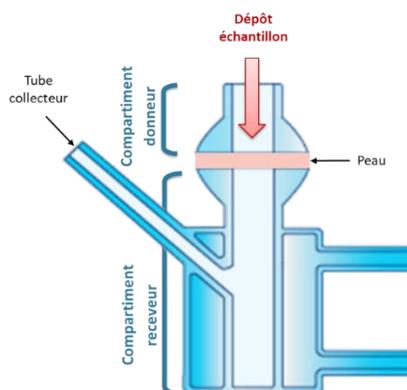


Figure 46 : Montage cellule de Franz

VI.3.b.ii) Formulations

Les formulations sont disposées dans les compartiments donneurs des cellules de Franz, sur la face épidermique de la peau :

- Soit 180 μ L de crème par cellule de Franz
- Soit 1 biomatériau par cellule de Franz, hydraté par 500 μ L de sérum physiologique après insertion

VI.3.b.iii) Temps d'analyse

Les études sont réalisées dans un bain thermostaté à 37°C incubés pendant 15h. Les tests sont réalisés sur un minimum de six échantillons par formulation.

VI.3.c) Traitement des échantillons

VI.3.c.i) Matériaux

Les échantillons crème sont récupérés à l'aide d'une spatule et d'un coton-tige sec. Le prélèvement est dissous dans du PBS et homogénéisé par ultrasons (Emag®, Emmi H22) pendant 30 min. Les matériaux récupérés sont dégradés par une solution de NaOH 1M à 50°C pendant 2H. L'hydrolysat résultant est mélangé à la pipette.

VI.3.c.ii) Peau

Le derme et l'épiderme des échantillons de peaux sont séparés mécaniquement après 2min30 dans un bain marie à 70°C. Ils sont ensuite placés dans du PBS, chauffés 2 minutes à 60°C, placés 30 min aux ultrasons et mis sous agitation 30 min à 200 rpm.

VI.3.c.iii) Sous-nageant

Un prélèvement de 500 µL de la solution du compartiment receveur est réalisé *via* le tube de prélèvement de la cellule de Franz.

VI.3.c.iv) Analyse

Les échantillons récupérés sont analysés par mesure de fluorescence (em/ex 495/530nm, Infinite M200 Pro, TECAN®). La quantification des actifs délivrés est évaluée par comparaison avec la gamme d'étalonnage de molécules fluorescentes (A-DTAF ou B-FITC) en 5 points, adaptées à chaque compartiment ($R^2 > 0.99$) :

- Gamme crème : de 0 à 70 µg/mL
- Gamme matrices : de 0 à 120 µg/mL
- Gamme épiderme/derme : 0 à 10 µg/mL
- Gamme sous-nageant : 0 à 14 µg/mL

Les résultats sont exprimés en pourcentage de fluorescence par rapport à la quantité de molécule déposée initialement.

VII] Expérimentation animale

VII.1) Modèles animaux

Les expérimentations animales ont été approuvées par le ministère de l'enseignement supérieur, de la recherche et de l'innovation (projets n°18569 et 17840). Elles ont été réalisées à l'INSERM. Aucun des résultats *in vivo* ne sera utilisé par Silab ni directement pour l'exploitation des matrices fonctionnalisées, ni pour étudier les produits A et B. Une exploitation potentielle sera prise en charge par la société Siltiss.

Toutes les expériences sont réalisées sur animaux rasés et anesthésiés : dans un premier temps, le dos est tondu puis de la crème dépilatoire (Veet®) est déposée en couche épaisse pendant 1 min. Les zones traitées sont ensuite lavées au sérum physiologique et désinfectées à la Bétadine.

Tableau 14 : Liste des médicaments utilisés

Nom	Indication	Concentration		Voie d'administration
		Rat	Souris	
Bétadine	Antiseptique	-	-	Topique
Chlorhexidine 0,5%	Antiseptique	-	-	Topique
Kétamine	Anesthésique	-	100mg/kg	Intrapéritonéal
Xylazine	Anesthésique	-	10mg/kg	Intrapéritonéal
Isoflurane	Anesthésique	Induction 5% Maintien (1,5-3%)	-	Respiratoire
Buprénorphine	Analgésique	0,01 mg/kg	0,05 mg/kg	Sous-cutané

VII.1.a) Modèle de plaie chez le rat

Afin d'étudier la libération de la molécule A-99mTc, les formulations « $\mu\text{PuD}_{(75:25)}\text{3Ai}$ », « $\mu\text{PuD}_{(75:25)}\text{1.5Ai}$ », « $\text{MPuD}_{(75:25)}\text{3Ai}$ » et « $\text{MPuD}_{(75:25)}\text{1.5Ai}$ » sont étudiées sur deux modèles de plaies cutanées chez le rat (wistar) : abrasion chimique et excision de la peau. La molécule A-99mTc est déposée seule ou imprégnée (voir §III.3.c) sur des matrices de 1mm d'épaisseur de 5mm de diamètre, apposées dans les plaies (Figure 47). Les échantillons sont enlevés et les zones de peau décontaminées à l'aide d'une crème spécifique (Decon 90®) avant visualisation au TEMP. Deux échantillons par condition et par modèle sont étudiés.

VII.1.a.i) Abrasion chimique

Après anesthésie des animaux, 6 carrés de 5x5mm sont découpés sur un pansement adhésif semi-perméable (Tégaderm™) collé sur le dos des rats laissant apparaître 6 sites de peau non protégés. Après une injection sous-cutanée de buprénorphine, 30 μL d'acide phosphorique 99,9% est déposé dans ces fenêtres pendant 15 min pour provoquer une brûlure chimique. Ces plaies sont nettoyées à l'aide du sérum physiologique. Les échantillons sont ensuite déposés sur les plaies pendant 2h avant acquisition au TEMP (Figure 47).

VII.1.a.ii) Excision totale de peau

Après anesthésie des animaux et injection de buprénorphine, 6 excisions sont réalisées au niveau dorsal. Ces plaies de profondeur totale sont réalisées par un punch à biopsie de 5 mm de diamètre (Ref. A44717). Les échantillons sont placés au sein des plaies pendant 2h avant acquisition au TEMP (Figure 47).

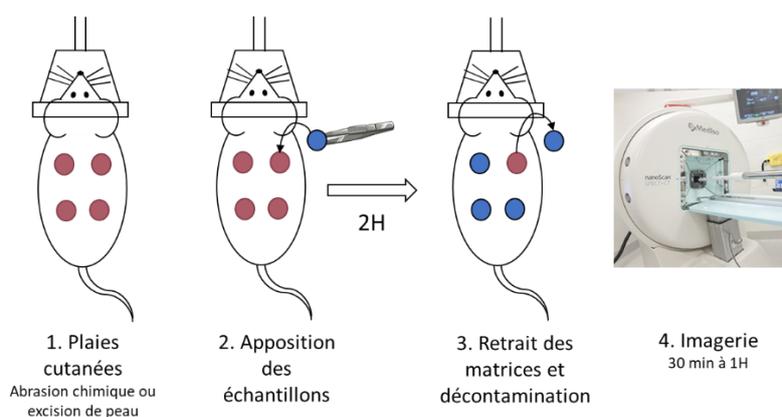


Figure 47 : Procédure expérimentale de plaie cutanée chez le rat

VII.1.b) Modèles chez la souris

Les études chez la souris sont réalisées sur des souris C57BL/6J avec des matériaux de 250 μ m d'épaisseur de 5mm de diamètre.

VII.1.b.i) Implantation sous cutanée chez la souris

Pour étudier la biocompatibilité et biodégradabilité *in vivo* des formulations sélectionnées sont implantées en sous-cutané sont réalisées [308]. Après anesthésie, des poches sous-cutanées sont créés à partir de petites incisions dans la partie dorsale supérieure de la souris. Les formulations « MPuD_(50:50) », MPuD_(50:50)COLLi, MPuD_(50:50)AxCOLLi, μ PuD_(50:50) » lyophilisées et « Intégra » sont insérées dans les poches. Les ouvertures sont ensuite refermées par des points de sutures. De la buprénorphine est administrée en peropératoire pour soulager la douleur. Cinq souris par groupe ont été observées pendant 8 semaines.

VII.1.b.ii) Plaie cutanée chez la souris

Un modèle de cicatrisation chez la souris [309] a été mis en place. Ce modèle est utilisé pour une étude de libération des composés A et B à 2h, et 4 jours et sur la cicatrisation après 7 jours d'implantation.

- Pour les études de suivi des molécules, les molécules marquées A-DTAF et B-FITC sont utilisées pour les synthèses. Les matrices « μ PuD_(75:25)2.25Ax, μ PuD_(75:25)2.25Ad et μ PuD_(75:25)2.25Bd ». Les formulations sont synthétisées au préalable avec 1% de dextrane TRITC.
- Les formulations « MPuD_(50:50) », MPuD_(50:50)COLLi, MPuD_(50:50)AxCOLLi, μ PuD_(50:50) » lyophilisées et le comparateur « Intégra » sont implantées jusqu'à J7 pour étudier la cicatrisation.

- **Court terme (2h)**

Après anesthésie, une excision totale de la peau est réalisée au niveau dorsal de la souris à l'aide d'un punch à biopsie (4 mm de diamètre). Les implants sont déposés au sein des plaies formées, après désinfection par de la chlorhexidine. Les animaux sont maintenus sous sédation pendant 2h grâce à une injection de kétamine 45 min post opératoire en sous-cutané.

- **Long terme (4 et 7j)**

Pour étudier la libération des molécules A et B et la cicatrisation des formulations sélectionnées, un modèle de cicatrisation plus adapté à du long terme est mis en place chez la souris. Après anesthésie des animaux, des zones de la peau sont excisées au niveau dorsal de l'animal à l'aide de punch à biopsie de 4 mm de diamètre. Pour éviter la fermeture de la plaie par contraction (processus physiologique chez la souris), des disques de silicone sont suturés autour de la plaie. Les zones opérées sont désinfectées puis les différentes formulations sont disposées au sein des plaies. L'ensemble du système est recouvert et protégé avec du Tegaderm® (Figure 48). Trois animaux par souris pour chaque groupe sont implantés pendant 4 jours, et 5 souris pendant 7 jours. Les animaux reçoivent une injection de buprénorphine en peropératoire pour soulager la douleur.

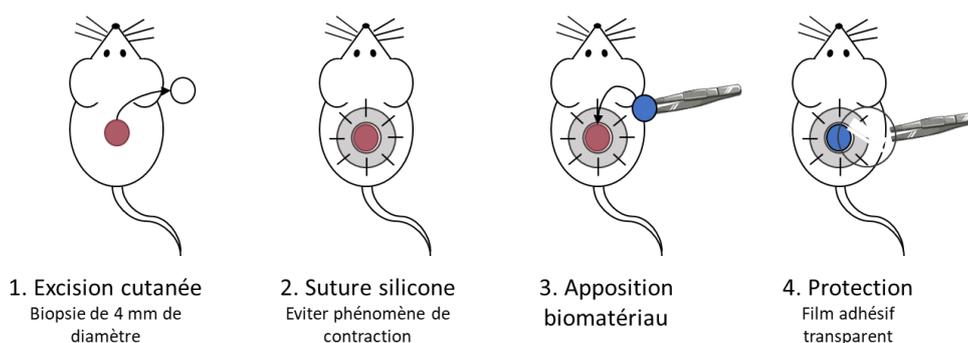


Figure 48 : Procédure expérimentale de plaie cutanée chez la souris

VII.2) Analyses des plaies *in vivo*

VII.2.a) Imagerie nucléaire : TEMP

Après deux heures de contact entre la plaie et les échantillons, ceux-ci sont retirés. Les animaux sont placés sous une caméra hybride (NanoSPECT/CT, Mediso, Hongrie), tomographie par émission monophotonique (TEMP) couplée à la tomographie par rayons X, équipée de collimateurs haute résolution multi-pinholes (matrice 256 x 256), une fenêtre d'énergie de 140 keV \pm 20% est utilisée. Une fois la scintigraphie réalisée, une tomographie haute résolution du corps entier (45 keV/ 145 mAs, taille matrice 256 x 256) est réalisée pour la localisation anatomique. La reconstruction des acquisitions TEMP et CT est réalisée à l'aide du logiciel Tera-Tomo (Mediso).

VII.2.b) Mesure de l'aire de la plaie

Des photos des plaies sont prises quotidiennement avec un repère métrique. L'évolution de l'aire des plaies au cours du temps est évaluée par mesure du diamètre des plaies suivant 3 axes. Les mesures ont été effectuées grâce au logiciel imageJ® après calibration des photographies. La fermeture des plaies est calculée d'après l'équation suivante [288] :

$$\text{Fermeture de la plaie (\%)} = \left(1 - \frac{\text{Aire Jt}}{\text{Aire J0}}\right) \times 100$$

Avec « Aire J0 », l'aire de la plaie induite initialement et « Aire Jt » l'aire de la plaie au jour du prélèvement

VII.3) Traitement des échantillons

VII.3.a) Récupération des échantillons de peau

Les souris sont sacrifiées par dislocation cervicale après anesthésie aux jours d'analyse et les rats par dose létale d'isoflurane (5%). Les zones d'intérêt sont excisées puis congelées dans de l'azote liquide (voir plus bas §VII.3.b) avec ou sans fixation préalable, respectivement pour les études de cicatrisation et libération. Pour la fixation, les échantillons sont directement immergés dans du FA 4% pendant 4 jours à 4°C. Ils sont ensuite rincés par 1mL de PBS 1X 3 fois pendant 30 min avant stockage à 4°C.

VII.3.b) Congélation

Les échantillons sont placés dans des moules (M475-3, Simport™ Scientific) puis immergés entièrement dans une solution de congélation (OCT). A l'aide d'une pince, la partie inférieure des moules est mise en contact avec la surface de l'azote liquide jusqu'à congélation complète de la solution. Les échantillons sont par la suite conservés à -80°C.

VII.3.c) Revêtement des lames par de la gélatine

Une solution de gélatine 1,75 % (m/v) est préparée dans de l'eau déionisée puis chauffée à 60°C pendant 5 min sous agitation. Dès que les 60°C sont atteints, 5% de glycérine (v/v) sont introduits au mélange. Des lames de verres (Starfrost, Knittel Glass®) sont immergées dans la préparation à base de gélatine durant 40min. Pour enlever l'excès de solution, les lames sont placées sur la tranche et mises à sécher pendant 3 jours à TA.

VII.3.d) Coupes histologiques

Les coupes histologiques sont réalisées à l'aide d'un microtome (Cryostat HM520, Microm®). Les échantillons sont placés à -20°C pendant 1h avant de réaliser les coupes. Des coupes de 12 µm

d'épaisseur sont effectuées puis prélevées tous les 100 μ m sur 4 lames par échantillon. Une partie des coupes est déposée sur des lames Superfrost+ (Thermoscientific®) et une autre sur des lames recouvertes de gélatine (§VII.3.c), l'ensemble est préservé à -80°C.

VII.4) Analyse des échantillons

Tableau 15: Lise des colorants et produits de montage

Nom	Fournisseur	Référence
Hematoxyline	Sigma Aldrich	MHS32
Eosine	Sigma Aldrich	HT1130316
Safran	RAL diagnostics	369200
Bleu Alcian	Reactif RAL	361180
Rouge nucléaire	Diapath	C0482
Rouge sirius	LMR	CL80115
Eukitt	Sigma Aldrich	03989
Milieu de montage DAPI	Abcam	ab104139

VII.4.a) Microscopie

Les images sont acquises par le logiciel Zen® et traitées par le logiciel ImageJ®.

VII.4.a.i) Analyse par fluorescence

Les explants de peau des études de libération, à 2h et 4 jours, sont maintenus hydratés grâce à l'ajout de quelques gouttes de PBS 1X pour observation microscopie confocale (Zeiss LSM 780, objectif 10x). Trois lasers sont utilisés pour les acquisitions : pour la matrice (ex/em : 561/630 nm), pour l'actif (ex/em : 488/521 nm) et pour l'ensemble en contraste interférentiel.

VII.4.a.ii) Marquage DAPI

L'infiltration cellulaire des matrices implantées dans le modèle sous-cutané chez la souris (§VII.1.b.i) est évaluée par la présence de noyaux. Les coupes sont montées entre lame et lamelle avec du milieu de montage au DAPI et scellées par du vernis (Covergrip®, Coverslip sealant). Les acquisitions en fluorescence sont réalisées par microscopie confocale (Zeiss LSM 780, objectif 40x, em/ex 405/538 nm). La quantification des noyaux dans les zones d'implantation est réalisée après ajustement des histogrammes (Otsu) et mesurée automatiquement par le logiciel ImageJ®. Le nombre de cellules est donné par 2500 μ m² et les images présentées en niveaux de gris inversés.

VII.4.b) Colorations histologiques

Toutes les lames sont séchées 2h à TA puis colorées à la pipette pour préserver l'intégrité des coupes. Des colorations hématoxyline/éosine avec ou sans safran et bleu alcian/rouge nucléaire sont réalisées. Elles sont ensuite imagées par un scanner de lames (Nanozoomer 2.ORS, Hamamatsu®).

VII.4.b.i) Hématoxyline/éosine (H/E)

Les explants de peaux de l'étude de cicatrisation à 7 jours, déposés sur les lames recouvertes de gélatine, sont fixées par de la FA 10% pendant 10 min. L'excédent de fixateur est enlevé et les échantillons sont colorés par la solution d'hématoxyline pendant 15 minutes. Après rinçages par du PBS 1X, les lames sont colorées par la solution d'éosine pendant 1 minute puis rincées au PBS 1X.

VII.4.b.ii) Hématoxyline/éosine/Safran (H/E/S)

Les peaux altérées, utilisées dans les études de PTC (§VI.2), sont observées en coloration HES. La triple coloration s'effectue en deux temps : coloration H/E comme décrit au paragraphe précédent (§VII.4.b.i) suivi d'une coloration par le safran. Pendant l'étape de déshydratation avant montage (§VII.4.b.iv), la solution de safran est ajoutée sur les coupes, après le bain d'alcool 90%, pendant 5 minutes. Les lames sont rincées dans de l'alcool 100% puis déshydratées par du xylène (voir §VII.4.b.iv).

VII.4.b.iii) Bleu alcian/rouge nucléaire (B/R)

Les explants de peaux d'implantation des matrices en sous cutanée sont colorés par une solution de bleu alcian pendant 30 minutes puis rincés au PBS 1X. Les coupes sont ensuite colorées par une solution de rouge nucléaire pendant 10 minutes et rincées.

VII.4.b.iv) Déshydratation et montage des lames

Les coupes sont déshydratées successivement dans 3 bains d'alcools (respectivement 70%, 90% et 100%) puis dans trois bains de xylène (respectivement 70%, 90% et 100%) de 1min30 chacun. Les échantillons sont montés entre lame et lamelle avec de l'Eukitt® puis laissés à sécher 24h à TA.

VIII] Statistiques

Toutes les données sont exprimées par leur moyenne \pm erreur standard (SD). Les analyses statistiques sont réalisées avec le logiciel Graphpad Prism® (V7). Les données sont analysées avec des tests non paramétriques de Mann-Whitney pour les comparaisons entre deux groupes ou Kruskal-Wallis pour les comparaisons de plus de 2 groupes. Les résultats sont considérés comme significatifs lorsque la « valeur p » est inférieure à 0,05. Les significativités sont définies par */# pour $p < 0,05$, **/## pour $p < 0,01$ et ***/### pour $p < 0,001$.

CHAPITRE III : FORMULATION D'UNE
PLATEFORME DE LIBERATION A PARTIR D'UNE
MATRICE POREUSE

Dans ce chapitre, le premier axe de travail repose sur le développement d'une plateforme de libération pour l'application cutanée. Un hydrogel de pullulane et de dextrane, développé au laboratoire [310], a été utilisé comme base technologique pour le chargement et la libération de molécules d'intérêt nommées A et B. Dans un premier temps, l'impact de la réticulation et de la porosité sur les propriétés des hydrogels ont été analysées. Dans un second temps, ces matériaux ont été fonctionnalisés par des composés actifs et les propriétés de libération ont été caractérisées.

I] Optimisation du support par des modifications physico-chimiques

Le premier objectif de cette étude a été d'étudier la possibilité de moduler les paramètres physico-chimiques à travers des modifications de réticulation et de porosité des hydrogels de pullulane/dextrane. Pour ce faire, des formulations ont été réalisées en faisant varier les concentrations en agent réticulant et en utilisant plusieurs agents porogènes. L'impact de ces modifications de synthèses sur les propriétés de l'hydrogel a par la suite été évalué.

I.1) Synthèse des formulations

I.1.a) Analyse de la morphologie

Des matrices de pullulane et de dextrane, PuD_(75:25), ont été synthétisées avec trois concentrations massiques de STMP 3%, 2.25 % et 1.5% (m/v) permettant d'obtenir respectivement les formulations PuD_(75:25)3, PuD_(75:25)2.5, PuD_(75:25)1.5. Deux méthodes de formation des pores ont été utilisées : par lixiviation des particules avec du NaCl (μ) et par dégagement gazeux avec du Na₂CO₃ (M). La composition finale de chacune des formulations est rappelée dans le Tableau 16.

Tableau 16 : Tableau récapitulatif des dénominations et composition des formulations étudiées

Nom	Ratio polysaccharides (m/m) 75 :25		Agent porogène		Concentration STMP (m/v)
	Pullulane (Pu)	Dextrane (D)	NaCl	Na ₂ CO ₃	
μ PuD _(75:25) 3	10,8%	3,6%	+	-	3 %
μ PuD _(75:25) 2.25	10,8%	3,6%	+	-	2,5 %
μ PuD _(75:25) 1.5	10,8%	3,6%	+	-	1,5 %
MPuD _(75:25) 3	12,6%	4,2%	-	+	3 %
MPuD _(75:25) 2.25	12,6%	4,2%	-	+	2,25 %
MPuD _(75:25) 1.5	12,6%	4,2%	-	+	1,5 %

Toutes les formulations synthétisées ont permis d'obtenir des hydrogels transparents à l'état hydraté et des matrices blanches et opaques après lyophilisation (Figure 49).

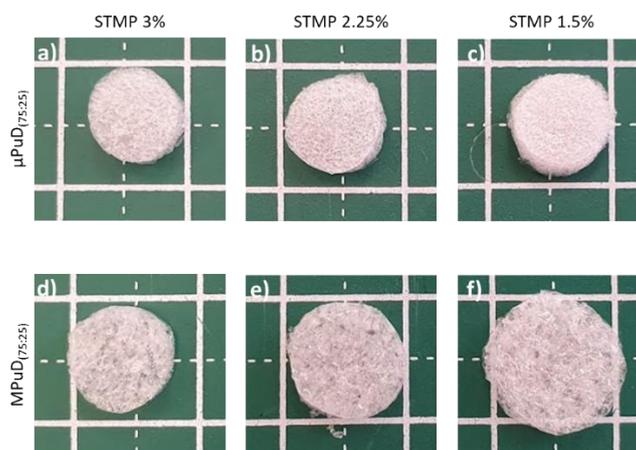


Figure 49 : Aspect macroscopique des matrices lyophilisées pullulane/dextrane 75:25 ($\text{PuD}_{(75:25)}$) synthétisées avec trois concentrations de STMP et deux agents porogènes.

A l'échelle macroscopique les matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ semblent plus denses que les matrices $\text{MPuD}_{(75:25)}$, c'est-à-dire avec une porosité plus faible. Les matrices les plus réticulées (Figure 49a et d) apparaissent de diamètre inférieur à celui des matrices les moins réticulées (Figure 49c et f) avec des diamètres d'environ 6,0mm, 7,0mm et 7,7mm respectivement pour les $\mu\text{PuD}_{(75:25)3}$, $\mu\text{PuD}_{(75:25)2,25}$ et $\mu\text{PuD}_{(75:25)1,5}$. Par ailleurs, le diamètre des hydrogels $\text{MPuD}_{(75:25)}$ est plus important que celui des hydrogels $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ à concentration en STMP équivalente, avec des diamètres de 10,1mm et 7,7mm respectivement pour les concentrations STMP1,5% (Figure 49c et f). Ces différences d'aspect entre les formulations apparaissent bien que les gels aient été découpés avec le même emporte-pièce après réticulation. Les variations en taille et densité s'acquièrent au cours des étapes de rinçage et d'élimination des agents porogènes. La conductimétrie des solvants finaux utilisés diffère entre les matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ et $\text{MPuD}_{(75:25)}$. En effet, le NaCl 0,025% et l'eau déionisée, sont respectivement utilisés pour le NaCl et le Na_2CO_3 et n'ont pas les mêmes forces osmotiques (respectivement $540\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ et $<10\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$). La concentration en STMP peut également induire un changement du taux de réticulation des matrices. Les capacités de gonflement peuvent alors être impactées et varient en fonction de la quantité introduite de STMP. Les structures résultantes seront alors conservées au moment de la lyophilisation.

Pour mieux caractériser ces différences macroscopiques, la microstructure interne des formulations a été analysée après lyophilisation. Les matrices ont été découpées dans le plan sagittal et observées en microscopie électronique à balayage (MEB) (Figure 50).

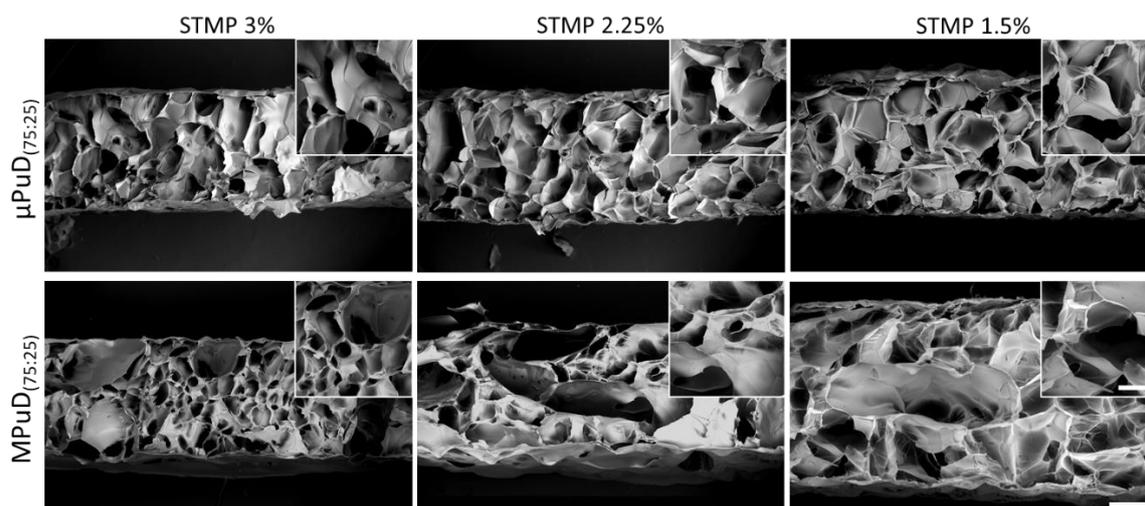


Figure 50 : Coupes sagittales des matrices de pullulane/dextrane observées au MEB (Joel Carryscope) préparées avec différentes concentrations de STMP et agents porogènes. Les formulations réalisées avec du NaCl représentent les images (a) à (c) et celles avec le Na_2CO_3 les images (d) à (f). Les formulations les plus concentrées en STMP sont représentées par les figures de gauche et les moins concentrées sont à droite. Echelle de 500 μm applicable aux images (a) à (f) et échelle de 250 μm applicable aux agrandissements (a') à (f').

Toutes les conditions possèdent une structure interne ouverte et poreuse (Figure 50). Les pores semblent s'ouvrir sur d'autres pores suggérant alors une structure interconnectée (Figure 50 a' à f'). Les matrices synthétisées avec du NaCl, nommées $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ (Figure 50a à c), présentent une distribution homogène de pores de forme circulaire. Les matrices réalisées avec du Na_2CO_3 , nommées $\text{MPuD}_{(75:25)}$ (Figure 50d à e) présentent plutôt deux types de porosité : des pores ronds semblables à ceux des formulations $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ et des plus gros pores allongés. Cette dernière porosité est le résultat du dégagement gazeux de CO_2 après dissociation du Na_2CO_3 en conditions acides lors du rinçage. L'aspect moins dense des matrices $\text{MPuD}_{(75:25)}$ observé macroscopiquement (Figure 49) pourrait également être dû à une augmentation de la fraction de porosité liée à cette deuxième architecture de pores.

I.1.b) Evaluation du taux de réticulation

La variation en agents porogènes et de la concentration en agent réticulant ont permis jusqu'ici d'observer deux types de porosité. Pour évaluer l'impact de la quantité de STMP introduite sur le taux de réticulation des hydrogels, deux paramètres ont été étudiés : la quantité de phosphore retrouvée dans les matrices et leur taux de gonflement.

I.1.b.i) Quantification de phosphore

Le STMP permet de greffer du phosphore sur les fonctions hydroxyles des carbohydrates dans des conditions alcalines. Quand il réagit sur deux fonctions hydroxyles, cela forme un pont phosphate

entre les chaînes, c'est-à-dire une liaison covalente qui permet ainsi la réticulation chimique des polysaccharides [214]. L'évaluation de la quantité en phosphore retenue dans le réseau de polymères permet d'apprécier la réactivité du STMP sur les fonctions hydroxyles en fonction de la concentration initiale utilisée. La teneur en phosphore finale dans les matrices a été mesurée par dosage colorimétrique (Figure 51).

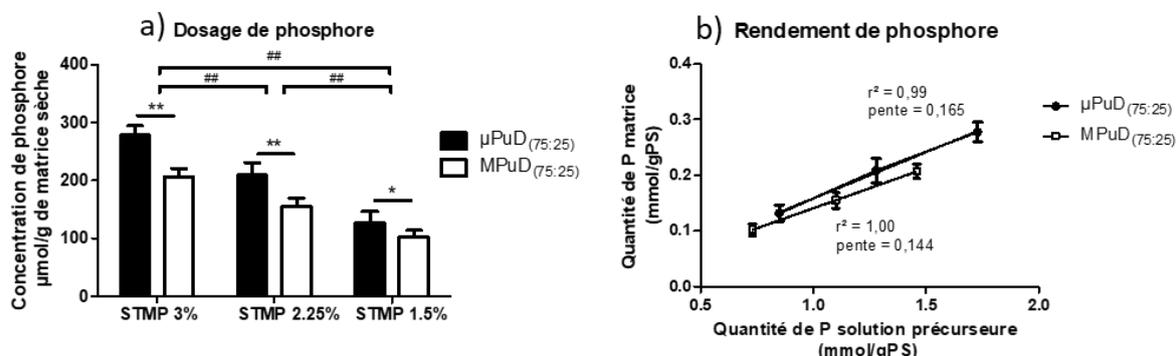


Figure 51 : (a) Quantification du phosphore dans les matrices par dosage colorimétrique. "*" et "**" indiquent une différence significative entre les formulations $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ et $\text{MPuD}_{(75:25)}$ et "###" entre les concentrations en STMP ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, $n=6$). (b) Rendement de phosphore retrouvé après synthèse par gramme de polysaccharides (gPS).

La concentration en phosphore présente dans les matrices augmente significativement avec la concentration en STMP introduite (Figure 51a). Cette relation est retrouvée pour les deux formulations $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ et $\text{MPuD}_{(75:25)}$. Dans les deux cas, une relation linéaire avec un $r^2 \geq 0,99$ est établie entre la quantité de moles de phosphore initiale et celle mesurée dans les matrices (Figure 51b). Cela suggère que dans les conditions de synthèse, les fonctions alcoolates des polymères ne sont pas limitantes.

Six fois moins de phosphore a été dosé dans les matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ et 7 fois moins dans les $\text{MPuD}_{(75:25)}$ par rapport à la quantité initialement introduite. La réaction du STMP avec les fonctions alcoolates des carbohydrates conduirait essentiellement à la liaison de groupement monophosphate, d'après le mécanisme proposé par Lack *et al* [300]. Les groupements pyrophosphates libérés ne pourraient pas réagir sur les fonctions alcoolates, pouvant expliquer 2/3 de perte de phosphore. Le tiers résiduel représente alors la valeur maximale théorique de phosphore capable de se greffer au réseau de polymère à partir de laquelle une pente de 325 est obtenue ($r^2 > 0,99$) pour les deux conditions (data non montrées). La quantité de phosphore retrouvée par dosage diminue de près d'un facteur 2 par rapport à la valeur théorique (Figure 51b). Il a été démontré que le NaOH et les fonctions alcoolates entrent en compétition pour l'ouverture du cycle du STMP. Quand le NaOH hydrolyse le cycle, le tripolyphosphate résultant ne serait pas capable se greffer sur les polysaccharides [300]. Les groupements phosphates n'ayant pas réagi sont par la suite éliminés au cours des étapes de rinçage.

L'excès de NaOH dans la solution de précurseur utilisé pour activer les polymères entrainerait alors une diminution de la réactivité du STMP.

D'autre part, les matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ ont un taux en STMP élevé : $208 \pm 21 \mu\text{molP/gPS}$ pour $\mu\text{PuD}_{(75:25)2.25}$ contre $155 \pm 14 \mu\text{molP/gPS}$ pour les $\text{MPuD}_{(75:25)2.25}$. Ceci est lié à la différence de concentration de STMP dans la solution précurseur, de 1,10 mmol/gPS pour les $\text{MPuD}_{(75:25)2.25}$ et 1,28 mmol/gPS pour les $\mu\text{PuD}_{(75:25)2.25}$ (Figure 51b). Le rapport quantité finale sur quantité initiale est cependant inférieur dans les formulations $\text{MPuD}_{(75:25)}$, 0,144, alors qu'il est de 0,165 pour les $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$. Les différents sels entre les formulations modulent l'efficacité de greffage par le phosphore.

I.1.b.ii) Taux de gonflement

La quantité de phosphore dans les matrices augmente avec la concentration de STMP utilisée. Pourtant, cela ne permet pas de conclure sur le taux de réticulation des hydrogels. En effet, le phosphore greffé ne lie pas forcément deux fonctions hydroxyles. C'est pourquoi, dans un second temps, le taux de gonflement des différents hydrogels formulés a été évalué. Les matrices lyophilisées ont été placées dans deux solvants de forces ioniques différentes (du PBS 14,30mS.cm⁻¹ et de l'eau miliQ <0,01mS.cm⁻¹) jusqu'à atteindre l'équilibre (Figure 52).

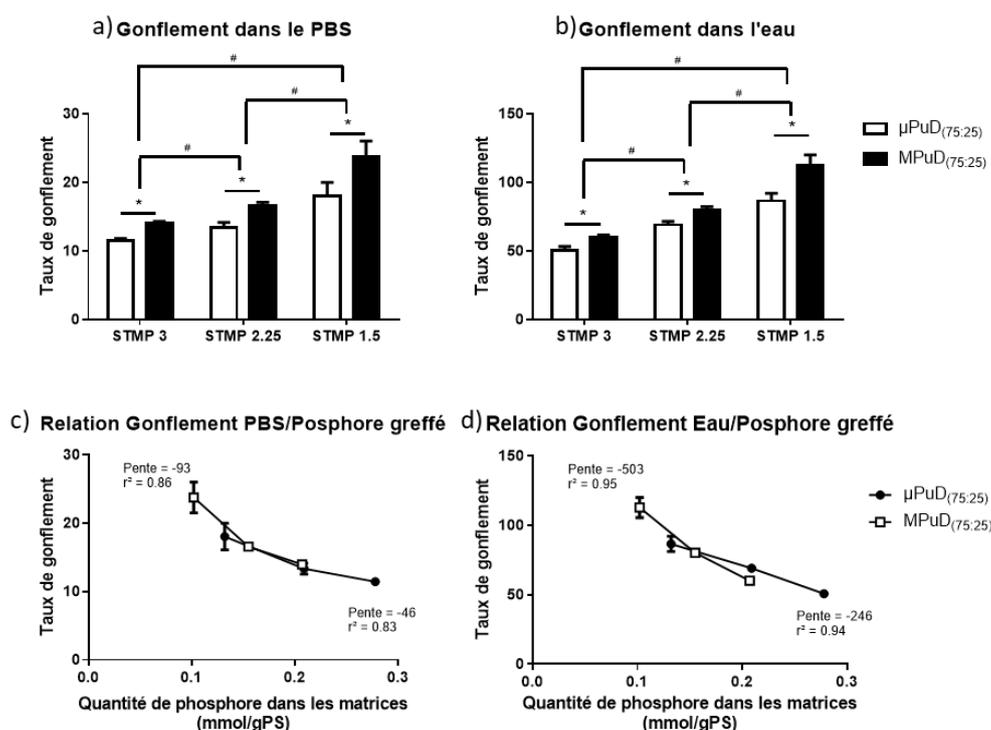


Figure 52 : Taux de gonflement des matrices hydratées dans (a) du PBS 1X et (b) de l'eau. La significativité est représentée par "*" et "#" avec $p < 0,05$ ($n = 4$). Relation gonflement et phosphore greffé dans (c) du PBS 1X et (d) de l'eau.

Les polysaccharides hydrophiles, tels que le pullulane et le dextrane, possèdent un nombre élevé de fonctions carboxyles et hydroxyles expliquant une capacité d'absorption de solvant aqueux élevée. Une relation inversement proportionnelle entre la quantité de phosphore et le taux de gonflement est ici mise en évidence : plus la quantité de phosphore introduite est faible, plus les matrices gonflent (Figure 52a et b). En effet, le taux de gonflement dans le PBS (Figure 52a) des MPuD_(75:25)3 est significativement inférieur ($14 \pm 0,4$) à celui des formulations moins réticulées, MPuD_(75:25)2.25 et MPuD_(75:25)1.5 (respectivement 17 ± 0.5 et 24 ± 2). Il est connu que les capacités d'absorption des hydrogels sont également fonction du degré de réticulation [217] : plus le taux de réticulation est élevé, plus le gonflement est faible et inversement. Les polymères des hydrogels plus réticulés ont une mobilité de la chaîne macromoléculaire plus réduite et donc un taux de gonflement moins important.

Lorsque le taux de gonflement est comparé à la quantité en phosphore greffée dans les matrices (Figure 52c et d), une relation quasiment linéaire est obtenue dans le PBS ou dans l'eau ($r^2 > 0,83$ et $r^2 > 0.94$ respectivement). Le taux de phosphore greffé au réseau de polymère est moins important dans les matériaux les plus gonflés (Figure 51). La proportion de ponts formés est donc dépendante de la quantité de phosphate greffée et donc de la quantité de STMP utilisée.

On retrouve les mêmes tendances dans l'eau mais avec des pentes 4 à 5 fois plus élevées pour chaque condition (Figure 52c et d). Les hydrogels possèdent des charges anioniques liées à la présence des groupements phosphates [311]. Dans l'eau, ils génèrent une répulsion électrostatique entre les chaînes voisines des polysaccharides et étendent ainsi le réseau de polymère [312], [313]. Le PBS quant à lui, apporte une force ionique dont les ions vont former des interactions électrostatiques avec les charges négatives et minimiser l'effet de répulsion.

La même relation entre le taux de gonflement et la quantité de phosphore est constatée pour les matériaux formulés avec les deux agents porogènes. Cependant, les matrices synthétisées avec du NaCl gonflent moins que celles synthétisées avec du Na₂CO₃ (respectivement 13 ± 1 et 17 ± 0.5 pour les STMP2.25% dans le PBS). Les matrices MPuD_(75:25) gonflent presque deux fois plus que les μ PuD_(75:25) dans l'eau et dans le PBS. Les hydrogels MPuD_(75:25) possèdent probablement moins de points de réticulation avec des polymères plus extensibles. Bien qu'elles soient moins riches en phosphore (Figure 51), le comportement du gonflement vis-à-vis de la quantité de phosphore greffée n'est pas le même. Il existe en effet un facteur deux entre les pentes des μ PuD_(75:25) et MPuD_(75:25). La porosité est un facteur qui influence également les propriétés de gonflement. A l'état lyophilisé, des différences de porosité avaient par ailleurs déjà été constatées (Figure 50). Si la fraction de porosité

dans les hydrogels MPuD_(75:25) est plus importante, les polymères pourraient gonfler de manière plus importante dans ces espaces dépourvus de matière.

Dans les conditions de synthèse des formulations étudiées, la variation de la quantité de phosphore dans les matrices ainsi que la porosité influencent les capacités de gonflement des hydrogels. Différentes densités de réticulation ont ainsi été obtenues.

I.2) Impacts sur les propriétés physico-chimiques

L'impact de la quantité en STMP et du type d'agent porogène sur les capacités de gonflement a été étudié. L'effet sur les paramètres a été approfondi par des études de la porosité, la cinétique de dégradation et les propriétés mécaniques des matrices.

I.2.a) Porosité

La structure microscopique des matrices à l'état hydraté a été analysée sur des matrices fluorescentes synthétisées avec du dextrane greffé avec de l'isothiocyanate de fluorescéine (dextrane FITC) (Figure 53). Le dextrane FITC a été introduit à 1% en m/m de polymères dans la solution précurseur. La quantité de FITC finale est considérée comme négligeable pour ne pas perturber les propriétés des formulations. Le pourcentage de porosité et la géométrie des pores ont été analysés quantitativement à partir d'acquisitions 3D réalisées en microscopie confocale (Figure 54).

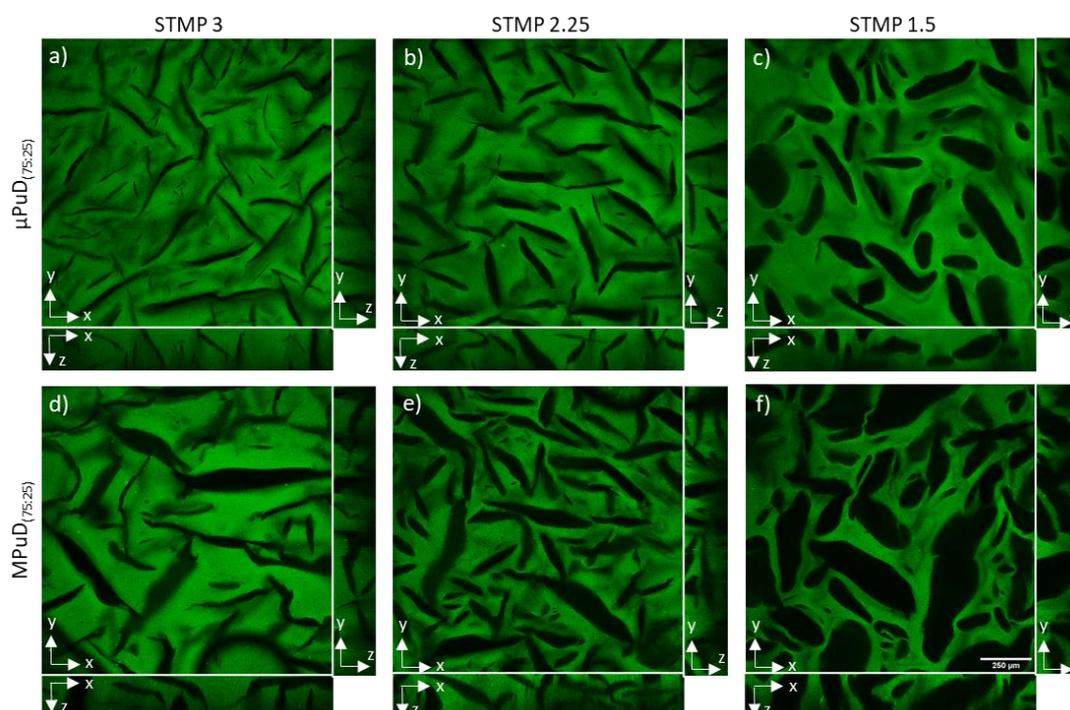


Figure 53 : Images confocales des matrices de pullulane/dextrane préparées avec du dextrane FITC : plans (xy) et projections orthogonales en bas (xz) et à droite (yz) de chaque figure (Microscope confocal Zeiss LSM 780, objectif 10x (Logiciel Zen®)). Echelle de 250μm applicable à toutes les images.

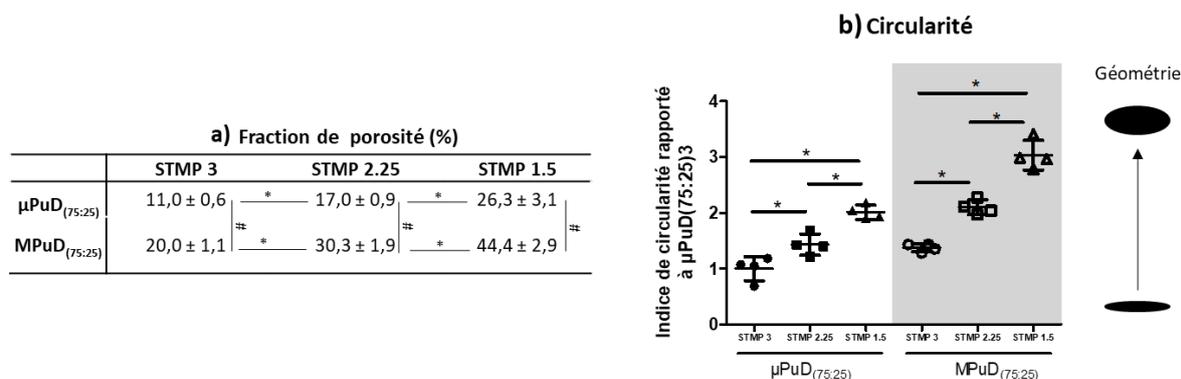


Figure 54 : (a) Fraction de porosité et (b) Circularité des pores calculées à partir des acquisitions de la Figure 53 grâce au logiciel ImageJ®. La significativité est indiquée par "*" et "#" ($p < 0,05$, $n=4$).

Les formulations restent poreuses après hydratation (Figure 53), avec des pores plus petits par rapport à l'état lyophilisé (Figure 49), dû au gonflement du réseau de polymères. La visualisation des pores en projections orthogonales confirme leur interconnectivité (Figure 53). Une différence de porosité est observée entre les taux de réticulation utilisés : moins la formulation est réticulée et plus la fraction volumique des pores est grande. Les matrices STMP3% sont moins poreuses que les STMP2.25%, elles-mêmes moins poreuses que les STMP1.5% (Figure 54a). Le degré de réticulation a des conséquences sur la formation des pores au moment de la lyophilisation. Le processus de lyophilisation est une méthode de création de pores à part entière qui repose sur la croissance de cristaux de glace dans le réseau de polymères ensuite éliminés par sublimation [314]–[316]. Durant la lyophilisation, la nucléation des cristaux de glace, pendant l'étape de congélation, détermine la structure polycristalline gelée dans la matrice, responsable de la structure poreuse subséquente. Un réseau de polymères plus dense et étendu pourrait influencer la répartition en nombre et en taille des cristaux de glace pendant la congélation, alors plus petits. En effet, d'après Shibkov *et al.* [317] les cristaux croissent en forme d'aiguille par embranchements, et sont responsables de l'interconnexion des pores. Par ailleurs, dans un hydrogel plus réticulé, les mailles du réseau étant plus serrées, celles-ci pourraient induire la germination d'aiguilles plus fines et potentiellement plus fragiles. On retrouve à ce propos des circularités des pores différentes par rapport au taux de réticulation (Figure 54b). Les pores présentent tous une forme allongée (Figure 53) mais plus la concentration en STMP est grande, plus l'axe mineur des pores est petit, donnant la forme de fines aiguilles, tandis qu'à l'inverse les pores des formulations STMP1.5 ont un axe mineur plus large (Figure 54b).

Par ailleurs, la même tendance est retrouvée entre les matrices $\text{MPuD}_{(75:25)}$ et $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$, avec cependant une différence de porosité d'un facteur 2 : $44,4\% \pm 2,9$ et $26,4\% \pm 3,1$ respectivement pour les formulations STMP1.5% (Figure 54a). Les formulations $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ ont été synthétisées avec du NaCl

comme agent porogène. Les cristaux de sels, enchâssés dans la matrice, sont dissous pendant les étapes de rinçage et forment des pores par processus de lixiviation des sels. Néanmoins, la concentration en NaCl n'est pas à saturation dans les conditions de synthèses, les cristaux de sels sont vraisemblablement trop petits pour former des pores visibles à l'échelle microscopique [318], [319]. La porosité alors observée sur la Figure 53 est certainement celle formée pendant l'étape de lyophilisation. Pour les matrices MPuD_(75:25), la porosité se crée lors de la lyophilisation mais également par la libération de CO₂ pendant la synthèse du matériau. On retrouve plusieurs formes de pores dans ces matrices : des pores fins en aiguilles et des pores plus larges. La forme en fines aiguilles est similaire aux formes de pores des formulations μPuD_(75:25). A l'état sec (Figure 50), une porosité commune avait déjà été constatée et serait imputable à la lyophilisation. L'utilisation de Na₂CO₃ permettrait alors de former des pores plus larges que ceux créés pendant la lyophilisation, augmentant ainsi la fraction volumique des pores.

1.2.b) Propriétés mécaniques

La variation des agents porogènes et des concentrations en agent réticulant ont permis de moduler la porosité et le degré de réticulation des hydrogels de pullulane/dextrane. L'impact sur les propriétés mécaniques a été évalué par des tests de cisaillement (Figure 55). Les études de balayage en fréquence ont été réalisées dans le domaine de linéarité des matériaux (annexe 1). Les matrices lyophilisées ont été hydratées jusqu'à l'équilibre dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%, pendant deux semaines) avant d'effectuer les tests.

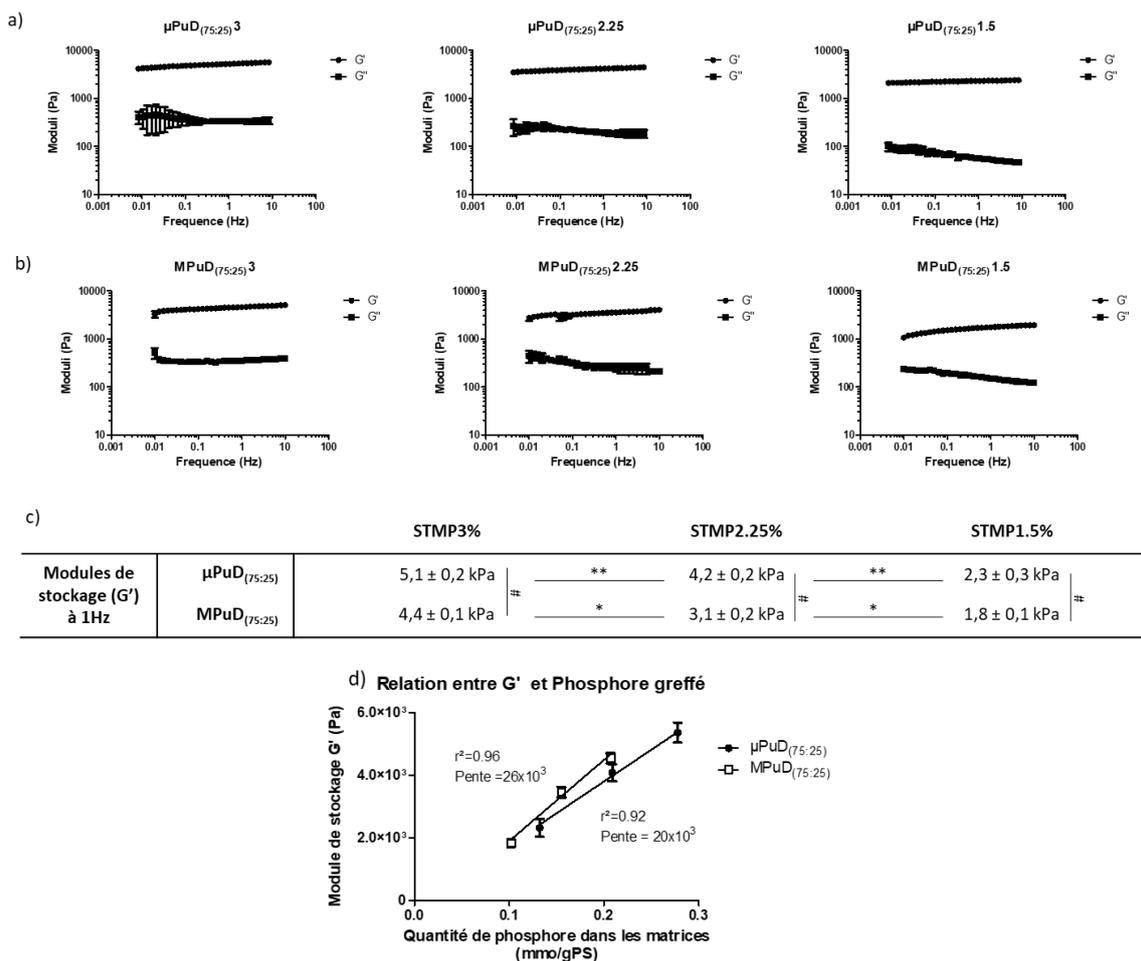


Figure 55 : (a) Balayage en fréquence des matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$, (b) Balayage en fréquence des matrices $\text{MPuD}_{(75:25)}$, (c) tableaux des valeurs moyennes de G' et (d) Représentation des G' en fonction de la quantité de phosphore. Les différences significatives sont illustrées par # et ** ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, $n \geq 5$)

Les études de balayage en fréquence ont permis de démontrer que tous les gels synthétisés ont un comportement viscoélastique. Un module de stockage (G') et un module de perte (G'') ont été enregistrés pour chaque conditions. (Figure 55). Les valeurs de module de stockage (G') sont strictement supérieures à celles du module de perte (G'') (Figure 55a et b) ce qui prouve que les matériaux sont des réseaux percolant. Les valeurs de G' varient avec la quantité de phosphore qui a été greffée dans les matrices : plus la quantité de phosphore est élevée, plus est G' augmente (Figure 55d). Par ailleurs, les matrices $\text{MPuD}_{(75:25)}$ ont un G' moins grand que les $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ à concentration de STMP équivalent (Figure 55b).

Le module de stockage (G') est un indicateur de la rigidité des matériaux : la rigidité du matériau étant plus élevée pour les matrices ayant la plus grande concentration en phosphore. La variation de concentration en agent réticulant permet d'obtenir un maillage de réseaux de polymères plus ou moins dense. La capacité de déformation est limitée par le nombre de liaisons covalentes

[320]. Plus le réseau est réticulé, moins les polymères ont la possibilité de dissiper l'énergie, les rendant rigides et moins déformables. Cette différence conforte les résultats obtenus avec les études de gonflement (Figure 52) [321] : l'augmentation de l'introduction de STMP augmente la densité de réticulation.

Le degré de réticulation est caractérisé par le poids moléculaire moyen en nombre entre deux liaisons covalentes (M_c). D'après la théorie de « Rubber elasticity », il dépend du module de cisaillement (G) par la relation suivante [322] :

$$G = \frac{RT C_{2r}}{M_c} \left(1 - \frac{2M_c}{M_n}\right) \left(\frac{v_{2r}}{v_{2s}}\right)^{-\frac{1}{3}}$$

Avec « R » la constante des gaz parfait, « T » est la température (K), « C_{2r} » la concentration de polymère ($\text{kg}\cdot\text{m}^{-3}$) dans l'état relaxé, après réticulation, « M_n » le poids moléculaire moyen en nombre du polymère, « v_{2r} » la fraction volumique du polymère dans l'état relaxé et « v_{2s} » la fraction volumique du polymère dans l'état hydraté.

Le M_c permet de déduire la taille caractéristique des mailles du réseau (ξ). Ce paramètre de maille dépend également de la conformation de la chaîne de polymère entre deux liaisons. Cependant, il n'existe pas de modèle qui puisse s'appliquer à un mélange de polymères, en particulier un mélange de pullulane (linéaire) et de dextrane (ramifié). Grenier *et al.* [316] ont pu approximer les distances de bout-en-bout d'une chaîne dans l'état non-perturbé $(r_0^2)^{1/2}$ permettant d'obtenir les M_c des formulations $\mu\text{PuD}_{(75:25)}3$ à 3% de STMP. Pour cela, deux cas limites ont été considérés : un hydrogel constitué à 100% de pullulane et un autre constitué à 100% de dextrane. Les $(r_0^2)^{1/2}$ de chacun de ces hydrogels, considérés réticulés avec 3% de STMP, ont pu être estimés à $(r_0^2)^{1/2}_{\text{pull}} = 19\text{nm}$ et $(r_0^2)^{1/2}_{\text{dex}} = 22\text{nm}$ [316]. Ces valeurs ont été utilisées ici pour obtenir une gamme de taille de mailles pour les $\mu\text{PuD}_{(75:25)}3$ dans du NaCl 0,9%, grâce à l'équation suivante [210] :

$$\xi_{\text{dex,pull}} = \alpha (r_0^2)^{\frac{1}{2}}_{\text{dex,pull}}$$

Avec « α » le facteur d'élongation directement lié à la fraction volumique de l'hydrogel gonflé dans le NaCl 0,9%

Les $\mu\text{PuD}_{(75:25)}3$ ont alors des tailles de mailles comprises entre 50 nm et 60 nm, respectivement pour le pullulane et le dextrane. Etant la condition étudiée la plus réticulée, elle permet d'obtenir la taille minimale des mailles, soit 50nm. Ce modèle ne permet cependant pas de prendre en compte la porosité des hydrogels.

Une autre relation décrite par Kujipers, A [323] permet de calculer une longueur de maille (r_{mesh}) à partir du module de cisaillement (G) grâce à la relation suivante :

$$r_{mesh} = \left(\frac{6RT}{\pi N_{AV} G} \right)^{\frac{1}{3}}$$

Avec « R » la constante des gaz parfait, « T » est la température (K) et « N_{AV} » le nombre d'Avogadro

Les paramètres de mailles calculés par cette formule sont répertoriés ci-dessous dans le Tableau 17:

Tableau 17 : Valeurs de taille de mailles calculées à partir de G' grâce à l'équation décrite par Kujipers et al. “# et *” représentent des différences significatives (p<0,05, n=4)

		STMP3	STMP2.25	STMP1.5
Taille de maille (r _{mesh})	μPuD _(75:25)	11,3 ± 0,2 nm	12,5 ± 0,3 nm	15,11 ± 0,3 nm
	MPuD _(75:25)	12,1 ± 0,1 nm	13,2 ± 0,2 nm	16,4 ± 0,3 nm

Une augmentation de la taille des mailles est observée avec la diminution de la concentration en STMP utilisée. Cependant, les valeurs sont de l'ordre de 10-15 nm et donc plus faibles que celui des paramètres de taille trouvés grâce au modèle précédemment décrit. Cette équation permet en effet de faire une approximation des tailles de mailles qui ne tient pas compte de la composition physico-chimique ni des propriétés de gonflement des hydrogels.

L'estimation la plus adaptée du paramètre de maille semble être celle déterminée par la relation de Canal et Peppas [210], car non seulement elle a été adaptée aux hydrogels de pullulane/dextrane par Grenier *et al* [316], mais elle prend également en compte plus de paramètres, notamment le gonflement et la densité de réticulation. Le paramètre de maille serait alors supérieur à 50nm

1.2.c) Biodégradabilité *in vitro*

Lors de travaux précédents, les matrices de pullulane/dextrane ont démontré des capacités de dégradation après implantation sous-cutanée chez la souris [296]. Cependant, l'impact de l'augmentation de la surface spécifique par la modulation de la porosité reste à déterminer. L'effet de la porosité et des différents taux de réticulation sur la cinétique de dégradation des matériaux, a été évalué par des études de dégradation *in vitro*. Pour cela, des glucosidases spécifiques des polysaccharides, la pullulanase et la dextranase ont été utilisées (Figure 56).

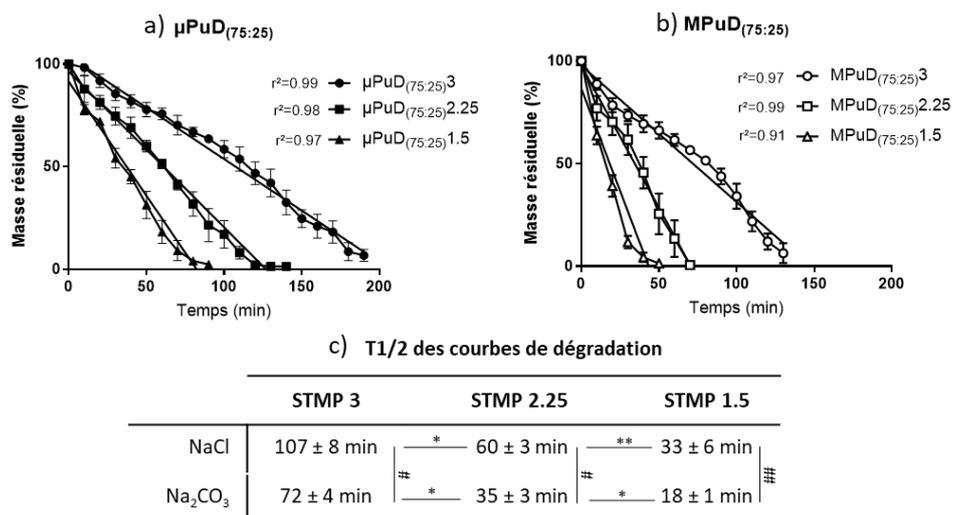


Figure 56 : Cinétique de dégradation enzymatique des (a) $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ et (b) $\text{MPuD}_{(75:25)}$ avec les régressions linéaires. (c) Tableau des temps auxquels 50% de masse résiduelle est atteint ($T_{1/2}$) avec une significativité représentée par *, # $p > 0,05$ et **, ## $p < 0,01$ (n=4).

L'utilisation d'une concentration plus élevée de STMP a montré une cinétique de dégradation moins rapide : les $\mu\text{PuD}_{(75:25)1.5}$ se dégradent 1,8 fois plus vite que les $\mu\text{PuD}_{(75:25)2.25}$ et 3,2 fois plus rapidement que les $\mu\text{PuD}_{(75:25)3}$ (Figure 56a et c). Une concentration plus élevée permet d'augmenter le nombre de liens phosphates qui ne sont pas la cible des enzymes utilisées. Plus la quantité de ponts est élevée, plus la structure du réseau de polymère peut subsister malgré le clivage enzymatique des liaisons glycosidiques. De plus, l'augmentation du taux de réticulation affecte les paramètres de mailles (Tableau 17), et pourrait rendre l'accès des enzymes à leurs sites d'action plus restreint par encombrement stérique [324]. Par ailleurs, la dégradation des matrices $\text{MPuD}_{(75:25)}$ est environ 1,5 fois plus rapide que les matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ à concentration en STMP équivalente (Figure 56c). La porosité plus importante permet d'augmenter la vitesse de dégradation vraisemblablement par augmentation de la surface spécifique accessible aux enzymes.

Néanmoins, cette étude de dégradation enzymatique ne mime pas les conditions physiologiques et ne permet pas de modéliser le temps de dégradation *in vivo*. En effet les enzymes de cette expérience *in vitro* sont spécifiques des deux polysaccharides. La dextranase, qui clive les liaisons α -1,6 du dextrane par endohydrolyse, se trouve dans le côlon, la rate, les reins, les poumons [181] et dans la salive en bouche [325], [326]. La pullulanase elle, clive les liaisons α -1,6 du pullulane mais n'existe pas dans l'organisme. Le pullulane pourrait être dégradé par hydrolyse des liens glycosidiques par d'autres processus physiologiques [327], tel que l' α -1.4-amylase présent dans la salive et le pancréas [328]. Elle a permis cependant de démontrer que le taux de réticulation et la porosité affectent la vitesse de dégradation des hydrogels par des glucosidases. Ce système présente un intérêt

particulier pour discriminer au préalable des formulations sur leurs propriétés de dégradabilité en fonction des applications considérées : une vitesse de dégradation adaptée est souhaitable afin d'éviter de perturber la prolifération tissulaire pendant le processus de régénération, mais le matériau doit rester suffisant manipulable.

I.3) Conclusion sur la mise en forme et physicochimie des matrices poreuses

La variation de la concentration en agent réticulant et en agents porogènes a permis d'obtenir des hydrogels avec des densités de réticulation et des porosités différentes. Ces propriétés différentes ont d'abord été mises en évidence macroscopiquement, puis microscopiquement (Figure 49, Figure 50 et Figure 52). La quantité de phosphore greffée dans les matrices couplées à leurs capacités de gonflement ont permis de démontrer des taux de réticulation différents : plus la concentration en STMP utilisée dans la synthèse est élevée, plus il y a de phosphore et moins les hydrogels gonflent (Figure 51). La création de pores supplémentaires a été observée par la méthode de dégagement gazeux en plus de celle obtenue par lyophilisation. La fraction volumique des pores a ainsi été augmentée par rapport à la méthode de lixiviation des sels. Les propriétés mécaniques et les profils de dégradation enzymatique *in vitro* ont confirmé l'importance et l'impact de ces paramètres sur les hydrogels. Les matériaux les plus rigides (Figure 55) avec une dégradation plus lente (Figure 56) étaient les formulations les moins poreuses et les plus réticulées.

Les hydrogels sont un système d'administration de molécules particulièrement attractifs et largement utilisés dans de nombreuses applications médicales et notamment en cancérologie [329], [330], ophtalmologie [331] et dermatologie [332], [333]. Leur capacité de gonflement et leur degré de réticulation jouent un rôle primordial dans les propriétés de diffusion et de libération de molécules d'intérêt à travers leur réseau [334] vers le tissu cible. La modulation de ces paramètres constitue ainsi une stratégie pour maîtriser et modifier les propriétés de rétention de composés [252]. Cette étude a permis l'élaboration et la caractérisation de plusieurs hydrogels de pullulane/dextrane aux propriétés physico-chimiques différentes. Dans la suite de ce travail, elles seront utilisées comme base technologique pour proposer une plateforme de libération fonctionnalisée par des ingrédients actifs aux propriétés cicatrisantes.

II] Incorporation de molécules actives dans le support

Dans cette seconde partie, les matériaux développés précédemment ont été fonctionnalisés avec deux molécules extraites de plantes. Ces molécules sont développées et commercialisées par l'entreprise Silab. Elles ont démontré des propriétés favorisant la cicatrisation cutanée dans des applications cosmétiques et sur des modèles *in vitro*, et sur des tests d'efficacité cosmétique sur des panelistes. Elles diffèrent par leur mécanisme d'action et leur nature : saccharidique et peptidique. L'incorporation de ces composés a été étudiée en association avec la modulation des propriétés physico-chimiques des hydrogels décrite précédemment. Par la suite, les profils de libération ont été déterminés et confirmés sur plusieurs modèles d'étude. Enfin, des études cellulaires ont été réalisées pour analyser la non-cytotoxicité des formulations sélectionnées.

II.1) Molécule A

La molécule A est un oligosaccharide de poids moléculaire de 3kDa capable de promouvoir la réparation naturelle de la peau. Testée *in vitro* sur des kératinocytes et des fibroblastes primaires, cette molécule stimule les capacités de migration des cellules et pourrait ainsi favoriser la recolonisation d'un site lésé. Son action est médiée par l'augmentation la synthèse de facteurs tels que le TGF- β et la différenciation des fibroblastes en myofibroblastes, impliqués dans la migration des cellules cutanées.

II.1.a) Caractérisation du composé

La stratégie est d'incorporer le composé A dans une matrice à base de polysaccharides. La nature commune saccharidique de l'ensemble des composants les rend difficilement discernables. Par ailleurs la molécule A ne possède pas de propriétés intrinsèques d'absorption ou d'émission de lumière qui en permettrait le suivi de libération. Pour remédier à cette problématique, la molécule A a été marquée de deux façons : avec un dérivé de la fluorescéine, le 5-DTAF, pour permettre un suivi *in vitro* en fluorescence et par un isotope radioactif, le ^{99m}Tc , pour un suivi *in vivo*.

Le DTAF a été décrit comme étant un dérivé de la fluorescéine capable de se lier aux fonctions alcools primaires des polysaccharides de manière spontanée dans des conditions alcalines [335], [336]. L'avantage de cette méthode est qu'elle se fait en une étape dans des conditions douces ; l'inconvénient est que le greffage est aléatoire et non prédictible. D'autres méthodes de marquage ont été envisagées pour fixer le DTAF en bout de chaîne, notamment grâce l'utilisation d'autres dérivés de la fluorescéine (ex : hydrazine) [337]. Cependant, les réactifs sont plus toxiques, la réaction se fait avec plus d'étapes intermédiaires et de façon tout aussi aléatoire, apportant plus de risque de dénaturer le composé A.

Afin de s'assurer de la qualité du marquage fluorescent, l'efficacité et la pureté du greffage ont été analysées par chromatographie sur couche mince (CCM) (Figure 57a). Pour évaluer si les étapes de marquage et de purification ont un impact sur la composition de la molécule A, deux paramètres ont été caractérisés : la teneur en sucre finale par dosage de mannose (Figure 57b) et la distribution des masses molaires par chromatographie d'exclusion stérique (HPSEC) (Figure 57c et d).

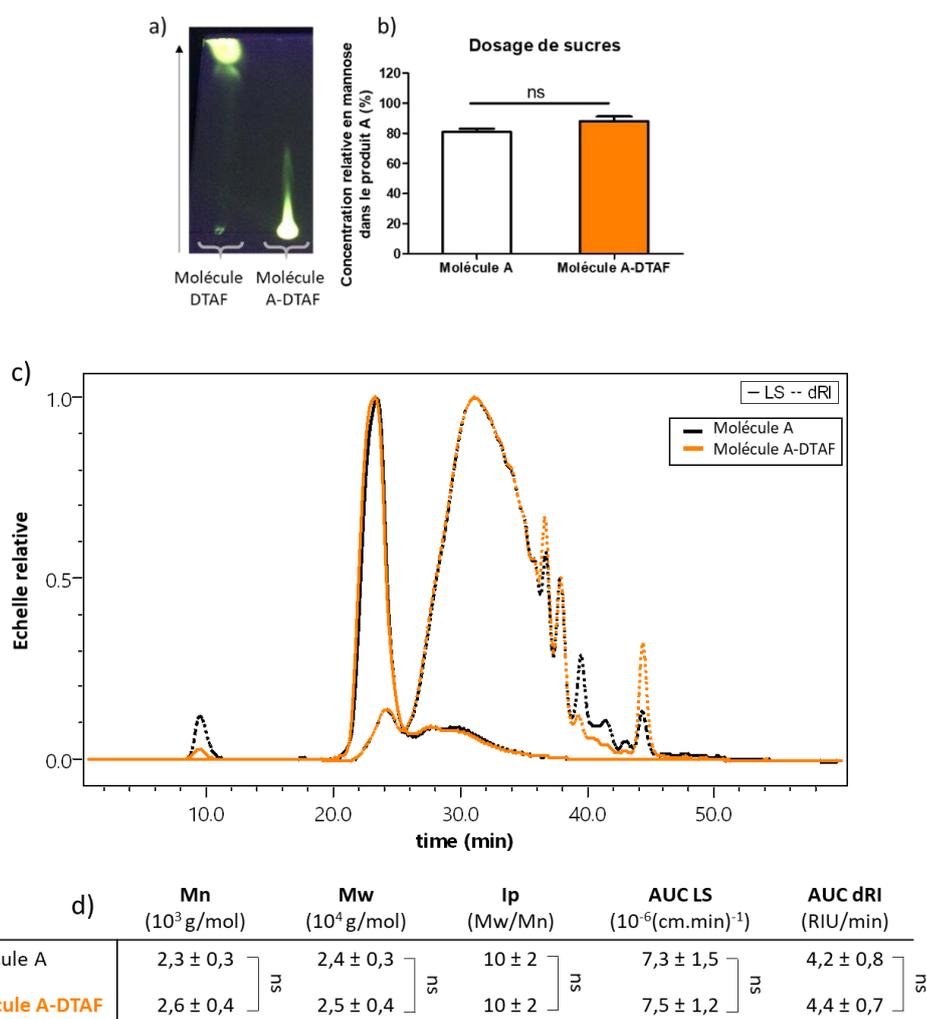


Figure 57 : Caractérisation des molécules A et A-DTAF (orange). La figure (a) est une photographie de CCM révélée à l'UV (365nm) avec la flèche indiquant le sens de migration. La figure (b) représente les résultats du dosage de mannose dans les composés. Les figures (c) et (d) sont respectivement les chromatogrammes des molécules et leur masse moléculaire (Mn en nombre et Mw en poids) et les aires sous la courbe (AUC) sont obtenues par HPSEC après traitement avec le logiciel Astra®. La non significativité est signifiée par « ns » ($p > 0,05$, $n \geq 3$).

La chromatographie sur couche mince démontre que le fluorophore libre en solution migre avec le front d'éluion tandis que le composé A-DTAF reste sur la ligne de dépôt avec une faible migration (Figure 57a). Le DTAF est plus soluble dans les solvants organiques et migre alors avec l'acétone. Lorsque la molécule A est greffée par le DTAF, le caractère hydrophile est conservé et l'ensemble est moins affiné pour l'acétone c'est pourquoi il migre peu. Cela se vérifie par ailleurs macroscopiquement

quand les poudres sont solubilisées : le A-DTAF se solubilise très facilement dans l'eau contrairement au DTAF libre. Enfin, sur la CCM, le composé A-DTAF ne présente pas de tâche qui migre au niveau de celle du contrôle, ce qui implique qu'il ne contient pas ou peu de fluorophore libre. Les résultats démontrent ainsi, que le DTAF est bien greffé à la molécule A et que la méthode de purification a permis d'éliminer le fluorophore qui n'a pas réagi.

Les étapes de lavages utilisent un procédé de séparation de phases et peuvent engendrer des changements dans la conformation de la molécule A et notamment l'étape de précipitation du produit dans les phases organiques. Le composé A contient $81 \pm 2\%$ de mannose de sa matière sèche (Figure 57b). Après greffage, la molécule marquée A-DTAF contient $88 \pm 3\%$ de mannose. La quantité de mannose retrouvée dans le produit marqué est équivalente à celle du contrôle. La légère augmentation pourrait néanmoins être le résultat d'une précipitation partielle de la fraction non saccharidique dans la phase organique ou tout simplement être liée à la sensibilité de la méthode de dosage colorimétrique.

Les chromatogrammes obtenus par HPSEC permettent d'obtenir les masses molaires par diffusion de lumière (LS) et leur distribution en concentration par l'indice de réfraction (dRi) (Figure 57c). A partir de ces courbes ont été déterminées les valeurs des masses moyennes en nombre (Mn), en poids (Mw), l'indice de polydispersité (Ip) ainsi que les aires sous la courbe (AUC) par le logiciel Astra® (Figure 57d). Le chromatogramme de la molécule A montre une polydispersité très élevée des polymères (>2). Elle est certainement le résultat des procédés d'extraction et de purification utilisés. Ils comportent en effet une succession d'hydrolyses enzymatiques pouvant conduire à l'obtention de fragments de tailles variées. Les procédés de greffage et de purification par séparation de phase pourraient alors entraîner une modification de cette répartition des tailles, c'est pourquoi la molécule A-DTAF a également été analysée en HPLC. Il apparaît que les courbes des composés A et A-DTAF (orange) se superposent avec des AUC similaires à 97% (LS) et 95% (dRi). Le fractionnement de cette molécule A en taille permettrait d'identifier la fraction active et de l'isoler. De plus, cette purification supplémentaire permettrait d'obtenir un oligosaccharide plus proche d'un grade pharmaceutique en vue d'une utilisation en clinique, et de mieux contrôler les profils de libération. Ce type d'approche a été réalisé pour d'autres composés d'origine naturelle [297], [338]. Des études de fractionnement ont été initiées pendant le projet par ultrafiltration et nanofiltration avec des résultats prometteurs (Annexe 2) et devraient être poursuivies.

Le fluorophore utilisé, le DTAF, a un poids moléculaire de 480Da. Une densité de greffage trop importante à la molécule A engendrerait alors une augmentation de taille non négligeable. Les valeurs de Mn mesurées par HPSEC indiquent que la taille du composé A-DTAF n'est pas modifiée de manière significative avec un Mn de $2,3 \pm 0,3$ kDa pour la molécule A et $2,6 \pm 0,4$ kDa pour A-DTAF (Figure 57d). Le marquage et la purification ne modifient donc pas de manière significative la taille de la molécule A et ne devrait pas avoir de répercussions majeures sur la libération et l'efficacité du composé.

Pour permettre l'observation de la molécule A en temps réel dans des modèles *in vivo*, un radiomarquage a été effectué par du technétium ^{99m}Tc . Il permet de suivre la molécule par tomographie à émission monophotonique (TEMP) dans l'organisme. Auparavant, le technétium a déjà permis de radiomarquer avec succès un polysaccharide biosourcé de petit poids moléculaire (7 kDa) [339]. Les similitudes avec le composé A font de cet isotope radioactif un bon candidat pour effectuer un radiomarquage. L'efficacité et la stabilité du marquage ont été évaluées par CCM dont la radioactivité a été mesurée grâce à un radiochromatographe aux temps T0 et à 5h (Figure 58).

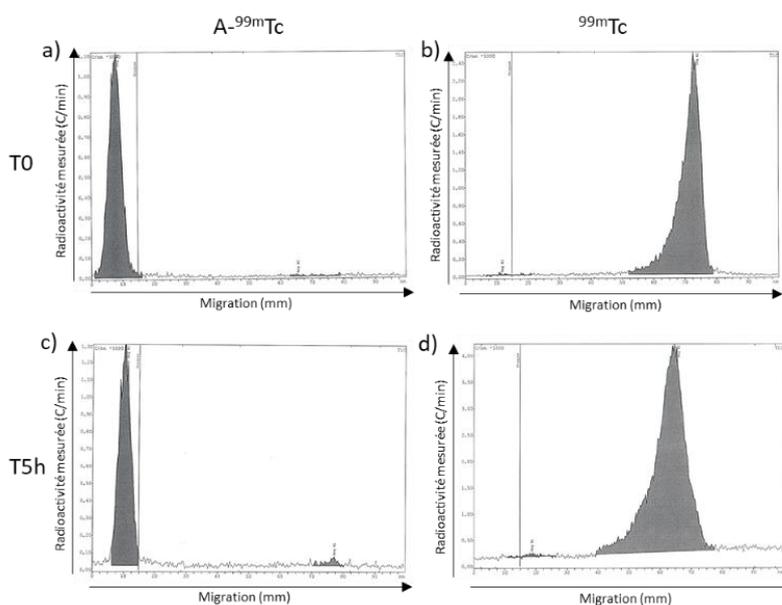


Figure 58 : Chromatogrammes des radioactivités du composé A- ^{99m}Tc et du technétium libre (^{99m}Tc) à T0 (respectivement (a) et (b)) et à T5h (respectivement (c) et (d)) mesurées à partir de CCM (raytest MiniGITA)

Le technétium libre migre avec l'éluant (Figure 58b et d) tandis que la molécule A- ^{99m}Tc reste au niveau de la ligne de dépôt aux deux temps (Figure 58a et c). Des traces infimes de technétium non lié sont visibles à T5h. De la même manière que pour le greffage en fluorescence, lorsque le technétium est lié au composé A, le composé greffé conserve l'affinité de la molécule A pour la phase stationnaire. Le greffage a donc été réalisé avec succès. La pureté radiochimique est définie comme étant la répartition des intensités radioactives sur les chromatogrammes, évaluées grâce aux AUC. La réaction

de greffage a permis d'obtenir un produit radiomarqué d'une pureté radiochimique supérieure à 99% à T0 (Figure 58a). A 5h, la pureté radiochimique du composé radiomarqué est supérieure à 97% (Figure 58c). Le radiomarquage est donc stable jusqu'à au moins 5h, permettant d'effectuer des expérimentations pendant cet intervalle de temps.

II.1.b) Incorporation dans l'hydrogel

La molécule A-DTAF a été incorporée dans les formulations réalisées dans la première partie de ce travail, dont les dénominations et nomenclatures sont rappelées dans le tableau ci-dessous Tableau 18 :

Tableau 18 : Tableau récapitulatif des formulations développées en (§1.1)

Porogène	Polysaccharide	Ratio PS	Concentration STMP (m/v)	Formulation
NaCl (μ)	Pullulane (Pu) Dextrane (D)	75:25	3%	μ PuD _(75:25) 3
			2,25%	μ PuD _(75:25) 2.25
			1,5%	μ PuD _(75:25) 1.5
3%			MPuD _(75:25) 3	
2,25%			MPuD _(75:25) 2.25	
1,5%			MPuD _(75:25) 1.5	
Na ₂ CO ₃ (M)				

Trois méthodes d'incorporation ont été étudiées pour introduire ce composé (Figure 59) : (1) *In situ*, (2) diffusion inverse et (3) imprégnation. La méthode « *in situ* » consiste au chargement de la molécule A à 10% (m/m) de la masse sèche en polysaccharide, dans la solution de pullulane et dextrane. La méthode incorporation par « diffusion inverse » repose sur l'introduction des hydrogels dans une solution concentrée d'actif à 5mg/mL, qui seront ensuite lyophilisés. Enfin, la méthode dite « d'imprégnation » comprend l'hydratation d'une matrice lyophilisée par une solution concentrée en molécule A.

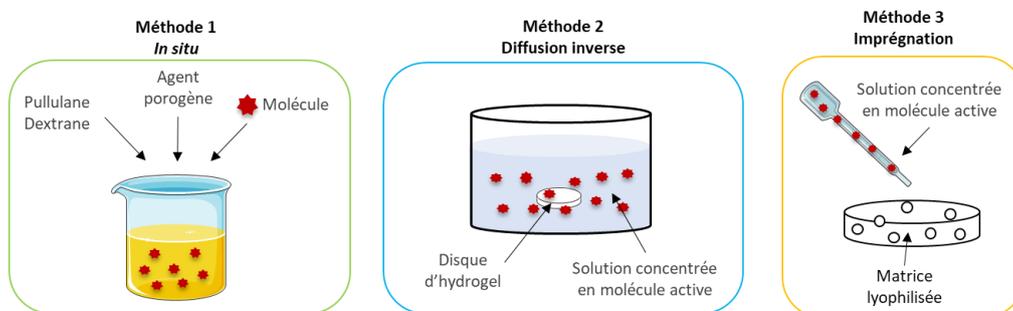


Figure 59 : Représentation schématique de l'ensemble des méthodes d'incorporation de la molécule A

Dix-huit formulations ont ainsi été synthétisées et résumées dans le Tableau 19.

Tableau 19 : Tableau récapitulatif des formulations synthétisées avec la molécule A

In situ (Ax)	Diffusion inverse (Ad)	Imprégnation (Ai)
$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3\text{Ax}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3\text{Ad}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3\text{Ai}$
$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ax}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ai}$
$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5\text{Ax}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5\text{Ad}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5\text{Ai}$
$\text{MPuD}_{(75:25)}3\text{Ax}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}3\text{Ad}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}3\text{Ai}$
$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25\text{Ax}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25\text{Ai}$
$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5\text{Ax}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5\text{Ad}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5\text{Ai}$

Le rendement d'incorporation de la molécule A dans les différentes formulations a été analysé par mesure de fluorescence. Les matrices synthétisées avec la molécule A-DTAF, ont été hydrolysées chimiquement en milieu alcalin (NaOH 1M) à 50°C. La fluorescence dans les hydrolysats, a ensuite été mesurée pour quantifier le rendement de molécule incorporée (Figure 60). Enfin, les capacités de libération des différentes conditions ont été évaluées *in vitro* (Figure 61).

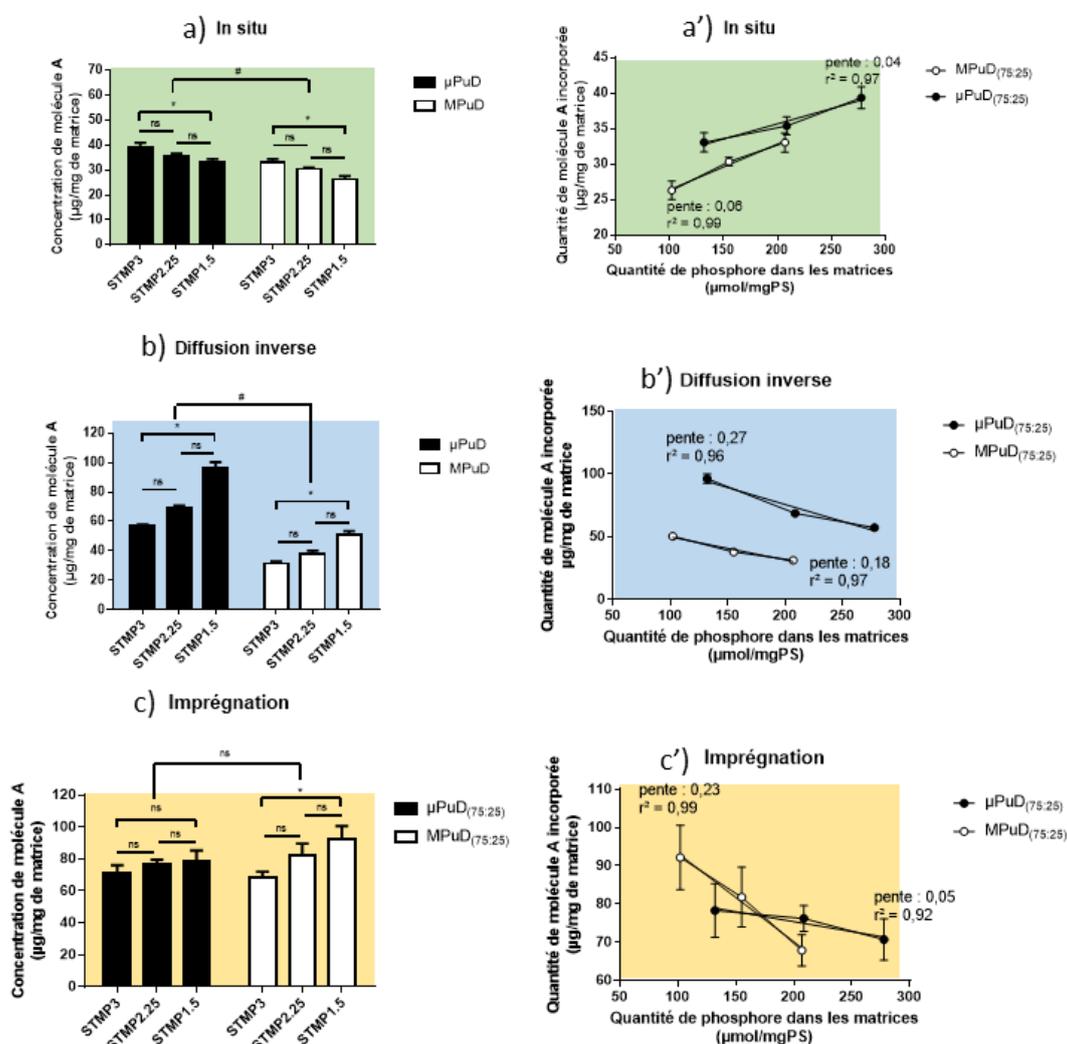


Figure 60 : Rendement d'incorporation de la molécule A en µg/mg de matrice sèche, histogramme par méthodes d'incorporation (a à c) et approximé par la quantité de phosphore retrouvé dans les matrices (a' à c'). "*" et "#" indiquent des différences significatives ($p < 0.05$, $n=3$) et "ns" la non significativité ($p > 0.05$).

Dans le cas de l'incorporation « *in situ* » (Figure 60a), plus la concentration en STMP est élevée, plus la molécule A est retenue. La même tendance est retrouvée pour les formulations MPuD_(75 :25) et μ PuD_(75 :25). Les matrices formulées avec une concentration en STMP 3% sont 1,3 fois plus concentrées en molécule A que les STMP1.5%. Dans les études précédentes une relation a été établie entre la quantité de phosphore greffé, le taux de réticulation et le taux de gonflement (§1.1.b). La quantité en molécule A incorporée a ainsi été rapportée à la quantité de phosphore greffé (Figure 60a' à c'). La relation établie pour la méthode *in situ* est linéaire avec un $r^2 > 0,97$ de la même manière pour les μ PuD_(75 :25) et les MPuD_(75 :25) (Figure 60a'). Le composé A est alors soit piégé physiquement dans le réseau de polymères au moment de la réticulation, soit lié de manière covalente au pullulane ou au dextrane. Dans le premier cas, plus la quantité de phosphore greffé est élevée et plus le réseau est dense (§1.2.b), ce qui permettrait de piéger une plus grande quantité de molécule A. Dans le second cas, grâce à la nature saccharidique du composé A, une liaison covalente peut s'établir avec les polymères du réseau par greffage avec le STMP [312]. Plus la quantité en agent réticulant est élevée dans la formulation et plus les probabilités de ponter le composé A seraient élevées (Figure 60a). Par ailleurs, les formulations μ PuD_(75 :25) retiennent près de 1,2 fois plus de molécule A que les formulations MPuD_(75 :25), à concentration de STMP équivalente. La normalisation au taux de phosphore greffé (Figure 60a') démontre que la tendance est très proche. Les différences sont plutôt dues au rapport STMP/concentration de polymère initial, inférieur pour les MPuD_(75 :25) (§1.1.b.i) couplé à la formation de pores par dégagement gazeux.

Pour les méthodes d'incorporation après réticulation que sont la « diffusion inverse » et l'« imprégnation » (Figure 59), la tendance inverse a été observée. En effet, la quantité retenue en molécule A est plus grande quand le ratio de STMP est plus faible (Figure 60b et c). Par diffusion inverse, la concentration retrouvée en composé est 1,6 fois plus élevée pour le ratio STMP1.5% que pour STMP3% (Figure 60b). Une relation linéaire entre le taux de phosphore greffé et la rétention de la molécule A est constatée avec un $r^2 > 0,96$. Le mécanisme d'incorporation reposerait alors sur le taux de réticulation associée aux propriétés de gonflement des matériaux. D'une part, plus le paramètre de maille est grand et plus les molécules seraient capables d'y pénétrer. D'autre part, moins il y a de ponts de réticulation et plus les chaînes sont capables de s'étendre, permettant une capacité de gonflement plus importante, et donc d'absorber plus de solution (§1.1.b.ii). Cependant, les matrices μ PuD_(75 :25) sont capables de retenir 1,8 fois plus de molécule A que les MPuD_(75 :25) (Figure 60b'). Cette différence repose potentiellement sur la différence d'hydratation finale entre les matériaux au moment de l'incorporation. Les formulations MPuD_(75 :25) sont hydratées dans le l'eau (conductivité $< 10\mu\text{S.cm}^{-1}$) tandis que les μ PuD_(75 :25) sont hydratées dans du NaCl 0,025% (conductivité $540\mu\text{S.cm}^{-1}$).

Les matrices gonflent plus dans l'eau car la force ionique est moindre (§1.1.b.ii). La quantité d'eau libérée par les matrices MPuD_(75 :25) dans la solution d'actif serait plus importante que celle libérée par les μ PuD_(75 :25). Cette différence peut alors modifier l'équilibre osmotique entre l'hydrogel et la solution d'actif (ratio 1 :10). De plus, à ce stade de la synthèse, les hydrogels MPuD offrent une porosité visible à l'échelle microscopique (§1.2.a). Précédemment, il a en effet été constaté que ces formulations avaient une fraction de porosité plus importante. Dans ce cas, ces pores diminuent la fraction solide, capables de retenir la molécule.

Dans le cas de la méthode par imprégnation, la même tendance a été observée que pour la méthode de diffusion inverse. Toutefois, il n'y a pas de différences significatives entre les formulations MPuD_(75 :25) et μ PuD_(75 :25) à ratio de STMP équivalent (Figure 60c). Le rendement de molécule retenue est en effet du même ordre de grandeur : μ PuD_(75 :25)2.25Ai = 76,2 ± 3,4 µg/mg et MPuD_(75 :25)2.25Ai = 81,8 ± 7,8 µg/mg. On note par ailleurs que les formulations μ MPuD_(75 :25)3Ai retiennent, 1,4 fois moins de molécule A que les μ MPuD_(75 :25)1.5Ai (Figure 60c'). Encore une fois, l'incorporation est dépendante du taux de réticulation et de la capacité de gonflement des matrices lyophilisées. Les matrices MPuD_(75 :25) sont les conditions les plus poreuses et les moins réticulées. Elles avaient montré les capacités d'absorption les plus grandes (§1.1.b.ii), et donc les plus propices à retenir un volume plus important de la solution concentrée en molécule. Néanmoins, l'écart de rétention de composé entre les taux de réticulation STMP1,5% à 3% est un peu plus important pour les MPuD_(75 :25) que pour les μ PuD_(75 :25) (1,1 fois) (Figure 60c'). La gamme de fraction de porosité entre les taux de réticulation était moins étendue que pour les MPuD_(75 :25) à l'état hydraté (15% contre 24%) (§1.2.a). Cette caractéristique peut contribuer à intensifier les différences entre les taux de réticulation des différentes formulations.

Le rendement d'incorporation a ensuite été comparé à la méthode utilisée (Tableau 20).

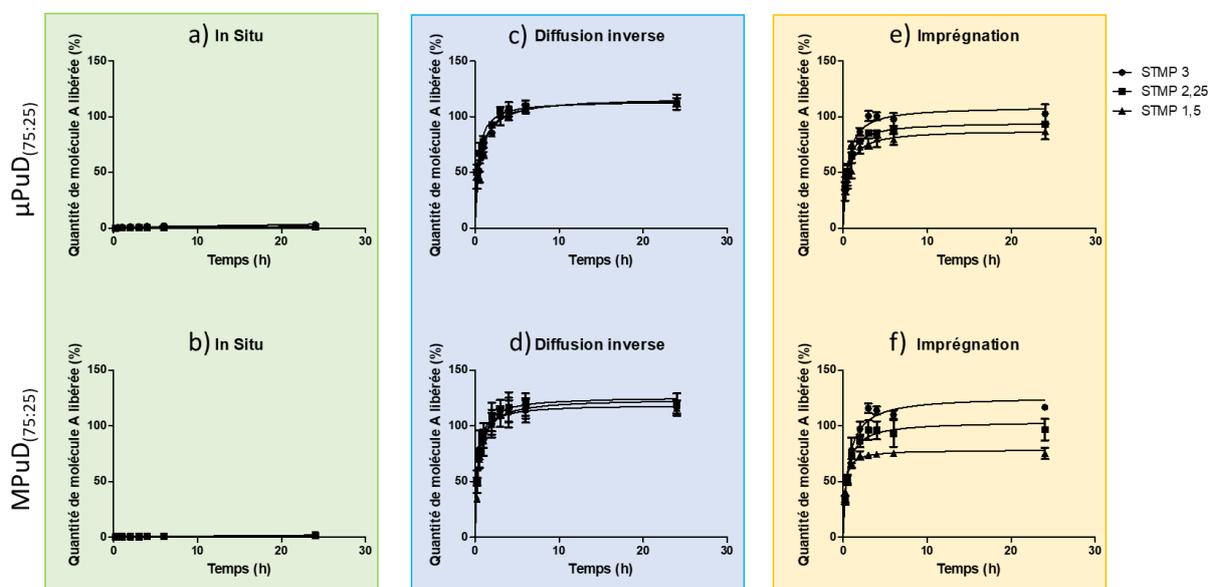
Tableau 20 : Tableau récapitulatif des valeurs de molécule A incorporée dans les différentes formulations. Comparaisons entre les méthodes avec " * " indiquant une différence significative et " ns " une absence de significativité (n=3, p<0,05 et p>0,05 respectivement).

Porogène	Agent réticulant	In situ (Ax) µg/mg	Diffusion inverse (Ad) µg/mg	Imprégnation (Ai) µg/mg
NaCl (µ)	STMP 3%	39,4 ± 1,5	* 57,4 ± 0,6	* 70,7 ± 5,4
	STMP 2.25%	35,4 ± 1,3	* 68,8 ± 1,8	* 76,2 ± 3,4
	STMP 1.5%	33,1 ± 1,4	* 96,4 ± 3,8	* 78,3 ± 7,1
Na ₂ CO ₃ (M)	STMP 3%	33,1 ± 1,4	ns 31,4 ± 1,5	* 67,9 ± 4,1
	STMP 2.25%	30,4 ± 0,6	* 38,1 ± 2,0	* 81,8 ± 7,8
	STMP 1.5%	26,3 ± 1,3	* 50,6 ± 2,9	* 92,2 ± 8,4

*

Pour la méthode « *in situ* », moins de 50% de la molécule est retrouvé dans les matrices (Tableau 20). La quantité initiale introduite correspondait à 90 $\mu\text{g}/\text{mg}$ de masse sèche de polysaccharides tandis que 25 à 40 $\mu\text{g}/\text{mg}$ ont été retrouvés dans les lysats (Tableau 20). Les méthodes employées d'imprégnation et de diffusion inverse permettent d'obtenir un meilleur rendement avec un ordre de grandeur similaire pour les $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ aux alentours de 75 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Le rendement final d'incorporation *in situ* serait lié à l'élimination des molécules non liées pendant les étapes de rinçage. Au contraire, les méthodes « post réticulation » ne subissent pas d'étapes de rinçage après l'introduction du composé et donc présentent peu de pertes de produit. Les matériaux MPuD, retiennent moins de composé que les μPuD par diffusion inverse et la tendance opposée est observée par imprégnation. La différence principale repose sur le fait que dans la méthode de diffusion inverse les hydrogels sont immergés à l'état hydraté, tandis que par imprégnation la solution est déposée sur le matériau lyophilisé. Pour cette dernière, le volume de solution est contrôlé et s'affranchit des risques de dilution liés à un apport de solvant par l'hydrogel.

Les propriétés de libération des formulations fonctionnalisées par la molécule A-DTAF ont été évaluées par des études de libération *in vitro* dans du PBS1X à 37°C. La fluorescence libérée dans les surnageants, a été mesurée à plusieurs temps. La teneur en composé a été calculée à partir de gamme de molécule A-DTAF et la libération cumulée obtenue a été en normalisée aux rendements d'incorporation précédemment déterminés (Figure 60). Deux profils distincts ont été observés : un pour la méthode « *in situ* » et un autre pour les méthodes de diffusion inverse et imprégnation (Figure 61).



Les courbes obtenues ont été caractérisées par des modèles mathématiques adaptés aux cinétiques observées (Tableau 21). Des modèles mathématiques de régression ont été appliqués aux courbes de libération des formulations « *in situ* », « Diffusion inverse » et « Imprégnation ». Les paramètres caractéristiques présentés sont les pentes et les coefficients de régression (r^2). Dans le cas des formulations « *in situ* », une régression linéaire a été appliquée. Le T1/2 ne peut être calculé car dans le temps de l'étude, ces formulations n'ont pas atteint 50% de composé libéré. Un modèle de régression non linéaire a été appliqué aux autres méthodes avec comme valeurs caractéristiques les T1/2 et les r^2 . Les valeurs issues de ces modèles sont présentées dans le Tableau 21. L'application de modèles différents semble bien adaptée au vu des r^2 obtenus [340].

Tableau 21 : Paramètres des courbes de libération de la molécule A calculés après régression linéaire (*in situ*) ou non linéaire (diffusion inverse et imprégnation). Logiciel Graphpad Prism® (V7).

Méthode	Porosité	STMP 3		STMP 2.25		STMP 1.5	
In situ	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}$	$R^2=0,77$	Pente $0,11 \pm 0,02$ %/h	$R^2=0,98$	Pente $0,04 \pm 0,01$ %/h	$R^2=0,96$	Pente $0,07 \pm 0,01$ %/h
	$\text{MPuD}_{(75:25)}$	$R^2=0,91$	Pente $0,06 \pm 0,01$ %/h	$R^2=0,93$	Pente $0,05 \pm 0,01$ %/h	$R^2=0,92$	Pente $0,05 \pm 0,01$ %/h
Diffusion inverse	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}$	$R^2=0,93$	T1/2 = 33 ± 3 min	$R^2=0,93$	T1/2 = 34 ± 2 min	$R^2=0,94$	T1/2 = 38 ± 5 min
	$\text{MPuD}_{(75:25)}$	$R^2=0,80$	T1/2 = 19 ± 3 min	$R^2=0,90$	T1/2 = 22 ± 2 min	$R^2=0,92$	T1/2 = 27 ± 3 min
Imprégnation	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}$	$R^2=0,91$	T1/2 = 30 ± 3 min	$R^2=0,96$	T1/2 = 28 ± 2 min	$R^2=0,90$	T1/2 = 30 ± 4 min
	$\text{MPuD}_{(75:25)}$	$R^2=0,94$	T1/2 = 37 ± 5 min	$R^2=0,90$	T1/2 = 27 ± 3 min	$R^2=0,93$	T1/2 = 13 ± 1 min

Très peu de fluorescence liée à la présence en actif A-DTAF a été détectée dans les surnageants des matériaux $\mu\text{PuD}_{(75:25)}\text{Ax}$ et $\text{MPuD}_{(75:25)}\text{Ax}$ (Figure 61a et b). Moins de 0,2% de molécule A est libéré par heure quelle que soit la formulation indépendamment de la concentration en STMP (Tableau 21). L'hypothèse émise précédemment sur une liaison covalente du composé A au réseau de polymère est alors privilégiée. En effet, si la molécule est co-réticulée chimiquement aux hydrogels, elle n'est délivrée que par érosion du système [262] : les chaînes de polymères sur lesquelles la molécule A est liée, clivées par dégradation, en permettraient la libération [262]. Les conditions d'expérimentations, pH physiologique à 37°C pendant 24h, n'induiront donc pas la dégradation des hydrogels, à court terme.

Lorsque le composé a été introduit par diffusion inverse ou imprégnation dans les matrices, le profil de libération atteint un plateau après 3h de libération (Figure 61c à f). Les deux méthodes présentent le même type de profil de libération : la moitié de la quantité d'actif A est libérée en moyenne en 35 min (Tableau 21). Le composé est dans un premier temps libéré en « burst release » suivi d'une libération plus progressive. Le « burst-release » définit la libération d'une grande quantité de composé en peu de temps. La libération suivante, plus progressive, peut être liée à l'infiltration du

solvant dans la matrice [341] et au delta osmotique qui diminue au fur et à mesure de la libération de la molécule A.

Afin d'identifier le mécanisme de diffusion de la molécule, plusieurs modèles mathématiques spécifiques ont été appliqués aux profils de libération [261], [342]. Pour ce faire, les modélisations sont normalement réalisées sur les courbes jusqu'à 60% de libération mais sont ici non applicables sur les profils obtenus. Elles ont alors été réalisées sur la première phase de la libération rapide qui précède le plateau (3 premières heures). Quatre modèles de diffusion ont alors été étudiés, d'ordre zéro, de premier ordre, d'Higushi et de Korsmeyer et Peppas. Ils sont présentés dans la Figure 62 pour la formulation $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$.

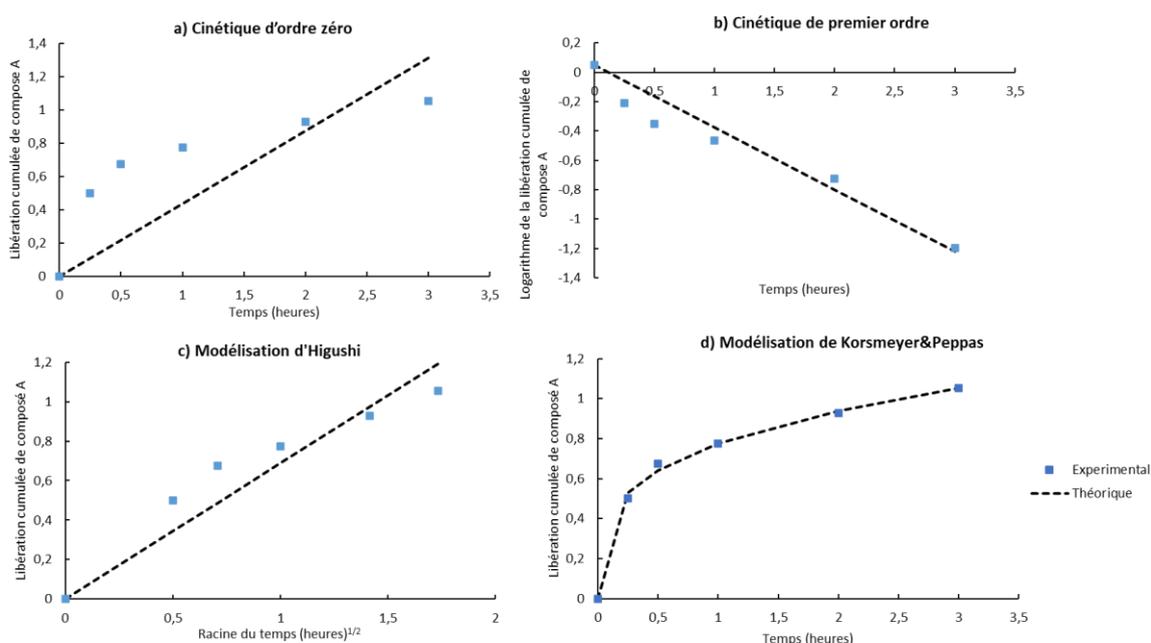


Figure 62 : Concordance entre les modèles (a) de cinétique d'ordre zéro, (b) de cinétique de premier ordre, (c) d'Higushi et (d) de Korsmeyer (lignes pointillées noires) et les résultats expérimentaux (points bleus).

Il apparaît que la cinétique de libération correspond le mieux au modèle décrit par Korsmeyer et Peppas [343] qui établit la relation suivante :

$$\frac{M_t}{M_\infty} = kt^n$$

Avec « M_t » La quantité de molécule libérée dans le temps, « M_∞ » la quantité libérée après un temps infini, « n » le coefficient de diffusion et « k » la constante de libération de Korsmeyer

L'ensemble des profils a alors été modélisé avec la relation de Korsmeyer et Peppas dont les différents paramètres sont répertoriés dans le Tableau 22 :

Tableau 22 : Corrélation (r^2) et paramètres « k » et « n » issus de la modélisation de Korsmeyer&Peppas

Méthode	Porosité	STMP 3			STMP 2.25			STMP 1.5		
		R ²	k	n	R ²	k	n	R ²	k	n
Diffusion inverse	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}$	0,997	0,69	0,34	0,998	0,72	0,30	0,994	0,67	0,37
	$\text{MPuD}_{(75:25)}$	0,995	0,67	0,38	0,991	0,70	0,37	0,994	0,81	0,26
Imprégnation	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}$	0,995	0,67	0,38	0,981	0,62	0,32	0,995	0,54	0,34
	$\text{MPuD}_{(75:25)}$	0,995	0,71	0,42	0,985	0,65	0,34	0,991	0,61	0,22

La valeur de l'exposant « n » suggère que la libération du composé suit la loi de Fick ($n \leq 0,5$ [344]), c'est à dire de la région la plus concentrée vers la moins concentrée [345] par mécanisme de diffusion contrôlée [342], et dépendrait ainsi du delta osmotique entre les deux. La diffusion serait indépendante du gonflement de la matrice [261]. En effet, aucun impact majeur de la concentration en STMP ou de la porosité n'a été observé sur la cinétique de libération de la molécule A. Les différences seraient plutôt dépendantes de la quantité initiale présente dans les formulations. En effet, les différences de T1/2 visibles dans le Tableau 21 pourraient être issues de la normalisation par le rendement d'incorporation (Figure 60b et c). Ce modèle suggère que les molécules sont certainement plus petites que la taille des mailles du réseau de pullulane/dextrane. Le paramètre de maille de la formulation avec le taux de réticulation le plus élevé, $\mu\text{PuD}_{(75:25)3}$, a été calculé à 50nm (§1.2.b). La molécule A, oligosaccharide branché de 3kDa, aurait alors un diamètre de giration inférieur au paramètre de maille, sa libération ne serait donc pas perturbée par le réseau de polymères [320]. Une solution intéressante pour moduler la libération serait de formuler la molécule A en particules ou de la greffer à des polymères de haut poids moléculaire.

Ces caractérisations ont permis de mettre en évidence des différences liées à la méthode d'incorporation, sans impact majeur apporté par le changement de porosité ou par le taux de réticulation. Les mêmes études d'incorporation et de libération ont été conduites avec la molécule B, de nature peptidique, dans les matrices de pullulane/dextrane.

II.2) Molécule B

La molécule B est extraite du riz et composée de peptides de poids moléculaire inférieur à 3,5 kDa. Elle représente une source d'acides aminés facilement assimilables par les cellules. Il a été montré dans des études *in vitro* que cet apport permet d'augmenter la synthèse de composants de la MEC

par les fibroblastes et de stimuler la différenciation épidermique. Ces activités d'amplification du métabolisme protéique sont très intéressantes pour stimuler la reconstruction de l'épiderme et du derme ainsi appliquée à un contexte de cicatrisation.

II.2.a) Caractérisation du composé

Les acides aminés peuvent être chargés ou neutres en fonction du pH de l'environnement. La séquence en acide aminés de la molécule B n'étant pas déterminée, la charge globale du composé a été mesurée par titration grâce à la mesure du potentiel Zeta (ζ) en fonction du pH comme décrit par Salgin *et al* [346](Figure 63).

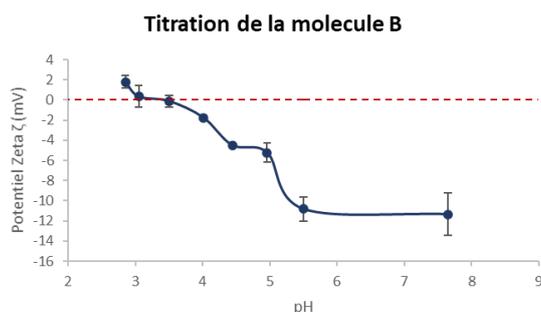


Figure 63 : Charge du composé B mesurée par le potentiel ζ en fonction du pH.

La titration indique qu'au-delà d'un pH de 3,5 la molécule B présente une charge de surface négative.

Le composé B ne possède pas de propriétés intrinsèques d'absorption ou d'émission de lumière qui en permettrait le suivi sans passer par des dosages. Les méthodes de dosage colorimétriques, ne sont pas suffisamment sensibles pour des études de libération. Pour remédier à cela, la molécule B a été marquée par un dérivé de la fluorescéine, FITC, pour permettre un suivi de la libération par fluorescence. Afin de s'assurer de la qualité du marquage fluorescent, l'efficacité et la pureté du greffage ont été analysées. Pour estimer le taux de greffage, le dosage des amines libres a été réalisé et la protéine marquée a été analysée par chromatographie sur couche mince (CMM) (Figure 64).

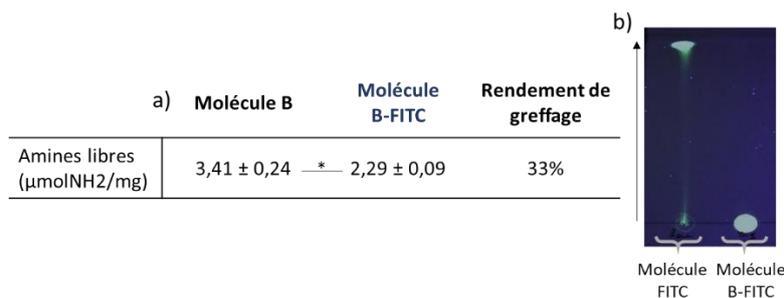


Figure 64 : (a) Tableau des taux d'amines primaires retrouvés dans les composés B et B-FITC avec le rendement du greffage. La significativité est représentée par * ($p < 0,05$, $n=3$). (b) Photographie CCM du FITC libre et du B-FITC révélée à l'UV (365nm) avec la flèche indiquant le sens de migration.

La quantité en amines primaires présente dans le composé B a été déterminée par dosage TNBS. Initialement, le composé B contient $3,42 \pm 0.24 \mu\text{molNH}_2/\text{mg}$ de matière sèche. Cette concentration est réduite significativement après le greffage des FITC à $2,29 \pm 0.09 \mu\text{molNH}_2/\text{mg}$ (Figure 64a). La diminution de la quantité d'amines primaires après la réaction de greffage, témoigne de la liaison du FITC aux groupements amines. En effet, le FITC se lie aux fonctions amines, présentes en N-terminal de la séquence peptidique par formation d'un lien isothiouré, en conditions alcalines [347]. L'amine primaire devient alors secondaire et n'est plus détectable au dosage. Cette diminution de 33% suggère que le FITC a été greffé aux amines de la molécule avec un ratio de 1 :3.

La chromatographie sur couche mince indique que le fluorophore libre en solution migre avec le front d'élution tandis que le composé B-FITC reste sur la ligne de dépôt (Figure 64b). De la même manière que le DTAF, le FITC est plus soluble dans les solvants organiques et lorsqu'il est lié à la molécule B, l'ensemble conserve l'affinité de la molécule B pour la phase stationnaire et ne migre plus avec le solvant. Cela se vérifie par ailleurs macroscopiquement par la solubilité des poudres, car la molécule B-FITC se solubilise très facilement dans l'eau contrairement au FITC libre. Enfin, le composé B-FITC ne possède pas de signal correspondant au contrôle « fluorophore libre », ce qui implique qu'il ne contient pas ou très peu de fluorophore non lié et que l'étape de purification est suffisante.

II.2.b) Incorporation dans l'hydrogel

La molécule B a été incorporée dans les 6 formulations réalisées dans la première partie de cette étude, dont les dénominations et nomenclatures sont rappelées dans le Tableau 18. L'incorporation de la molécule B dans les hydrogels a été testée en utilisant deux des trois méthodes exposées en (§II.1.b) : les méthodes (1) *in situ* et (2) diffusion inverse (Figure 59). Les résultats obtenus avec la molécule A et la méthode d'imprégnation n'étaient pas très différents de ceux de la méthode de diffusion inverse en termes de libération. De plus avec cette méthode, l'homogénéité d'incorporation était moins bonne. Douze formulations ont ainsi été synthétisées et sont rappelées ci-dessous (Tableau 23) :

Tableau 23 : Tableau récapitulatif des formulations synthétisées avec la molécule B

<i>In situ</i> (Bx)	Diffusion inverse (Bd)
$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3\text{Bx}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}3\text{Bd}$
$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Bx}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$
$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5\text{Bx}$	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5\text{Bd}$
$\text{MPuD}_{(75:25)}3\text{Bx}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}3\text{Bd}$
$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25\text{Bx}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$
$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5\text{Bx}$	$\text{MPuD}_{(75:25)}1.5\text{Bd}$

Le rendement d'incorporation de la molécule B-FITC dans les différentes formulations a été analysé par fluorescence. Les matrices synthétisées avec la molécule B-FITC, ont été hydrolysées chimiquement en milieux alcalin (NaOH 1M) à 50°C. La fluorescence dans les hydrolysats, témoin de la présence de la molécule, a ensuite été mesurée pour quantifier l'incorporation (Figure 65). Ensuite, les capacités de libération des différentes conditions ont été évaluées par des études de libération *in vitro* (Figure 66).

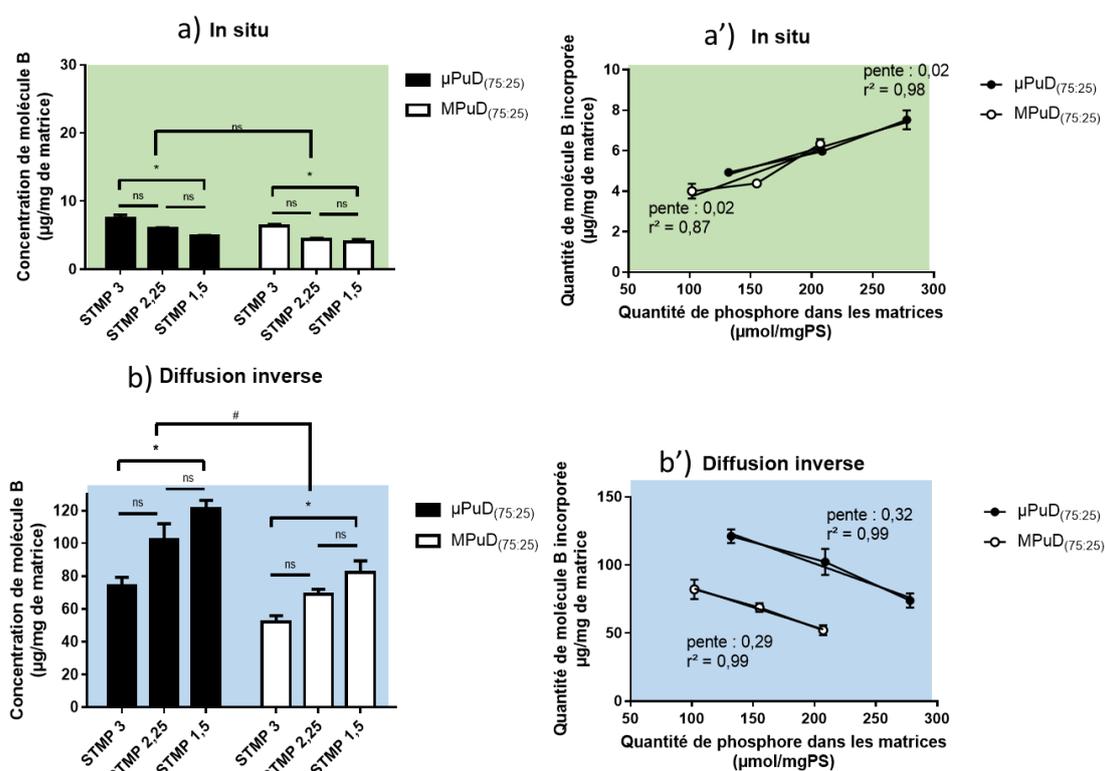


Figure 65 : Rendement d'incorporation de la molécule B dans les différentes formulations synthétisées par rapport à la méthode utilisée (a et b) et approximé par la quantité de phosphores greffés (a' et b'). "*" et "#" indiquent des différences significatives ($p < 0.05$) et « ns » indique une non significativité ($p > 0.05$, $n=3$).

Comme observé précédemment dans les études réalisées sur la molécule A (voir §II.1.b), des différences ont été retrouvées en fonction de la méthode d'incorporation utilisée, de l'agent porogène et du taux de réticulation (Figure 65a et Tableau 24). Très peu d'actif B ($< 10 \mu\text{g}/\text{mg}$ de matrice) est retenu par le matériau avec la méthode « *in situ* » (Figure 65a). Cela constitue moins de 10% de la quantité ajoutée dans la solution de polysaccharides ($90 \mu\text{g}/\text{mgPS}$). Le composé B est très certainement éliminé en grande majorité ($> 90\%$) pendant les étapes de rinçage ce qui suggère à la fois une absence de liaisons covalentes et une diffusion aisée à travers l'hydrogel. Pendant l'étape de réticulation, il est peut-être piégé dans le réseau de polymère, sans interactions covalentes. Par ailleurs, il semble être éliminé plus facilement pendant les étapes de rinçage que la molécule A (Tableau 20). Cela peut être lié à la différence de nature de ces composés. En effet, dans la littérature,

le STMP a surtout été décrit comme agent réticulant des carbohydrates [300], [312], [348]. Ceci supporte la théorie d'absence de pontage au réseau. La rétention est toutefois modulée par le taux de réticulation. La réticulation par la concentration STMP3% a permis d'incorporer 1,5 fois plus de molécule B que la concentration STMP1.5% (Tableau 24). Les molécules résiduelles après les étapes de rinçages doivent être piégées dans le réseau; leur quantité augmente avec le taux de réticulation. Le porogène utilisé ne semble par contre, pas avoir d'impact (Figure 65a').

Tableau 24 : Tableau récapitulatif des valeurs de molécule B incorporée dans les différentes formulations. Comparaisons entre les méthodes avec "*" , "**" indiquant une différence significative (n=3, p<0,05 et p<0,01 respectivement).

Porogène	Agent réticulant	<i>In situ</i> (Bx) µg/mg		Diffusion inverse (Bd) µg/mg
NaCl (µ)	STMP 3	7,5 ± 0,5	*	73,9 ± 5,3
	STMP 2.25	6,0 ± 0,1	*	102,4 ± 9,6
	STMP 1.5	4,9 ± 0,1	**	121,2 ± 5,0
Na ₂ CO ₃ (M)	STMP 3	6,3 ± 0,2	*	52,2 ± 3,7
	STMP 2.25	4,4 ± 0,2	*	68,8 ± 3,2
	STMP 1.5	4,0 ± 0,4	*	82,2 ± 7,2

La méthode d'incorporation par diffusion inverse a permis de retenir plus de 50µg/mg d'actif soit un facteur au moins 5 fois supérieur à la méthode précédente (Tableau 24). Encore une fois, les formulations plus réticulées (STMP3%) ont une teneur en molécule B plus faible que pour les formulations moins réticulées (STMP1.5%) (Figure 65b). Les capacités de gonflement influencent ici aussi les capacités de rétention des composés. De la même manière que pour l'incorporation de la molécule A, les matrices µPuD_(75 :25) retiennent près de 1,5 fois plus de composé B que les formulations MPuD_(75 :25) (Figure 65b'). Cette différence découle probablement de l'utilisation de matrices hydratées pour l'incorporation. La méthode de diffusion inverse semble introduire la molécule B en plus grande quantité dans l'hydrogel que la molécule A (µPuD_(75 :25)2.25Ad=69µg/mg contre µPuD_(75 :25)2.25Bd=102µg/mg). La taille de la molécule B est probablement plus petite que la molécule A ce qui pourrait augmenter son infiltration dans l'hydrogel et en augmenter l'efficacité d'incorporation [349].

Les propriétés de libération des formulations synthétisées avec l'actif B-FITC ont été évaluées par des études de libération *in vitro* comme décrit précédemment (§II.1.b). La fluorescence mesurée dans les surnageants a permis d'évaluer la quantité en composé actif libéré en fonction du temps (Figure 66). Deux profils sont alors observés par rapport à la méthode d'incorporation employée.

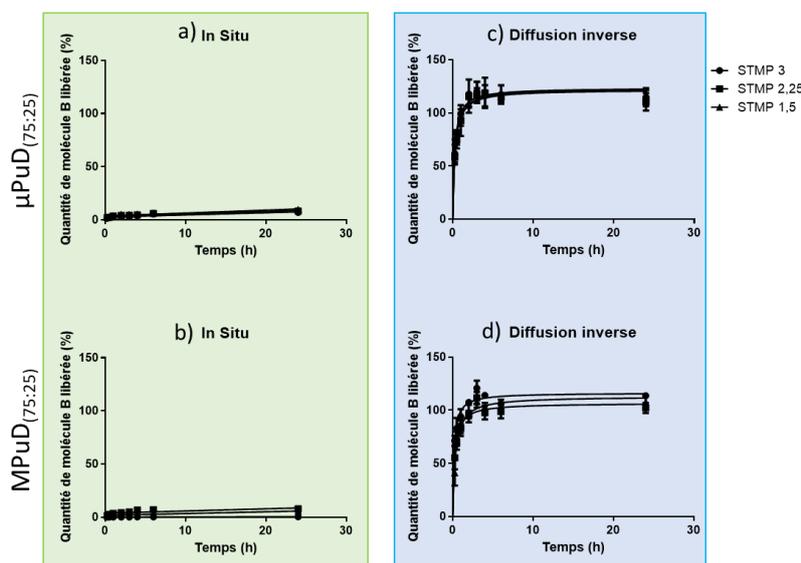


Figure 66 : Profils de libération de la molécule B des différentes formulations en fonction de la méthode d'incorporation et de la porosité

De la même manière que précédemment (II.1.b), les courbes obtenues ont été analysées à l'aide des modèles mathématiques adaptés aux profils observés : les courbes ont été analysées par régression linéaire pour la méthode « *in situ* » et non linéaire pour la méthode de « diffusion inverse » (Tableau 25)

Tableau 25 : Paramètres des courbes de libération de la molécule B calculés après régression linéaire (*in situ*) ou non linéaire (diffusion inverse). Logiciel Graphpad Prism® (V7).

Méthode	Porosité	STMP 3		STMP 2.25		STMP 1.5	
<i>In situ</i>	µPuD _(75:25)	R ² =0,87	Pente 0,20 ± 0,03 %/h	R ² =0,85	Pente 0,23 ± 0,02 %/h	R ² =0,86	Pente 0,27 ± 0,03 %/h
	MPuD _(75:25)	R ² = 0,95	Pente 0,01 ± 0,05 %/h	R ² =0,83	Pente 0,20 ± 0,04 %/h	R ² =0,90	Pente 0,17 ± 0,01 %/h
Diffusion inverse	µPuD _(75:25)	R ² =0,86	T1/2 = 15 ± 2 min	R ² =0,80	T1/2 = 17 ± 3 min	R ² =0,89	T1/2 = 17 ± 2 min
	MPuD _(75:25)	R ² =0,88	T1/2 = 11 ± 1 min	R ² =0,82	T1/2 = 15 ± 2 min	R ² =0,89	T1/2 = 20 ± 2 min

Très peu d'actif a été libéré des formulations dans lesquelles le composé B a été introduit « *in situ* » (inférieur à 0,3%/h) (Figure 66a et b). Le peu de composé retenu pourrait alors être libéré par diffusion lente ou par dégradation de la matrice. Mais ces concentrations libérées ne sont probablement pas suffisantes pour permettre un effet au niveau cellulaire.

Pour la méthode de « diffusion inverse », le composé est libéré en « burst release » avec 100% de l'actif délivré en 2 à 3h (Figure 66c et d) dont 50% en moins de 20 min (Tableau 25). Le profil des trois premières heures de libération, correspond au modèle de libération décrit par Korsmeyer et Peppas [343] (Tableau 26), de la même façon que la molécule A (Tableau 22).

Tableau 26 : Valeurs de corrélation au modèle (r^2), et des paramètres « k » et « n » calculés à partir de l'équation de Korsmeyer

Méthode	Porosité	STMP 3			STMP 2.25			STMP 1.5		
		R ²	k	n	R ²	k	n	R ²	k	n
Diffusion inverse	$\mu\text{PuD}_{(75:25)}$	0,995	0,67	0,38	0,969	0,76	0,30	0,995	0,68	0,34
	$\text{MPuD}_{(75:25)}$	0,995	0,67	0,38	0,991	0,70	0,37	0,994	0,86	0,24

On retrouve une valeur de l'exposant « n » qui suggère dans ce cas aussi, que la libération du composé suit la loi de Fick ($\leq 0,5$) [344]. Le système suivrait alors une libération par diffusion contrôlée, qui ne dépendrait pas du gonflement de la matrices [261]. Cela correspond à l'absence d'impact significatif de la concentration en STMP ou de porosité sur la cinétique de libération. Par ailleurs, les peptides sont de taille inférieure à 3,5kDa. En absence d'interactions spécifiques avec le réseau de polymères des hydrogels, la libération se fait alors suivant le même profil.

D'autres stratégies pourraient être explorées pour améliorer la rétention du composé B dans l'hydrogel par des procédés chimiques ou physiques [252]. Une possibilité serait de greffer le composé au réseau de polymère. Pour ce faire, la réaction EDC/NHS [350] permettrait de lier les groupements amines primaires du peptide à des fonctions carboxyles préalablement ajoutées sur le pullulane ou le dextrane. Une autre méthode serait de créer des interactions électrostatiques avec les charges négatives du composé B et des charges positives greffées au réseau de polymère. Ce procédé permettrait éventuellement de ralentir la cinétique de libération. Pour cela, des charges positives doivent être apportées au support. Cette technique de fonctionnalisation a été étudiée ci-après.

II.2.c) Fonctionnalisation par des charges positives

Une des caractéristiques de la molécule B est sa charge négative quand le pH est supérieur à 3,5 (Figure 63). Cette propriété est utilisée pour former des interactions électrostatiques avec le réseau de l'hydrogel. Pour cela, les hydrogels doivent alors porter des charges positives. Un procédé possible est d'utiliser du dextrane préalablement modifié, nommé « D+ » (Mw 500kDa) pour synthétiser ce matériau, non détaillé pour des raisons de confidentialité. Il est introduit en remplacement total du dextrane. Cette étude a été menée sur des hydrogels synthétisés avec un agent porogène, le NaCl (μ) et un seul taux de STMP (2,25%). Deux ratios de polysaccharides ont été formulés avec ce dextrane modifié : 75:25 et 50:50 (respectivement pullulane : dextrane+). Les formulations $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25$ et $\mu\text{PuD}_{(50:50)}2.25$ ont ainsi été synthétisées.

Dans un premier temps, la faisabilité de la synthèse et l'évaluation des caractéristiques qui découlent de ces matrices fonctionnalisées ont été analysées. Les solutions avec les différents polysaccharides ont été préparées (Figure 67).

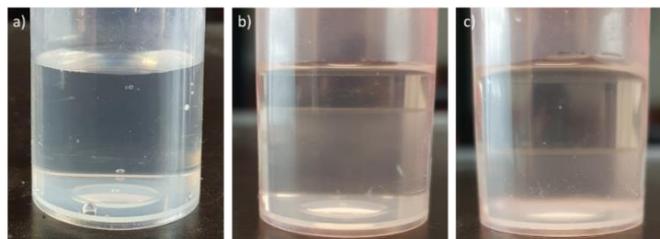


Figure 67 : Photographies des solutions de polysaccharides des formulations (a) $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$, (b) $\mu\text{PuD}^{+}_{(75:25)}$ et (c) $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}$.

Les hydrogels ont ensuite été synthétisés suivant le même procédé que précédemment. Ils ont été dans un premier temps observés macroscopiquement, avant et après lyophilisation (Figure 68) puis en microscopie électronique à balayage à l'état lyophilisé (Figure 69).

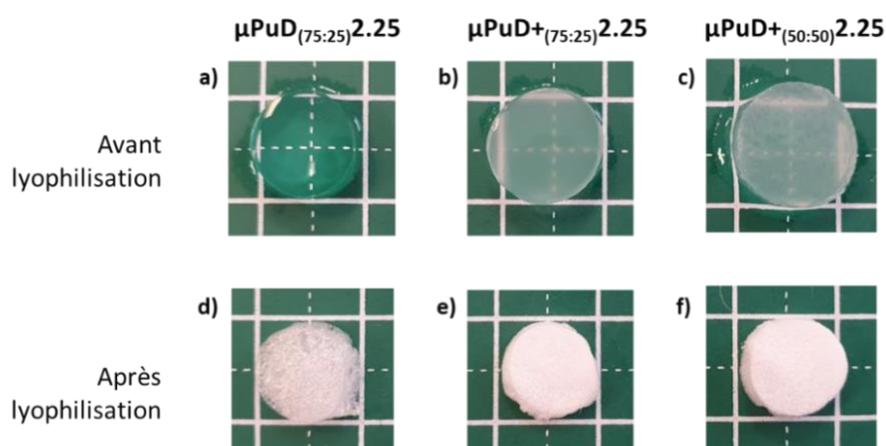


Figure 68 : Photographies de matrices synthétisées sans et avec le Dextrane modifié (D+) à l'état hydraté (a à c) et à l'état lyophilisé (d à f).

Macroscopiquement et avant lyophilisation, les matrices fonctionnalisées apparaissent opaques et blanches (Figure 68b et c) tandis que les matrices contrôles non fonctionnalisées sont translucides ($\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25$, Figure 68a). Il est à noter que les matrices s'opacifiaient au fur et à mesure des étapes de rinçage. Par ailleurs, les matrices $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}2.25$ présentent un aspect granuleux (Figure 68c) alors que les $\mu\text{PuD}^{+}_{(75:25)}2.25$ semblent lisses et homogènes, similaires au contrôle (Figure 68b et a). A l'état lyophilisé, les matrices fonctionnalisées conservent un aspect différent (Figure 68d à f). Elles semblent en effet plus denses et moins poreuses que le contrôle. Pour confirmer cette observation, la surface des matrices lyophilisées a été analysée en MEB (Figure 69).

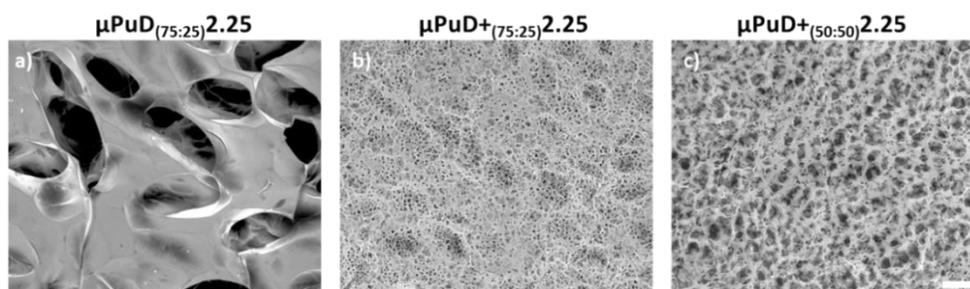


Figure 69 : Images MEB des matrices synthétisées sans (a) et avec du dextrane modifié à 25% (b) et à 50% (c) en ratio de polysaccharides. Echelle 200 μm applicable à toutes les images.

Les différences de topographie constatées macroscopiquement ont été confirmées à l'échelle microscopique. En effet, la matrice contrôle (Figure 69a) présente une surface relativement lisse avec des pores de grandes tailles (grand axe environ $500\mu\text{m}$). Les formulations fonctionnalisées possèdent une surface rugueuse avec des pores circulaires et de tailles inférieures (environ $50\mu\text{m}$ de diamètre) (Figure 69b et c). Les matériaux les plus riches en polymère D+ ($\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}2.25$) présentent également des aspérités (Figure 69c), qui rappellent la structure granuleuse observée avant lyophilisation (Figure 68c).

Pour évaluer l'effet des charges positives sur les capacités d'absorption des hydrogels fonctionnalisés, des études de gonflement ont été réalisées par immersion des formulations lyophilisées dans du PBS 1X (Figure 70).

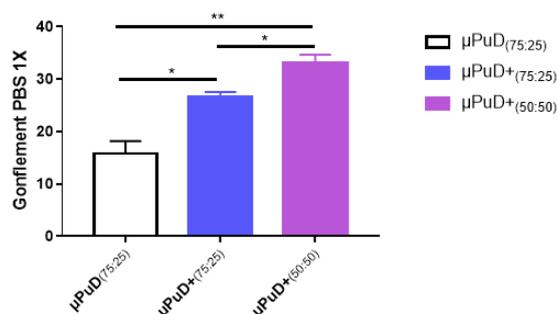


Figure 70 : Taux de gonflement des matrices fonctionnalisées ou non dans le PBS 1X. "*" et "**" indiquent des différences significatives avec $p < 0,05$ et $0,01$ respectivement ($n=4$).

Les matrices formulées avec 25% et 50% de dextrane modifié gonflent respectivement 1,7 et 2 fois que leur contrôle dans le PBS (Figure 70a). Ces charges positives se repousseraient alors et étendraient le réseau de polymères, permettant une rétention plus importante de solvant [351]. Le taux de réticulation pourrait également être responsable de ces différences de propriétés de gonflement. En effet, les groupements porteurs des charges pourraient gêner la réaction de greffage par le STMP et former un réseau moins réticulé et avec des chaînes plus extensibles. D'une part, ils

sont greffés sur des sites de réaction du STMP et en diminuent la disponibilité ; et d'autre part l'encombrement stérique et la charge qu'ils apportent pourraient également interférer avec la réaction de réticulation. Cependant, la méthode de quantification de phosphore par dosage colorimétrique (I.1.b.i) n'a pas permis d'estimer la quantité qui a été greffée dans les formulations fonctionnalisées. Le mélange réactionnel a conduit à la formation d'un précipité empêchant l'analyse des échantillons. D'autres méthodes sont à envisager pour analyser le greffage du phosphore.

La formulation de matrices à base de pullulane et de dextrane modifié a été réalisée avec succès. Ces formulations ont par la suite été chargées en composé B par méthode de diffusion inverse (Figure 59). La méthode *in situ* n'a pas été étudiée de par sa faible incorporation et son profil de libération déjà lent dans l'étude précédente. Les matrices contrôles, $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$, et fonctionnalisées, $\mu\text{PuD}^{+}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$ et $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}2.25\text{Bd}$, ont ainsi été synthétisées. Les hydrogels $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}2.25\text{Bd}$ ont rencontré des difficultés de synthèse par rapport au contrôle sans dextrane modifié. En effet, des résidus d'eau ont persisté après la lyophilisation. Quelques matrices $\mu\text{PuD}^{+}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$ présentaient des zones hydratées tandis que certaines matrices $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}2.25\text{Bd}$ avaient complètement repris en humidité.

Le rendement d'incorporation et la libération *in vitro* ont été caractérisés à partir des échantillons les mieux lyophilisés, d'après la méthode décrite précédemment (voir §II.2.b)(Figure 71).

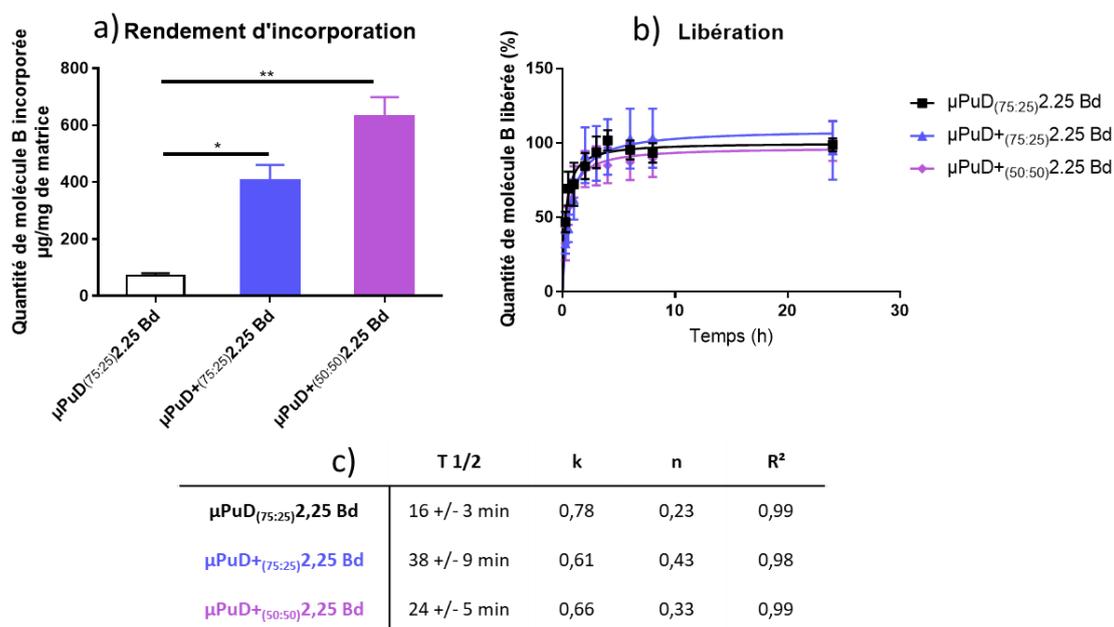


Figure 71 : Incorporation de la molécule B dans les matrices fonctionnalisées par des charges positives (a). Profils de libération (b) et caractéristiques calculées par le modèle de Korsmeyer & Peppas (c). Les différences significatives sont indiquées par "*" et "**" ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, $n \geq 3$).

La quantité d'actif retenue dans les matériaux lyophilisés a été déterminée après hydrolyse alcaline (NaOH 1M, 50°C) (Figure 71a). Le rendement en composé B est 6 fois et 9 fois plus important dans les formulations avec le dextrane modifié par rapport au contrôle : respectivement $\mu\text{PuD}_{(75:25)}^{2.25} \text{ Bd} = 405,0 \pm 55,6 \text{ } \mu\text{g/mg}$, $\mu\text{PuD}_{(50:50)}^{2.25} \text{ Bd} = 629,9 \pm 69,3 \text{ } \mu\text{g/mg}$ contre $\mu\text{PuD}_{(75:25)}^{2.25} \text{ Bd} = 71,7 \pm 7,8 \text{ } \mu\text{g/mg}$. Plus la matrice comporte des charges positives et plus elle est capable de retenir de molécule B. Le composé B est en effet chargé négativement à pH physiologique (Figure 63) formant de liaisons électrostatiques avec les charges positives du dextrane modifié. Cependant, ces rendements très élevés peuvent avoir engendré les problèmes rencontrés pendant l'étape de lyophilisation. Le peptide trop concentré serait plus affiné pour l'eau et affecterait l'efficacité de la sublimation [315].

Toutes les formulations libèrent *in vitro* 100% du composé en trois heures. Les études témoignent d'un profil de diffusion de la molécule en « burst release » suivi d'un plateau (Figure 71c). La première phase de libération a été analysée suivant le modèle de Korsmeyer & Peppas (Figure 71d). La présence et l'augmentation de charges positives n'impactent pas de manière significative la vitesse de libération (Figure 71d). Le modèle de diffusion suit encore une fois la loi de Fick ($n \leq 0,5$) supposant une libération par diffusion contrôlée, indépendante du taux de gonflement. Les interactions entre les charges négatives de l'agent et les charges positives du dextrane modifié ne sont pas assez fortes et sont déstabilisées par les forces ioniques apportées par le PBS.

II.3) Sélection des matériaux

L'incorporation de composés dans les hydrogels de pullulane/dextrane a permis de démontrer que plusieurs facteurs en affectaient l'efficacité de chargement et de libération de composés. En effet, la variation des paramètres de synthèse, tels que la quantité d'agent réticulant et le type d'agent porogène utilisé, a permis de moduler la quantité de molécule d'intérêt retenue. Les formulations « $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ » ont permis d'introduire plus d'agent actif A et B que les « $\text{MPuD}_{(75:25)}$ ». De même, la méthode d'incorporation choisie ainsi que la nature du composé étudié, induisent un rendement d'incorporation différent. A ce propos, la méthode d'incorporation « *in situ* » du peptide B n'a pas démontré d'intérêt particulier car le rendement d'incorporation était faible (<9%) et insuffisant pour provoquer un effet.

Les méthodes de chargement « *in situ* » et post réticulation (diffusion inverse et imprégnation), ont permis d'obtenir deux profils de libération : lent et rapide. Dans le premier cas, les molécules suivent un modèle de libération contrôlé par la chimie (c'est à dire par érosion du matériau) tandis

que le deuxième repose sur un modèle de libération contrôlé par diffusion. Cependant, aucune différence n'a pu être mise en évidence entre les taux de réticulation ou la porosité. De plus, la cinétique de libération était similaire pour les méthodes « diffusion inverse » et « imprégnation ». Cette dernière nécessite une étape supplémentaire de lyophilisation. Elle est donc plus contraignante et sans apport sur les performances. C'est pourquoi seule la méthode par « diffusion inverse » est conservée en plus de la méthode « *in situ* ».

Le taux de réticulation a néanmoins démontré des modifications sur les propriétés physiques des hydrogels. Le taux le plus élevé, STMP3%, présente les capacités de gonflement les plus faibles. Cela impacte la rétention en composé, et est moins intéressant pour l'apport d'un environnement hydraté dans un contexte de plaie. Le taux le plus faible de réticulation, STMP1.5%, entraîne des propriétés mécaniques plus faibles de l'hydrogel, le rendant moins maniable, peu adapté à l'implantation. La concentration intermédiaire, STMP2.25%, constitue donc un bon compromis et est retenue pour les études d'incorporation sur les molécules A et B, les études *in vitro* de caractérisation cellulaire, *ex vivo* et une partie *in vivo*.

De plus, la fonctionnalisation par des charges positives a permis de retenir plus de molécules B sans impact significatif sur la cinétique de libération. Les formulations fonctionnalisées enrichies en peptide B ($\mu\text{PuD}^{+(75:25)}2.25\text{Bd}$ et $\mu\text{PuD}^{+(50:50)}2.25\text{Bd}$) ont rencontré des difficultés de synthèse et ne sont pas conservées pour la suite des caractérisations.

Les justifications évoquées précédemment ont permis de sélectionner les formulations suivantes $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ax}$, $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$ et $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$, pour poursuivre les études suivantes.

II.4) Caractérisation des matériaux sélectionnés

Pour évaluer les propriétés de libération des formulations sélectionnées, des tests de libération sur des modèles *ex vivo* et *in vivo* ont été mis en place, suivis par des études d'interactions cellules/matériaux *in vitro*.

II.4.a) Etudes de libération sur des modèles de peau

La libération et les capacités des molécules à pénétrer dans des substrats ont été évaluées sur des modèles de peau *ex vivo* et dans des modèles de plaie chez l'animal.

I.1.a.i) Pénétration transcutanée

L'étude de pénétration transcutanée est une étude recommandée pour évaluer la pénétration d'ingrédients cosmétiques et de substances pharmaceutiques à travers la peau (OCDE 428[352]). Elle s'intègre à la règle des « 3R »[353] liée à l'expérimentation animale, notamment pour « réduire » le nombre d'animaux par une sélection des échantillons au préalable. L'utilisation de peaux compromises présente un réel intérêt pour étudier le comportement des molécules à travers des barrières altérées.

Les travaux de PTC ont été réalisés sur de la peau de porc explantée. Deux procédés de dégradation des peaux ont été mis en place. Dans un premier temps, la dégradation du tissu cutané est réalisée par un cycle de congélation/décongélation. Cette dégradation est associée, dans un second temps, à des microperforations à l'aide d'un dermaroller. Les peaux saines et compromises ont été analysées pour étudier l'intégrité de la barrière cutanée (Figure 72).

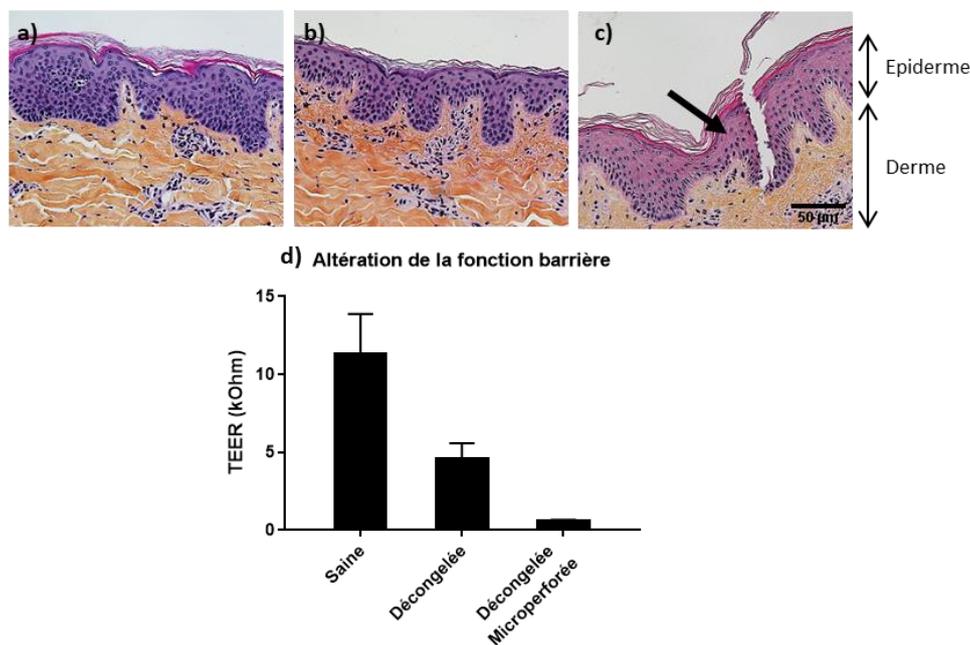


Figure 72 : Coupes histologiques de peau de cochon (a) saine, (b) congelée/décongelée et (c) décongelée/microperforée après coloration HES. Microperforation représentée par la flèche noire. Echelle 50 μm applicable à toutes les images. (d) Valeurs de la résistance transépithéliale des peaux saines et compromises (n=3)

Le résultat microscopique de cette dégradation a été observé sur des coupes histologiques après coloration hématoxyline/éosine/safran (HES) (Figure 72a à c). Seul l'effet de la microperforation est facilement identifiable sur les coupes (Figure 72c) avec une perforation de la couche épidermique jusqu'au début du derme. L'altération de la fonction barrière a été mise en évidence dans des pathologies chroniques et inflammatoires de la peau grâce l'utilisation de méthodes spécifiques [354]. Ces méthodes telles que la résistance transépithéliale (TEER) permettent de suivre la perméabilité de

la peau. Elle consiste à appliquer un courant électrique à travers un échantillon pour en évaluer l'intégrité [304] et est facilement applicable à des explants de peaux. Les valeurs de TEER des différents modèles de peau ont été mesurées (Figure 72d) et diminuent avec les étapes d'altération : $11,4 \pm 2,4 \text{ k}\Omega$ pour les peaux saines, $4,6 \pm 1,0 \text{ k}\Omega$ pour les peaux congelées/décongelées et $0,6 \pm 0,1 \text{ k}\Omega$ pour les peaux décongelées/microperforées. La congélation préalable des peaux à -20°C sans cryoprotectant semble altérer la perméabilité des échantillons par la formation de cristaux de glaces dans le tissu. Les tissus de la peau semblent moins denses ce qui expliquerait la diminution de la valeur de TEER. Ajoutée à cette étape de congélation/décongélation, la perforation de l'épiderme augmente la diminution de la TEER. La couche cornée de l'épiderme est la couche la plus externe de la peau dont les cellules, les cornéocytes, constituent la barrière la plus efficace contre les agents extérieurs [355]. L'application du dermaroller a engendré une rupture de l'intégrité de cette couche et donc une valeur de TEER plus faible. Ces données ont permis de valider l'efficacité des méthodes de dégradation des peaux. Le modèle le plus compromis, par congélation/décongélation + microperforations, a été sélectionné pour analyser la libération et la pénétration des composés A et B à partir des formulations sélectionnées.

La libération et la pénétration des composés actifs fluorescents A-DTAF (Figure 73) et B-FITC (Figure 74) ont donc été étudiées sur ces peaux altérées. Les formulations des hydrogels sélectionnés ont été confrontées à une formulation en crème « Cr-A » et « Cr-B ». Il s'agit ainsi de comparer les propriétés d'échantillons sous forme d'agent topique et de biomatériau. La distribution des molécules dans les compartiments de la cellule de Franz a été mesurée 15h après le dépôt des échantillons. A la fin de l'expérience, les différents compartiments ont été récupérés : les formulations résiduelles, les couches de la peau (derme et épiderme) ainsi que les sous-nageants (Figure 46). La fluorescence liée à la molécule d'intérêt a été mesurée après traitement de chacun des échantillons (Figure 73 et Figure 74).

Dans un premier temps, les formulations réalisées avec la molécule A ont été analysées (Figure 73).

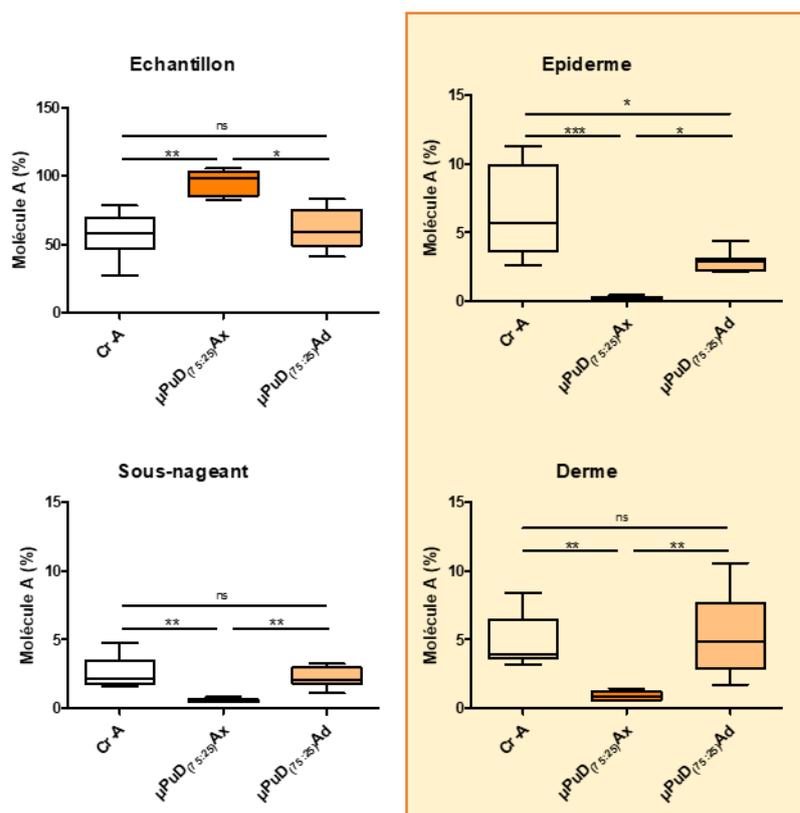


Figure 73 : Quantité de molécule A retrouvée dans la peau (encadré orange) et dans la cellule de Franz après 15h. Les différences significatives sont indiquées par “*”, “**” et “***” (p<0,05, p<0,01 et p<0,001 respectivement) et « ns » indique une absence de différence significative (p>0,05) (n≥6).

Pour les matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ax}$ dont la molécule A a été incorporée par la méthode « *in situ* » (orange foncé), près de la totalité du composé a été retrouvé dans la matrice ($95,6 \pm 9,4\%$). Une quantité infime de fluorescence a pu être mesurée dans la peau (épiderme = $0,2 \pm 0,1\%$ et derme = $0,9 \pm 0,4\%$) et dans le sous-nageant ($0,55 \pm 0,1\%$). Ces résultats concordent avec ceux observés dans les essais de libération *in vitro* (Figure 61). Comme envisagé dans les études précédentes, la molécule A est potentiellement liée de manière covalente au réseau de polymères. Elle ne peut diffuser à moins d'une dégradation de l'hydrogel.

Contrairement à la méthode *in situ*, lorsque le composé a été chargé dans l'hydrogel par diffusion inverse ($\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$, orange clair) ou formulé en crème (Cr-A), il est en partie libéré et capable de traverser toutes les couches de la peau. En effet, $62,0 \pm 14,9\%$ de la molécule A est retrouvée dans la matrice $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$ après 15H. Elle a pénétré dans la peau à hauteur de $2,8 \pm 0,8\%$ dans l'épiderme, $5,5 \pm 2,7\%$, dans le derme et jusque dans le sous-nageant ($2,2 \pm 0,7\%$). Le composé a été libéré de façon similaire pour la formulation Cr-A à l'exception de l'épiderme où il est deux fois plus retenu que la formulation hydrogel. Le caractère lipophile de la crème doit potentialiser la rétention de la molécule A par les lipides intercellulaires de la couche cornée de l'épiderme [356]. Toutefois,

28% du composé A ne sont pas retrouvés pour les formulations crème Cr-A et matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$. Cette perte est probablement le résultat des multiples étapes de récupération et de traitement des différents compartiments. La molécule A présente ainsi des propriétés de diffusion à travers un modèle de peau compromise similaire entre une formulation crème et hydrogel. Les matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$ présentent cependant l'avantage de fournir et maintenir un environnement humide, crucial pour le traitement des plaies cutanées [142], [191], [193].

Dans un second temps, la diffusion de la molécule B à partir des hydrogels ($\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$) a été comparée à une formulation topique en crème (Cr-B) dans un modèle de peau compromise (Figure 74).

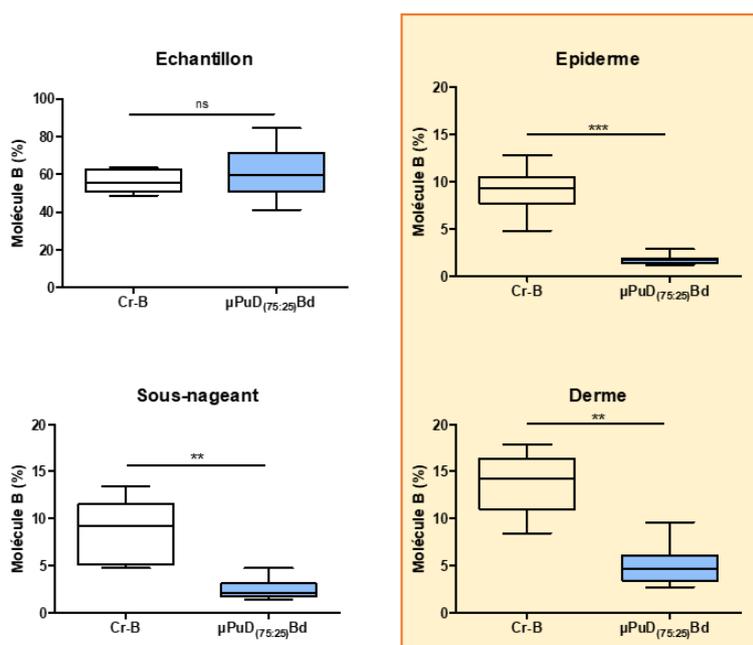


Figure 74 : Quantité de molécule B retrouvée dans la peau (encadré orange) et dans la cellule de Franz après 15h. Les différences significatives sont indiquées par "*** et "**" ($p < 0,01$ et $p < 0,001$) et "ns" indique une absence de différence significative ($p > 0,05$) ($n \geq 6$).

Environ 60% de molécule B est retrouvé dans les formulations (Cr-B = $56,3 \pm 5,9\%$ et $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$ = $60,72 \pm 12,8\%$) après 15h d'incubation. De la fluorescence a été mesurée dans le sous-nageant dans les deux cas : Cr-B = $8,5 \pm 3,5\%$ et $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$ = $2,5 \pm 1,0\%$. La molécule B est donc capable de traverser les couches de la peau à partir des deux types de formulations. Cependant, la molécule est présente en quantité plus élevée dans la peau quand elle diffuse à partir de la crème (épiderme = $9,1 \pm 2,6\%$ et derme = $13,8 \pm 3,4\%$) qu'à partir de la matrice $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$ (épiderme = $1,8 \pm 0,5\%$ et derme = $5,1 \pm 2,0\%$). Elle est également retrouvée à des concentrations 4 fois supérieures dans le sous-nageant. La diffusion serait améliorée grâce à l'association des propriétés lipophiles de la crème et la nature peptidique du composé B [357], [358].

Les formulations fonctionnalisées avec les molécules A et B par diffusion inverse ($\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$ et Bd) présentent des profils de libération de leurs agents similaires à travers les différents compartiments de la peau. Les composés n'ont cependant pas complètement diffusé à l'extérieur des hydrogels après 15h, à la différence de ce qui avait été démontré par les études de libération *in vitro* (Figure 61 et Figure 66). Il a été montré que la diffusion des composés A et B se faisaient suivant la loi de Fick, indépendamment du gonflement des matrices (§II.1.b) et II.2.b)). La relation indique que la diffusion des solutés repose sur l'équilibre des concentrations entre les compartiments considérés [359]. Ce phénomène est alors régulé par la quantité de milieu présent dans l'environnement et capable d'hydrater les matrices. Les conditions diffèrent entre le modèle de pénétration transcutanée et celles des études *in vitro*. Dans ce dernier, les hydrogels sont immergés dans un seul compartiment liquide, en large excès dans lequel les composés diffusent sans barrière. Dans les cellules de Franz, les matrices sont hydratées par un petit volume de solvant et sont maintenues dans un environnement humide. Les molécules diffusent de la matrice vers la peau. Le compartiment de diffusion est ainsi multiple et plus complexe, plus proche des conditions d'application visées. La diffusion du modèle d'étude *ex vivo* repose ainsi principalement sur la quantité de milieu du compartiment receveur, et correspondant à l'exsudat dans le cadre de plaie cutanée.

II.4.a.i) Modèles de plaie cutanée

Des études de libération ont ensuite été réalisées dans des modèles de plaies cutanées chez l'animal. Pour ce faire, des plaies ont été réalisées par abrasion chimique et/ou par excision cutanée de profondeur totale chez le rongeur. La libération des composés a pu être suivie par radioactivité (Figure 75) et en fluorescence (Figure 76 et Figure 77)

La manipulation d'éléments radioactifs est contraignante du point de vue de la sécurité et limitée par leur stabilité dans le temps. La seule méthode d'incorporation qui permette d'effectuer une étude de suivi en radioactivité est la méthode d'incorporation par « imprégnation », similaire à la diffusion inverse dans les études *in vitro* (Figure 61). En effet, la molécule A radiomarquée peut être ajoutée directement dans la matrice et l'ensemble est implantable directement au sein des plaies, sans étape de synthèse intermédiaire. Pour confirmer les résultats *in vitro*, différents taux de réticulation ont été étudiés *in vivo*. Pour ce faire, les formulations ont été réalisées avec les concentrations extrêmes de STMP étudiées (3% et 1,5% m/v). Elles ont ensuite été imprégnées par le A-99mTC pour obtenir les conditions $\mu\text{PuD}_{(75:25)}3\text{Ai}$ et $\mu\text{PuD}_{(75:25)}1.5\text{Ai}$. Ces matrices ont été comparées à une solution d'A-99mTc après apposition dans deux types de plaies chez le rat : abrasion chimique

et excision totale de peau. Les échantillons ont été retirés et les zones décontaminées après 2H d'incubation. Les animaux ont enfin été analysés par imagerie TEMP (Figure 75).

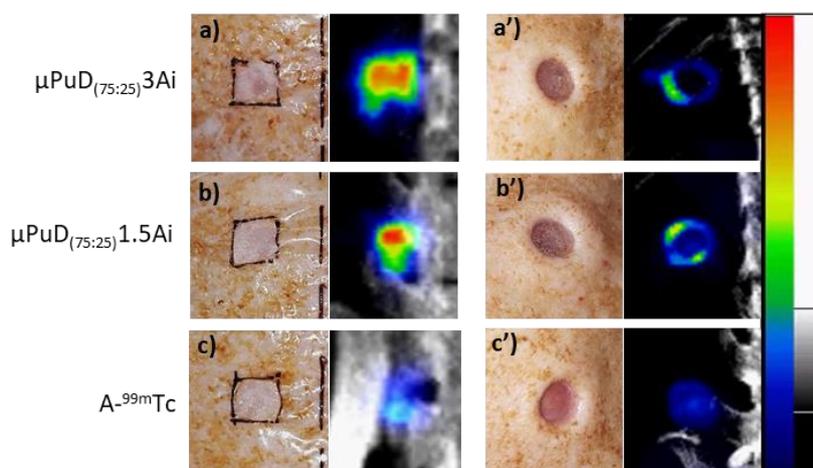


Figure 75 : Suivi de la libération de la molécule A-99mTc dans des plaies réalisées par abrasion chimique (images a à c) et excision totale (a' à c') avec les acquisitions en TEMP (images à droite). L'échelle de couleur représente l'intensité de la radioactivité (faible en bleu et intense en rouge) et l'échelle en noir et blanc représente la densité des tissus (faible en noir et intense en blanc).

L'intensité de la radioactivité liée à la présence de la molécule A dans les lits de la plaie (Figure 75) est plus forte que lorsqu'elle a été déposée en solution. Cela s'applique aux deux modèles de plaies, que cela soit dans le cas des brûlures (Figure 75 Figure 77a à c) ou de perte de substance totale (Figure 75a' à c'). La formulation en hydrogel semble apporter une pénétration plus importante dans les zones brûlées (Figure 75a et b). De plus, dans le modèle d'excision, le composé A est localisé au niveau des berges des plaies (Figure 75a' et b'). Le contact des matrices avec les zones lésées doit permettre une meilleure diffusion de la molécule A grâce à l'apport et au maintien d'un environnement humide pendant les deux heures d'incubation. De plus, l'utilisation d'un support tridimensionnel permet de combler la perte de substance des plaies. Ce contact direct entre les matériaux et les berges de la plaie permet ainsi la diffusion plus efficace du composé (Figure 75a' à b') par rapport à la solution seule (Figure 75c'). La formulation en matrice démontre ainsi un réel intérêt par rapport à l'application topique de composés. A partir de ces résultats, il n'a cependant pas été possible de déterminer si le taux de réticulation avait un effet. Il faudrait poursuivre ces études sur un plus grand nombre d'animaux et développer une méthode de quantification adaptée pour pouvoir conclure.

Ensuite, les dispositifs précédemment sélectionnés (§II.3), ont été étudiés dans des modèles de plaies d'excision totale de peau chez la souris. Ils ont été déposés au sein des plaies et les zones d'intérêt ont été explantées après 2h (Figure 76) et 4 jours (Figure 77). Les coupes histologiques obtenues ont été observées en fluorescence grâce au marquage préalable de la matrice avec du

dextrane TRITC (rouge), des composés greffés avec du DTAF/FITC (vert). L'observation en contraste interférentiel (photomultiplicateur, PMT) de l'ensemble de l'échantillon a également été réalisée.

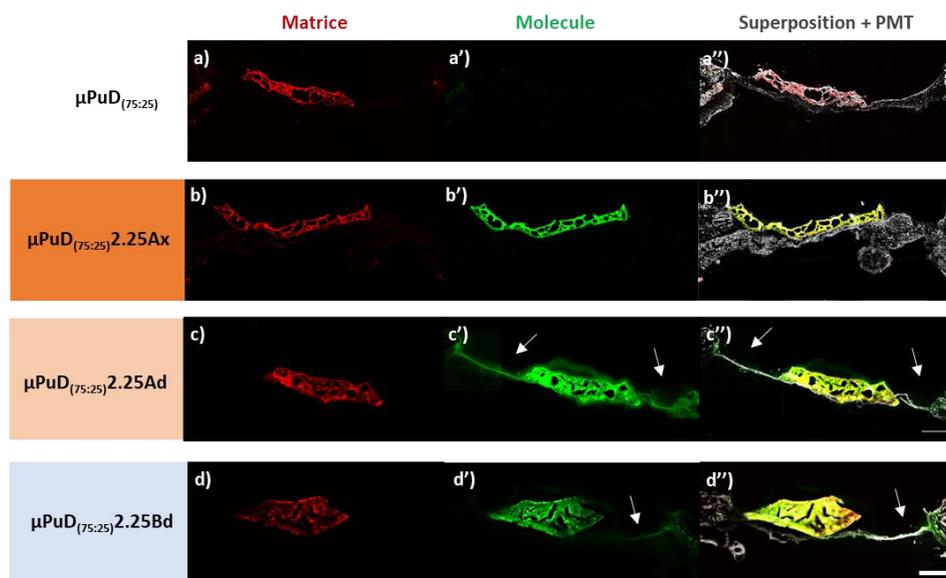


Figure 76 : Etude de libération *in vivo* dans un modèle de plaie d'excision totale chez la souris. Coupes histologiques de tissus frais 2H après aposition des formulations et observation au microscope (Zeiss LSM 780). Les matrices sont représentées en rouge (images a à d), les composés actifs en vert (images a' à d'). Ces images ont été superposées au signal PMT (images a'' à d''). Diffusion des molécules dans le lit de la plaie (flèches blanches). Echelle : 500 μ m ; applicable à toutes les images.

Après 2h d'implantation, tous les hydrogels ont été observés dans le lit des plaies (Figure 76a à d et a'' à d''). Le signal fluorescent de la molécule A incorporée par la méthode « *in situ* » (μ PuD_(75:25)Ax), est colocalisé avec celui de l'hydrogel (Figure 76b'') mais pas au niveau de la peau (Figure 76b'). Le signal des molécules A et B incorporées par diffusion inverse, était colocalisé avec celui de l'hydrogel mais également retrouvé au niveau du lit et des berges de la plaie (respectivement Figure 76c'' et d''). Ces résultats corroborent les profils de libération observés *in vitro* (Figure 61 et Figure 66) et *ex vivo* (Figure 73 et Figure 74). Par ailleurs, comme dans les études sur les peaux compromises de cochon, les matrices des formulations μ PuD_(75:25)2.25Ad et μ PuD_(75:25)2.25Bd contiennent encore des composés après de 2h d'incubation.

Les matrices ont été implantées pendant quatre jours dans des plaies d'excision totale chez la souris. Les explants ont aussi été analysés en microscopie, comme décrit précédemment (Figure 77).

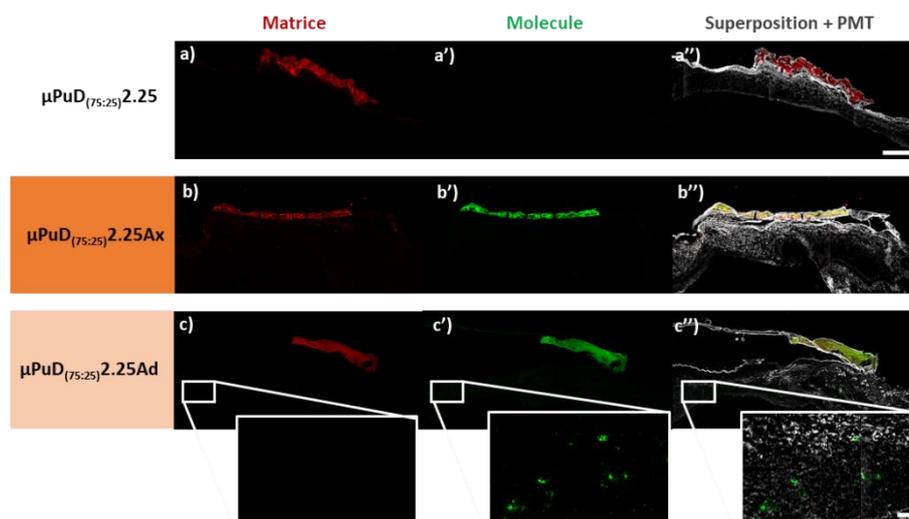


Figure 77 : Etude de libération *in vivo* dans un modèle de plaie d'excision totale chez la souris. Coupes histologiques de tissus frais 4 jours après aposition des formulations et observation au microscope (Zeiss LSM 780). Les matrices sont représentées en rouges (images a à c), les composés actifs en vert (images a' à c'). ces images ont été superposées au signal PMT (images a'' à c''). Echelle 500μm applicable à toutes les images. Encarts de zooms des images c, c' et c'' avec, échelle de 50μm applicable aux trois images.

La formulation $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Bd}$ n'a pas pu être analysée au 4^e jour d'implantation car le composé B-FITC n'a pas été bien toléré par la plaie. Toutefois, il n'y a pas eu de réaction similaire pour les matrices contrôles et formulées avec le composé A. Elles ont ainsi pu être analysées. La fluorescence des matrices et des actifs a été maintenue après 4 jours d'implantation cutanée (Figure 77). Les matrices sont restées dans les lits de plaies et semblent en avoir adopté la forme (Figure 77a'' à c''). Le composé A est encore présent dans les matrices des conditions $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ax}$ et $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$ (Figure 77b' à c') dont le signal se superpose à celui des hydrogels dans les deux cas. Bien qu'il n'y ait pas de diffusion visible de la molécule A pour la formulation $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$ (Figure 77c'), des particules fluorescentes ont été retrouvées dans l'épaisseur du tissu sous-jacent (Figure 77c' encart). Le composé qui a pu être délivré comme observé à 2h a pu pénétrer dans les tissus. Cependant les niveaux d'exsudat et d'humidité du milieu de la plaie n'ont pas été suffisants pour permettre la diffusion du composé A dans sa totalité. Au contraire, pour la formulation $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ax}$ il n'y a pas de traces de fluorescence liée à la molécule A en dehors de l'implant (Figure 77b'').

Les études de libération *ex vivo* et *in vivo* ont ainsi permis de corréler les observations de libération dans les études *in vitro*. Les principales différences sont conservées. Des cinétiques de diffusion sont toutefois différentes du fait de la différence entre les modèles étudiés.

II.4.b) Interactions cellules/matériaux

Les biomatériaux destinés à être au contact d'un organisme vivant doivent engendrer une réponse appropriée de l'hôte. Ils peuvent alors être soumis à plusieurs essais *in vitro*, normés (ISO 10993-5 [360]), qui permettent de déterminer la sécurité biologique et étudier leur potentielle cytotoxicité [361]. Il existe pour cela des tests de mise en contact, de manière directe ou indirecte, entre des cellules et les matériaux étudiés. Le contact indirect permet d'évaluer si les dispositifs libèrent des composés toxiques. Le contact direct permet en plus, d'observer les modifications morphologiques et d'activité métabolique des cellules au contact des matériaux. L'évaluation de la toxicité a ainsi été évaluée après mise en contact indirect (Figure 78) et direct (Figure 79) entre des fibroblastes dermiques humains normaux (FHN) en culture primaire et les matériaux sélectionnés.

Pour les études de cytotoxicité par contact indirect (Figure 78), du milieu de culture a été incubé avec les matériaux pendant 24h puis mis en contact avec des tapis cellulaires de fibroblastes dermiques humains. Les échantillons ont été comparés à deux contrôles : le contrôle de survie « Ctrl positif » représente les tapis cellulaires incubés avec du milieu non traité et le contrôle de mort « Ctrl négatif » dont les puits ont été incubés 10 min avec du triton 0,1%. Après 24h de contact, les tapis cellulaires ont été marqués avec un kit de viabilité (live/dead assay®) (Figure 78a à g) et les surnageants ont été prélevés pour évaluer la libération de la lactate déshydrogénase (Figure 78h).

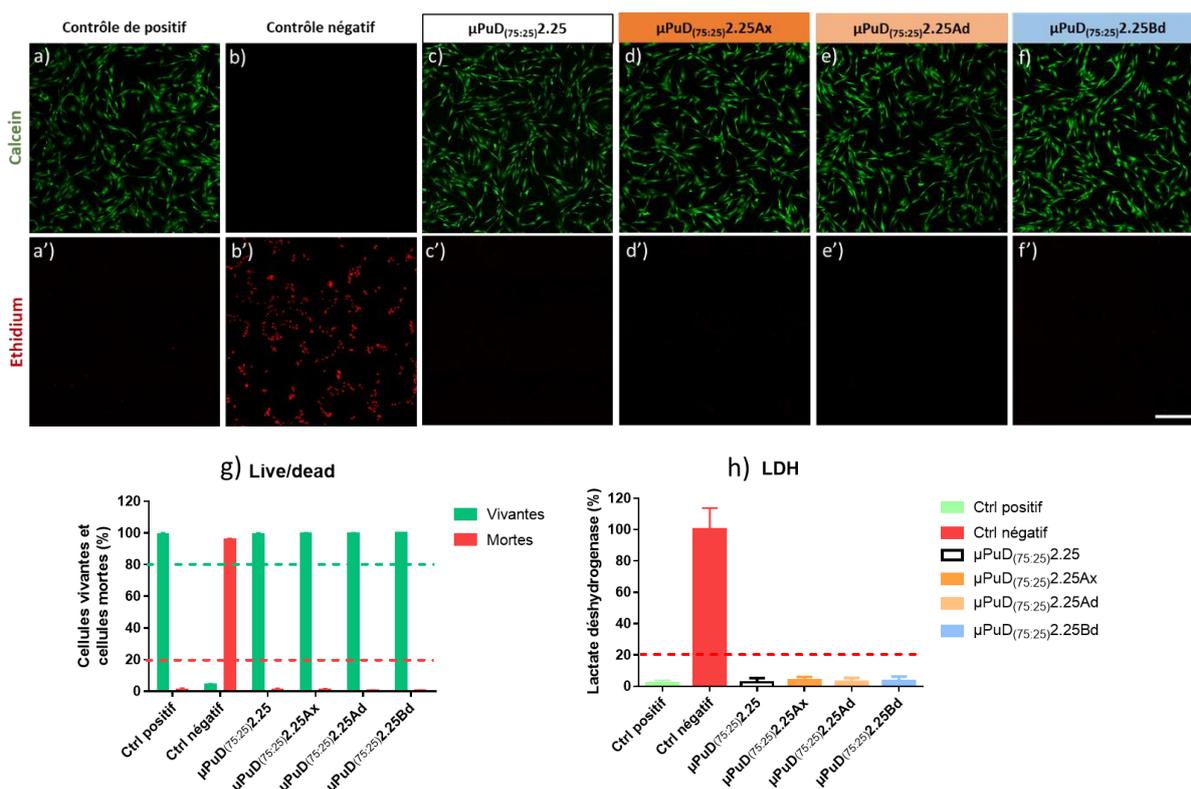
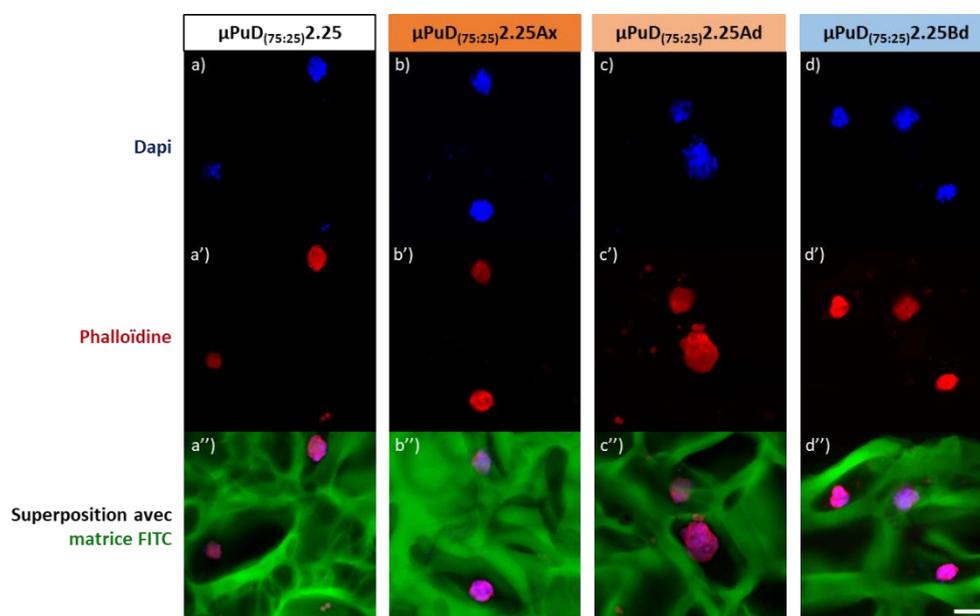


Figure 78 : Etude de cytotoxicité par contact indirect de tapis cellulaire 2D et des formulations. Images (a à f') acquisition des tapis cellulaires après marquage de vie cellulaire par de la calcéine (vert, images a à f) et de mort par du bromure d'éthidium (rouge, images a' à f'), (Zeiss AxioCam 208). Echelle 500 μm applicable à toutes les acquisitions (a

à f'). Figures (g) et (f) représentent respectivement le taux de survie cellulaire par quantification vie/mort et le taux de lactate déshydrogénase libérée dans le milieu (n≥3). Les lignes pointillées représentent les limites minimale de viabilité (vert) et maximale de mortalité (rouge) qui déterminent la cytotoxicité des matériaux.

Après 24H d'incubation, les cellules du contrôle de survie sont étalées (Figure 78a) avec plus de 98% de cellules vivantes (Figure 78g). Les cellules du contrôle de mort (Figure 78b et b') ont une morphologie ronde (Figure 78b') avec un taux de mortalité supérieur à 95% (Figure 78g). Les tapis cellulaires incubés avec du milieu préconditionné par les matériaux (Figure 78c à f') ont démontré le même comportement que le contrôle de survie avec une survie cellulaire supérieure à 99% (Figure 78g). Ces résultats ont été confirmés après l'évaluation de la quantité de lactate déshydrogénase (LDH) libérée par les cellules. Cette enzyme est libérée quand la paroi des cellules est endommagée et témoigne de la mort cellulaire. Moins de 4% de LDH a été retrouvée dans les surnageants (Figure 78c) pour le contrôle de survie et les formulations testées. Ces études de cytotoxicité indirect permettent de confirmer l'absence de produits cytotoxiques libérés par les matrices de pullulane/dextrane ($\mu\text{PuD}_{(75:25)2.25}$). De plus, les formulations capables de libérer les ingrédients actifs A et B (voir II.1.b) et II.2.b), n'ont pas provoqué de toxicité cellulaire.

Les fibroblastes ont par la suite été ensemencés dans les matrices par hydratation des matériaux lyophilisés avec une suspension cellulaire. La morphologie des cellules a été observée après 4 jours de culture (Figure 79a à d'') par un marquage du noyau (DAPI) et du cytosquelette (Phalloïdine) dans l'hydrogel synthétisé avec du dextrane FITC. L'activité métabolique a également été évaluée après 4 et 8 jours de culture cellulaire (Figure 79d). Elle a été normalisée à l'activité mesurée à 24h pour s'affranchir des différences liées à l'ensemencement.



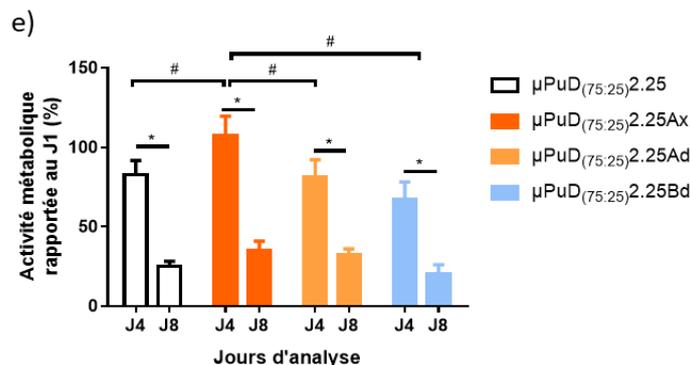


Figure 79 : (a à d'') Projection Z en moyenne d'intensité (ImageJ®) des images des cellules après 4 jours de culture dans les matrices (LSM Zeiss 780). Les images (a à d) représentent le noyau marqué par du DAPI (bleu), les images (a' à d') le cytosquelette avec la phalloïdine (rouge). Les images (a'' à d'') sont la superposition des images (a à d') avec les matrices marquées au FITC. Echelle 100 μm applicable à toutes les images. (d) Activités métaboliques des cellules mesurées aux jours 4 et 8 après ensemencement et normalisées par rapport au jour 1. Les différences statistiques sont indiquées par * et # ($p < 0,05$, $n \geq 3$).

Après ensemencement dans les matériaux, peu de cellules étaient présentes dans les hydrogels pour toutes les formulations (Figure 79). Les cellules sont réparties dans la profondeur des matériaux et sont localisées à l'intérieur des pores des matrices. Les cellules sont rondes et regroupées sous forme d'agrégats. Cette morphologie peut s'expliquer par un défaut d'adhésion à l'hydrogel. La présence de composés A ou B (Figure 79b à d) ne semble ni affecter la morphologie ni la colonisation des cellules dans les hydrogels. Après 4 jours de culture, les cellules ensemencées dans la formulation $\mu\text{PuD}_{(75:25)}\text{Ax}$ possèdent l'activité métabolique la plus élevée ($107 \pm 12\%$) par rapport aux autres conditions. Les formulations $\mu\text{PuD}_{(75:25)}\text{Ad}$ et $\mu\text{PuD}_{(75:25)}\text{Bd}$ (respectivement de $81 \pm 11\%$ et $67 \pm 10\%$) ont une activité similaire à la formulation sans actif ($\mu\text{PuD}_{(75:25)} = 83 \pm 7\%$). Il a été démontré que les molécules incorporées par diffusion inverse dans les matériaux ($\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ad}$ et Bd), étaient rapidement libérées dans les surnageants (Figure 61 et Figure 66). Dans les conditions de culture, le milieu nutritionnel doit être changé et les composés ne sont alors plus en contact avec les cellules. Au contraire, dans la formulation $\mu\text{PuD}_{(75:25)}2.25\text{Ax}$, la molécule A est retenue dans l'hydrogel et permet un contact prolongé avec les cellules, cela peut ainsi affecter leur activité métabolique (Figure 61). Néanmoins, l'activité métabolique diminue significativement pendant les 4 jours de culture suivants jusqu'à atteindre 35% de l'activité initiale à J8, et ce malgré la présence des molécules actives (Figure 79e). Bien que les molécules aient démontré des effets sur les cellules de la peau, elles n'apportent pas les éléments nécessaires aux hydrogels pour supporter la colonisation cellulaire. Les cellules adoptent alors cette morphologie ronde et en agrégat. Dans cette conformation, les cellules ne doivent pas être capables de migrer, de se diviser ni de sécréter les facteurs nécessaires à la cicatrisation. Par ailleurs, si les FHN sécrètent des protéines pour construire de la MEC malgré leur morphologie, celles-ci ne doivent pas pouvoir s'adsorber au matériau pour permettre leur étalement

et leur migration. De plus, l'absence d'adhésion aux hydrogels peut conduire à une diminution possible du nombre de cellules retenues dans les matériaux au cours du temps. Ces différents phénomènes pourraient expliquer la diminution d'activité métabolique.

III] Conclusion sur l'incorporation et la libération de molécules actives

Dans la première partie de ce travail, six hydrogels possédant des propriétés physicochimiques différentes ont été formulés. Leurs propriétés mécaniques, leur capacité de gonflement et leur dégradabilité ont été modulées par la variation de leur concentration en agent réticulant et du porogène utilisé.

Dans la seconde partie, des composés A et B, dont les activités pourraient favoriser la réparation cutanée, ont été ajoutés à l'aide de plusieurs méthodes dans ces formulations. Le rendement de l'incorporation des molécules dépend de leur nature, des propriétés physico-chimiques des matrices et de la méthode d'incorporation utilisée. Deux profils de libération *in vitro* ont été mis en évidence à partir des formulations obtenues. Ces deux profils ont été retrouvés dans des modèles *ex vivo* et *in vivo*. Ils sont dépendants de la méthode d'incorporation utilisée. La méthode « *in situ* » a permis d'introduire des composés avant l'étape de réticulation, probablement liés de manière covalente au réseau de polymères pour la molécule A. La libération de la molécule A est lente et dépend de l'état de dégradation de l'hydrogel. Lorsque les composés ont été introduits par les méthodes de « diffusion inverse » et d'« imprégnation », ils sont présents de manière physique dans le réseau sans interactions spécifiques avec les polymères. Les molécules peuvent alors diffuser librement dans le solvant, lorsque le delta osmotique est favorable.

Des matériaux ont été fonctionnalisés par des charges positives pour établir des liaisons électrostatiques avec le composé B chargé négativement. La rétention de la molécule B a été améliorée mais sans pour autant parvenir à moduler sa cinétique de libération *in vitro*. Toutefois la topographie de surface et les capacités d'absorption obtenues restent intéressantes à explorer dans des études ultérieures.

La biocompatibilité des formulations sélectionnées a été testée sur des fibroblastes primaires. Les matériaux ne libèrent pas de composés cytotoxiques à 24h. Cependant, ils ne permettent pas de supporter l'adhésion cellulaire malgré la présence des agents A et B. Dans l'objectif d'applications comme plateforme de libération, l'absence d'adhésion cellulaire n'est pas un inconvénient. En effet, le dispositif peut ainsi être retiré pour le renouvellement du traitement, sans endommager le nouveau

tissu en formation. Par ailleurs, l'incorporation de la molécule A *in situ* semble avoir un effet sur l'activité métabolique des cellules après 4 jours de culture.

A l'issue de ce travail, plusieurs formulations d'hydrogels à base de pullulane, de dextrane et de molécules biosourcées ont pu être mises au point. Ces différents matériaux ont démontré des capacités de libération adaptables de molécules sur des modèles *in vivo* pouvant favoriser la cicatrisation. L'absence d'adhésion cellulaire à la surface des matériaux permet leur changement régulier sans risque d'endommager un tissu en formation et permettre un renouvellement régulier du traitement. Cependant, ils ne peuvent permettre de soutenir la reformation de tissu en tant que matrice provisoire et servir de substitut cutané. Un nouvel axe d'étude a donc émergé pour développer ce type de matériaux. Pour ce faire, deux types de modifications ont été abordés. Dans un premier temps une protéine de la MEC a été ajoutée pour former un matériau biohybride. L'utilisation de constituants de la MEC native est très décrite dans la littérature pour améliorer les propriétés actives des hydrogels au niveau cellulaire [362], [363]. Dans un second temps, la fonctionnalisation des hydrogels par les charges positives va être approfondie. Il a en effet été rapporté que la présence de charges positives permettait une adhésion et une prolifération accélérée des fibroblastes [364], [365].

CHAPITRE IV : SYNTHÈSE D'UN SUBSTITUT
CUTANÉ PAR FONCTIONNALISATION DES
HYDROGELS

Dans le chapitre précédent, les hydrogels ont été formulés avec des molécules d'origine naturelle pour former une plateforme de libération. L'incorporation des composés a été réalisée avec succès, formant des dispositifs non cytotoxiques, capables d'agir comme un pansement pour recouvrir les plaies et délivrer leurs molécules. Une autre application possible de ces hydrogels est le comblement de la perte de substance au niveau des plaies, apportant une structure 3D capable d'être colonisée par les cellules de l'hôte. Ces hydrogels auraient ainsi vocation à être utilisés en tant que substitut cutané. Cependant, l'ensemencement de fibroblastes à l'intérieur des matériaux a démontré qu'en l'état, ceux-ci ne permettaient pas l'infiltration cellulaire. Un nouvel axe de recherche a alors été exploré pour améliorer le comportement cellulaire au sein des matériaux d'intérêt. Deux stratégies ont été étudiées pour fonctionnaliser les matériaux : l'addition d'une protéine de la MEC, et l'introduction de charges. Les propriétés physico-chimiques obtenues après ces modifications, les interactions avec les cellules par contact direct et indirect ont été étudiés. Les matériaux sélectionnés à partir des essais précédents ont été étudiés *in vitro* et *in vivo*, par comparaison à un produit commercial.

I] Fonctionnalisation des hydrogels de pullulane/dextrane

I.1) Addition d'une protéine de la matrice extracellulaire

La protéine choisie pour améliorer les propriétés bioactives des hydrogels est le collagène de type I. Ce collagène est le composant majoritaire de la MEC dermique et participe aux propriétés mécaniques et à la migration cellulaire [34], [366]. Il s'agit ici d'un télcollagène, c'est-à-dire qu'il a conservé ses télépeptides, après traitement acide, présents en N et C-terminal impliqués dans la formation des fibres [367]. Ce collagène, extrait de tendons bovins, est déjà couramment utilisé en clinique car il est bien toléré par l'Homme.

Il se présente sous forme de triple hélice et est soluble en condition acide. Le collagène de type I à la propriété de s'auto-assembler en fibrilles puis en fibres, c'est la fibrillogénèse. Plusieurs facteurs impactent ce processus : la température, le pH, la force ionique et la concentration de collagène [368].

Le collagène a ensuite été introduit dans des matrices MPuD, c'est-à-dire synthétisées avec du Na_2CO_3 comme agent porogène. Cette formulation a été sélectionnée pour sa fraction poreuse plus importante (Chapitre III, §I.2.a). Cette propriété est nécessaire pour d'une part favoriser la pénétration cellulaire et d'autre part obtenir une capacité de dégradation plus rapide en augmentant les surfaces spécifiques (Chapitre III, §I.2.c). De plus, le ratio 50 :50 en pullulane/dextrane a été préféré car des études préliminaires réalisées au laboratoire ont démontré que les formulations avec une teneur plus

importante en dextrane se dégradait plus rapidement *in vivo*. Les substituts cutanés sont destinés à être laissés dans la plaie et doivent être capables de se dégrader avec une cinétique adaptée afin d'être remplacés progressivement par le tissu néoformé. Enfin, un seul taux de réticulation a été choisi : 2,25% de STMP pour obtenir un compromis entre dégradabilité *in vivo* et propriétés mécaniques adéquates.

I.1.a) Synthèse et caractérisation

Dans un premier temps, l'addition de collagène a été réalisée suivant deux méthodes d'incorporation déjà utilisées pour les molécules A et B (Chapitre III, §II) : (1) l'incorporation *in situ* et (2) l'imprégnation (Figure 80). Le mélange de polysaccharides, pullulane/dextrane en poudre a été solubilisé dans une solution de collagène, avant réticulation selon la méthode (1). Pour la méthode (2), la matrice lyophilisée a été hydratée dans une solution de collagène. L'incorporation du collagène et les propriétés physico-chimiques des matériaux synthétisés ont été analysées. Des études cellulaires 3D ont ensuite été menées pour étudier le comportement des fibroblastes au sein des différents matériaux ainsi obtenus.

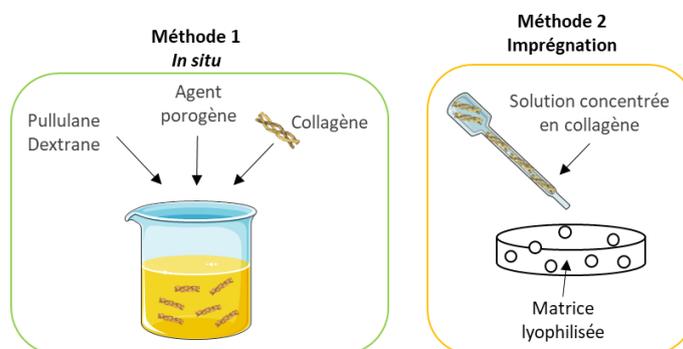


Figure 80 : Représentation schématique des méthodes d'incorporation par le collagène

Les formulations contrôles et les formulations fonctionnalisées au collagène ont été synthétisées. Ces formulations sont référencées : MPuD_(50:50), MPuD_(50:50)COLLx1% et MPuD_(50:50)COLLi1% respectivement pour la méthode *in situ* et par imprégnation. Il est à noter que l'utilisation d'une solution doublement plus concentrée en collagène a été testée avec la méthode (1), nommée MPuD_(50:50)COLLx2%. La solution obtenue étant trop visqueuse et non homogène, cette concentration n'a pas été retenue pour la suite des études.

I.1.a.i) Organisation du collagène

La présence et l'organisation du collagène au sein des matériaux lyophilisés et hydratés ont été étudiées. Tout d'abord les échantillons lyophilisés ont été observés en MEB (Figure 81), après

revêtement par une fine couche d'or. La surface (Figure 81a à c) et la structure interne (Figure 81d à f), obtenue après une découpe transversale, ont été analysées.

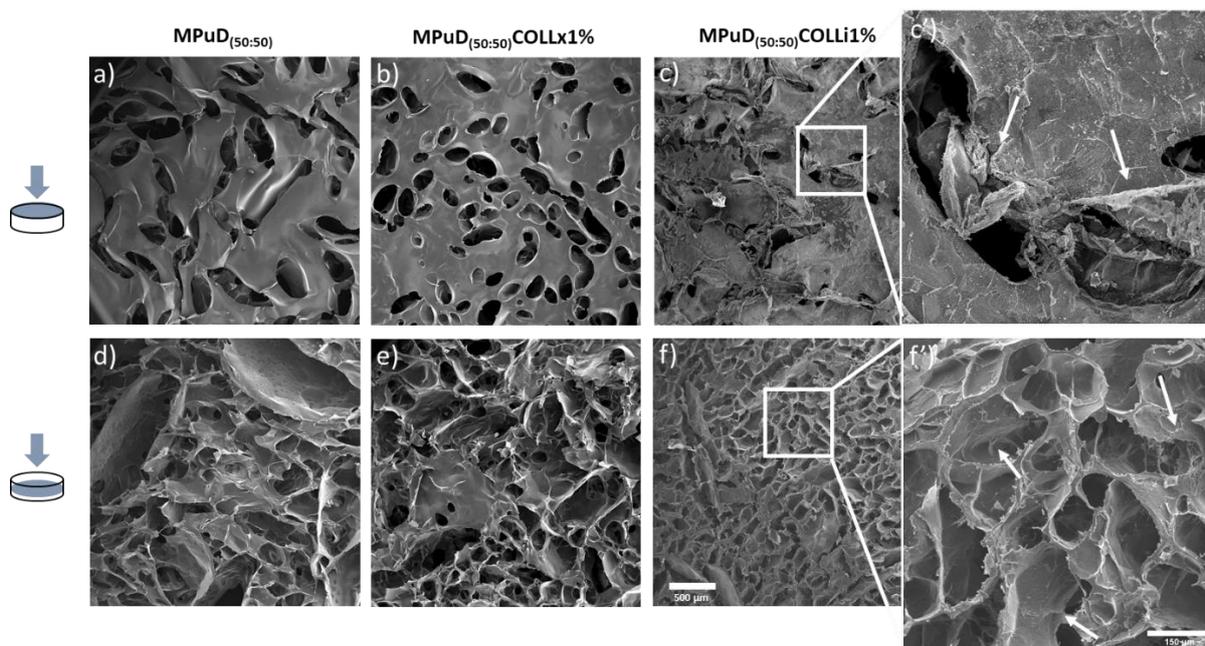


Figure 81 : Observation des surfaces (a à c) et des sections transversales (d à f) en microscopie électronique à balayage (Joel Carryscope, zoom 30x), échelle 500 µm applicable aux images (a à f). Agrandissements (c') et (f'), échelle 150 µm applicable aux deux images. Les flèches blanches indiquent la présence de collagène.

A l'état lyophilisé, toutes les matrices possèdent des pores en surface (Figure 81a à c) avec une structure interne ouverte et poreuse (Figure 81d à f). Les pores semblent interconnectés, résultat du processus de lyophilisation [317] (Figure 81 d à f). Comme observé précédemment (Chapitre III, §1.2.a), deux types de porosités sont présents : des petits pores ronds et des pores plus grands allongés, probablement formés par le dégagement de CO₂. Entre la matrice contrôle MPuD_(50:50) et la formulation collagène incorporé *in situ* MPuD_(50:50)COLLx1%, aucune différence de topographie n'est observable que ce soit en surface (Figure 81a et b) ou à l'intérieur de celles-ci (Figure 81d et e). Le collagène n'est pas identifiable. La formulation MPuD_(50:50)COLLi1% semble quant à elle avoir des pores plus petits par rapport aux deux autres formulations (Figure 81c et f) mais présente une distribution de pores similaire. Cela est probablement la conséquence de la lyophilisation dans du PBS 1X, utilisé pour neutraliser la solution de collagène imprégnée. La force ionique du PBS, plus élevée que l'eau pour les conditions *in situ*, entraîne un taux de gonflement plus faible des matrices qui est maintenu ensuite par la lyophilisation. Par ailleurs, des formes géométriques comparables à des sels sont visibles en MEB à la surface des matrices, il est probable que cela corresponde à des sels apportés par le PBS pendant l'étape de neutralisation (Figure 81c'). L'appréciation de présence ou d'absence de collagène est alors rendue plus difficile (Figure 81c et c'). En revanche, des fibres sont facilement

identifiables dans la structure interne de l'hydrogel (Figure 81f et f'), tapissant la paroi des pores. Ces fibres sont vraisemblablement du collagène qui s'est associé en fibrilles.

La présence de collagène a ensuite été évaluée dans les matériaux hydratés. Pour cela, des hydrogels ont été synthétisés avec du dextrane FITC afin d'évaluer la localisation du collagène dans les matrices. Le collagène a été marqué par un colorant spécifique, le rouge Sirius (RS). Ce marquage, couramment utilisé en histologie, a été observé en fluorescence par microscopie confocale, comme décrit par Vogel *et al* [302] (Figure 82).

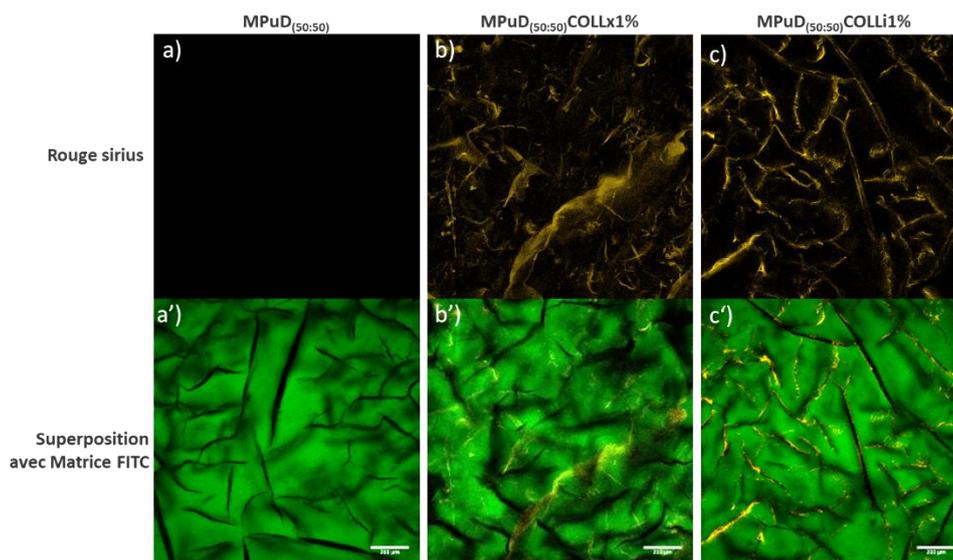


Figure 82 : Observation en microscopie confocale (LSM Zeiss 780, objectif 10x) après coloration au rouge Sirius (en jaune) (a à c) et superposée au signal fluorescent des matrices FITC (en vert) (a' à c'). Echelle 200 µm applicable à toutes les images.

La présence de collagène dans les formulations $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{COLLx1\%}$ et $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{COLLi1\%}$ (Figure 82b et c) a été confirmée par la coloration au rouge Sirius par rapport au matériau non fonctionnalisé $\text{MPuD}_{(50:50)}$ (Figure 82a). Le signal RS superposé au signal FITC de la matrice, montre une répartition différente des fibres en fonction de la méthode d'incorporation (Figure 82b' et c'). Le collagène semble être imbriqué dans le réseau de polymères lorsqu'il a été introduit *in situ* (Figure 82b') avec une répartition inhomogène. Les fibres de collagène semblent en effet être de taille et d'épaisseur variables et indépendantes de la porosité de la matrice. Par imprégnation (Figure 82c'), le collagène est réparti de façon plus homogène dans le matériau, à l'interface des pores. Cette observation confirme celle faite en MEB (Figure 81f et f'). Par ailleurs, la différence de la taille des pores, n'est plus significative à l'état hydraté entre les formulations $\text{MPuD}_{(50:50)}$ et $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{COLLi1\%}$ (Figure 82a' et c'). Cela confirmerait que les différences d'aspect des pores observés à l'état sec en MEB (Figure 81) seraient dues au gonflement dans le dernier solvant utilisé avant lyophilisation, mais ces différences ne sont pas conservées à l'état hydraté.

L'évaluation de l'organisation du collagène dans les matrices à l'état hydraté a été réalisée par microscopie biphotonique. Afin d'étudier l'état du collagène dans les matrices, la technique de génération de seconde harmonique (SHG) a été utilisée (Figure 83). La SHG est un phénomène optique non linéaire généré lorsqu'un laser, utilisant des excitations femtosecondes, est en contact avec un milieu présentant des symétries non centrales. Dans le cas du collagène, un signal SHG est généré lorsque le collagène est sous forme organisée (fibrillaire) et non dénaturé [303].

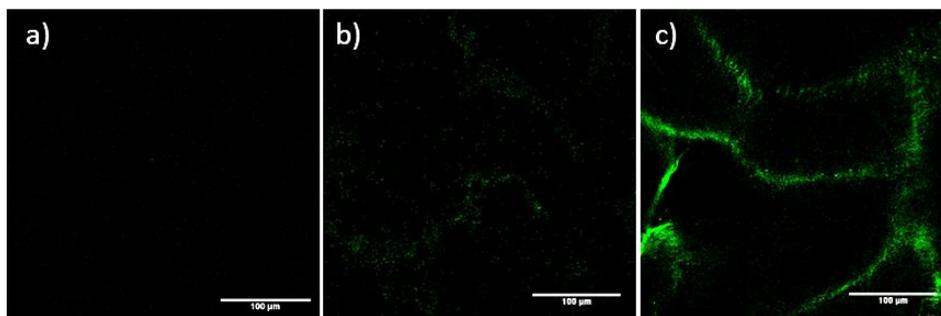


Figure 83 : Observation du signal SHG en microscopie biphotonique des matrices (Leica SP8, objectif 20x), (a) MPuD_(50:50) (b) MPuD_(50:50)COLLx1% et (c) MPuD_(50:50)COLLi1%. Echelles 100 µm.

Le signal SHG est absent dans les matrices MPuD_(50:50)COLLx1% (Figure 83b), similaire au contrôle sans collagène MPuD_(50:50) (Figure 83a), alors que dans les formulations MPuD_(50:50)COLLi1% des fibres sont identifiables (Figure 83c). Lorsqu'il est imprégné, le collagène semble alors s'auto-assembler en fibrilles de manière native sans dénaturation. L'organisation et la répartition du collagène au sein des hydrogels semble donc être conditionnée par la méthode d'incorporation utilisée.

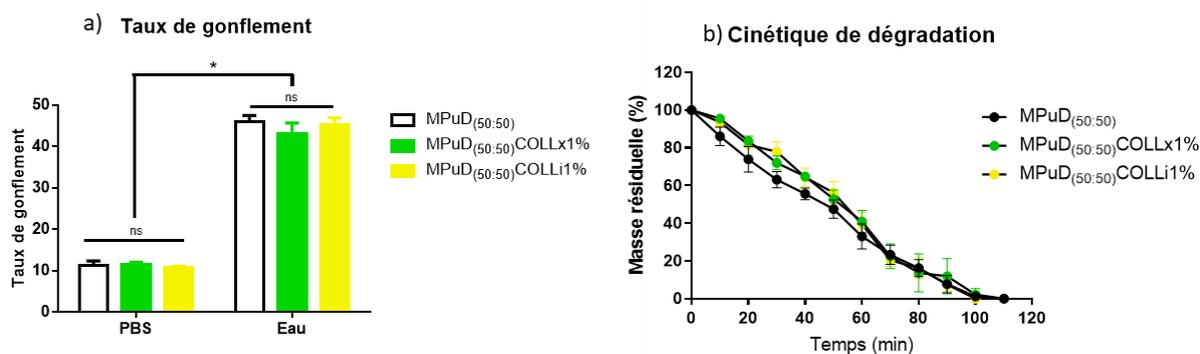
Dans la méthode *in situ*, la présence de collagène dans les conditions MPuD_(50:50)COLLx1% n'a pu être mise en évidence que par coloration au rouge Sirius (Figure 82). Des fibres ont été retrouvées dans l'ensemble de l'hydrogel avec cette méthode d'incorporation mais ne semblent pas avoir adopté une conformation native, comme en témoigne l'absence de signal SHG (Figure 83). Dans les conditions de synthèse, la protéine en solution est mélangée avec les précurseurs, incubée à TA pendant l'étape de réticulation. Le pH alcalin, les sels [369], [370] et les espèces ioniques [371], présents dans le mélange réactionnel, sont des facteurs favorables à la fibrillogénèse. Cependant, le collagène peut avoir été dénaturé par le pH très élevé de la solution nécessaire à la réticulation, (pH>13 mesuré sans collagène), bien supérieur au pI du collagène (7-9) [372]. De plus, la fibrillogénèse est concomitante à l'étape de réticulation des polysaccharides. La formation des fibres pourrait ainsi être perturbée par la formation du réseau de l'hydrogel.

Le collagène introduit par la méthode d'imprégnation dans la formulation MPuD_(50:50)COLLi1%, est quant à lui, observé en MEB, RS et SHG pour les conditions MPuD_(50:50)COLLi1% (Figure 81, Figure 82 et Figure 83). Il est retrouvé essentiellement à l'interface des pores (Figure 81 et Figure 82). La méthode d'incorporation consiste à hydrater la matrice par la solution de collagène soluble (pH acide) qui diffuse à l'intérieur des pores de l'hydrogel. Après l'imprégnation, les échantillons subissent une étape de rinçage avec du PBS 1X pour neutraliser le pH acide apporté par la solution de collagène (HCl 0,01M). Le PBS comporte une force ionique et un pH suffisants pour permettre l'assemblage des triples hélices (NaCl 155mM et pH7,4) [372]. De plus, le collagène est en suspension dans les pores, et non piégé dans le réseau de polymères. Il peut donc s'organiser sans contraintes stériques à la différence du collagène de la méthode *in situ*, emprisonné dans la matrice de polysaccharides. Cela pourrait expliquer qu'il soit visible en SHG et localisé à la surface des pores (Figure 83). Pendant la lyophilisation, les cristaux de glace croissent dans les hydrogels de pullulane/dextrane, au moment de la congélation. Ils concentrent ainsi les fibres de collagène et les repoussent contre les parois des polymères [373], [374]. La répartition du réseau de collagène sera ensuite conservée lors de la sublimation, comme en témoignent les images en MEB (Figure 81).

I.1.a.ii) Impact sur les propriétés physico-chimiques

La présence de collagène dans les matériaux fonctionnalisés ayant été confirmée, l'impact de cette addition et de la méthode d'incorporation sur le taux de réticulation a été étudié par évaluation du gonflement. Les éventuelles répercussions sur la cinétique de dégradation et les propriétés mécaniques ont été également étudiées.

Dans un premier temps, les matrices lyophilisées ont été placées dans deux solvants de forces ioniques différentes ($14300\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ et $<10\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ respectivement pour le PBS pour l'eau miliQ) jusqu'à atteindre l'équilibre. Les taux de gonflement sont ensuite mesurés. La dégradation enzymatique *in vitro* de ces matrices est ensuite étudiée à 37°C, dans un mélange d'enzymes spécifiques (Figure 84).



c) Paramètres de dégradation

	MPuD _(50:50)	MPuD _(50:50) COLLx1%	MPuD _(50:50) COLLi1%
T _{1/2}	47 ± 3 min	52 ± 4 min	52 ± 2 min
R ²	0,97	0,98	0,97

Figure 84 : Caractérisation des matériaux fonctionnalisés avec du collagène. (a) Capacité de gonflement des matériaux dans l'eau et le PBS et (b) cinétique de dégradation des hydrogels. (c) T_{1/2} et coefficient de corrélation (r²) déterminés après régression linéaire. Les différences significatives ou non sont indiquées respectivement par "*" ou "ns" (p<0,05 ou p>0,05 ; n=4).

Les taux de gonflement mesurés dans le PBS ne sont pas significativement différents entre les formulations (MPuD_(50:50)= 11,2±1,6 ; MPuD_(50:50)COLLx1%= 11,8±0,1 ; MPuD_(50:50)COLLi1%=11,0±0,4) (Figure 84a). Les valeurs sont également semblables dans l'eau et près de 4 fois plus élevées que dans le PBS. Comme décrit précédemment (Chapitre III, §1.1.b.ii), la rétention d'un plus grand volume d'eau par rapport au PBS est due à la différence de force ionique. Le taux de gonflement étant un indicateur du taux de réticulation [217], l'addition de collagène dans les formulations ne semble pas avoir affecté cette propriété. De même, les études de dégradation *in vitro* des matériaux ne montrent pas de différences significatives entre les différentes conditions (Figure 84b). En effet, que les matrices soient riches en collagène ou non, la masse résiduelle mesurée après 100 minutes d'incubation n'était pas significativement différente. Environ 50 minutes d'incubation sont nécessaires pour que la moitié de la masse des matériaux soit dégradée (Figure 84c). Les formulations fonctionnalisées ou non présentent les mêmes cinétiques de dégradation par des glucosidases, ce qui renforce l'hypothèse d'un taux de réticulation inchangé entre les conditions.

Ces caractérisations ont été poursuivies par l'impact de la présence de collagène sur les propriétés mécaniques des matrices (Figure 85). Les études de balayage en fréquence ont été réalisées dans le domaine de linéarité des matériaux. Les matrices lyophilisées ont été hydratées jusqu'à l'équilibre dans du sérum physiologique (NaCl 0,9%, 14 jours à TA) avant d'effectuer les mesures.

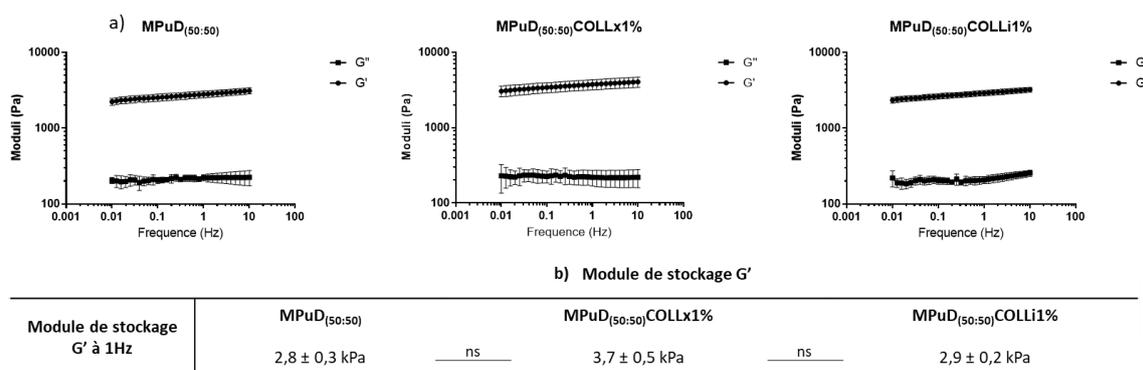


Figure 85 : Propriétés mécaniques des matrices fonctionnalisées avec du collagène. (a) Balayage en fréquence des matrices MPuD_(50:50) avec et sans collagène. (b) Tableau des valeurs de G' et du domaine de déformation linéaire à 1Hz. La non significativité statistique des valeurs est représentée par "ns" (p>0,05, n≥4)

Comme observé précédemment (Chapitre III, §1.2.b), ces tests rhéologiques ont permis de démontrer que tous les hydrogels synthétisés avec et sans collagène ont un comportement viscoélastique correspondant à un réseau percolant ($G' > G''$) (Figure 85a). Les valeurs des modules de stockage (G') ont été calculés suite à des sollicitations à 1Hz et 0,1% de déformation (Figure 85c). La formulation MPuD_(50:50)COLLx1% tend cependant à être plus rigide avec une valeur de G' légèrement plus élevée mais reste du même ordre de grandeur et non différent statistiquement. L'introduction de collagène ne semble pas avoir affecté de manière significative les propriétés mécaniques des hydrogels et confortent les résultats obtenus avec les études de gonflement et de dégradation (Figure 84). Pour conclure, le collagène retenu dans les hydrogels et les méthodes d'incorporation ne semblent pas impacter leurs propriétés physico-chimiques.

I.1.a.iii) Interactions cellules/matériaux

Pour évaluer l'effet de la fonctionnalisation par le collagène sur l'adhésion et l'infiltration cellulaire, les matériaux synthétisés avec du dextrane FITC ont étéensemencés en 3D avec des FHN. Après 4 jours de culture, le noyau et le cytosquelette des cellules fixées ont été marqués. Les matrices ont été observées en microscopie confocale. Des projections 3D des acquisitions ont permis d'analyser la morphologie cellulaire et leur répartition au sein des matériaux étudiées (Figure 86).

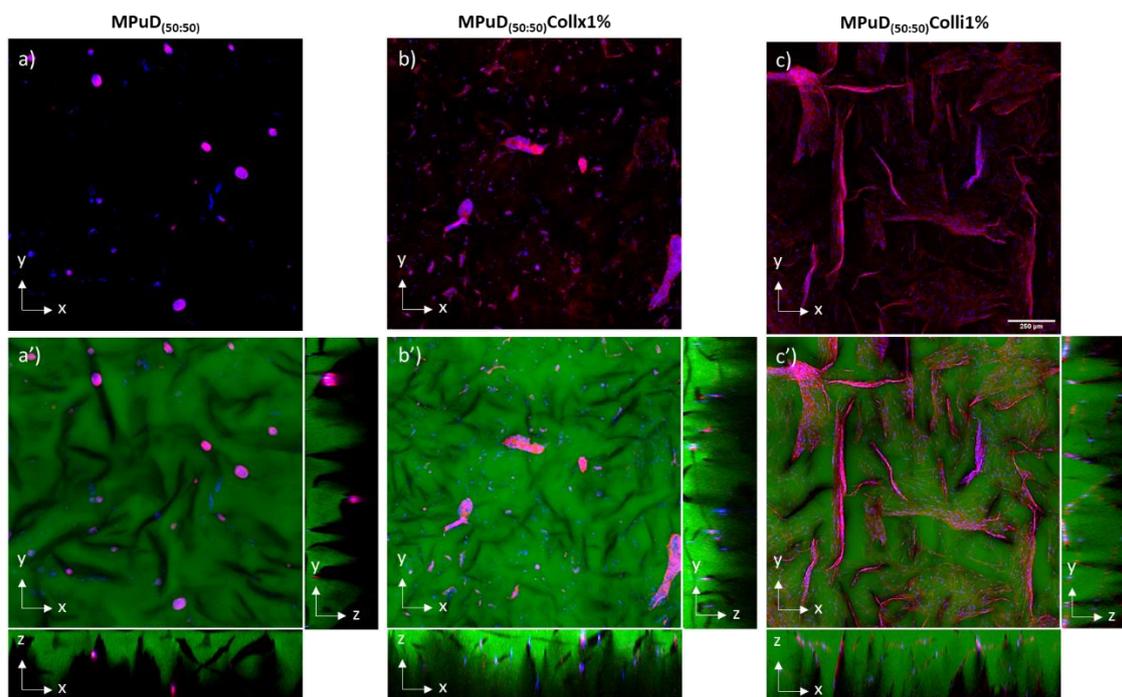


Figure 86 : Projection Z en moyenne d'intensité de 380 μ m d'épaisseur des matrices ensemencées avec des FHN. Les photos (a) à (c) représentent les cellules marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge), superposées au signal FITC de la matrice (vert). Les photos (a') à (c') représentent ces images superposées (LSM Zeiss 700). Les vues orthogonales des axes yz et zx sont représentés respectivement à droite et en bas de chacune des images. Echelle de 250 μ m applicable à toutes les images.

Après 4 jours de culture, les FHN présentent des morphologies et des répartitions différentes selon les formulations. Les cellulesensemencées dans les matrices MPuD_(50:50), ont une forme ronde, en agrégat, localisées dans les pores sans adhésion apparente à l'hydrogel (Figure 86a et a'). La colonisation cellulaire est plus importante dans les matrices fonctionnalisées au collagène (Figure 86b et c). Les formulations MPuD_(50:50)COLLx1% présentent des FHN regroupés en amas et plus étalés (Figure 86b) que le contrôle non fonctionnalisé. Ils semblent également répartis en profondeur et dans les pores de la matrice (Figure 86b'). En revanche, dans les matrices MPuD_(50:50)COLLi1%, les cellules tapissent entièrement les pores en profondeur et semblent être réparties à travers l'ensemble de la porosité de l'hydrogel. En prenant en compte l'étude de la répartition du collagène, les différences de colonisations cellulaires entre les matrices fonctionnalisées semblent reposer sur l'accessibilité au collagène par les cellules. En effet, les observations en microscopie ont montré que la protéine était imbriquée dans le réseau de polymère pour l'incorporation *in situ* (Figure 82). Elle n'était pas aisément visible en MEB (Figure 81) ce qui suggère une faible disponibilité pour les cellules au niveau des pores. Par ailleurs, dans les matrices MPuD_(50:50)COLLi1%, le collagène est réparti à l'interface des pores (Figure 81 et Figure 82), le rendant plus accessible aux cellules et permettant une meilleure colonisation du matériau.

Ces matrices ont par la suite été incubées dans du milieu de culture pendant 24h. L'extrait ainsi obtenu a ensuite été mis au contact d'un tapis cellulaire 2D comportant une zone sans cellules, standardisée. La proportion de FHN ayant migré dans cette zone après 24h d'incubation a été comptabilisée à partir d'acquisitions réalisées en microscopie (Figure 87).

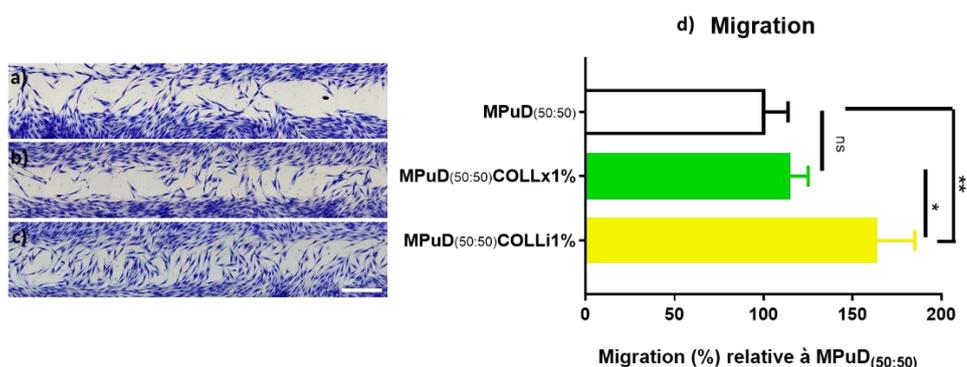


Figure 87 : Images (a) à (c) des tapis cellulaires en contact avec les matériaux (a) MPuD_(50:50), (b) MPuD_(50:50)COLLx1% et (c) MPuD_(50:50)COLLi1% (Zeiss Axiocam 208). Echelle 500µm applicable à toutes les images. (d) Quantification de la migration cellulaire avec significativité indiquée par "*" (p<0,01) et non significativité "ns" (p>0,05) (n≥5)

La migration des FHN est similaire entre les conditions non fonctionnalisées MPuD_(50:50) et contenant du collagène incorporé *in situ* MPuD_(50:50)COLLx1% (Figure 87a et b). En effet, le nombre de cellules comptabilisées dans l'aire de migration n'est pas significativement différent (Figure 87d). En

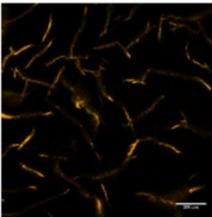
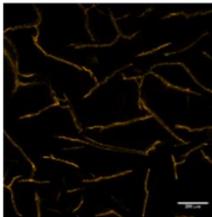
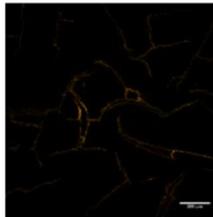
revanche, les matrices imprégnées de collagène, MPuD_(50:50)COLLi1% , présentent une zone mieux colonisée par les FHN. Cette observation est vérifiée par la quantification (Figure 87c et d). Une hypothèse envisagée est que du collagène serait présent dans le milieu de culture : le collagène non assemblé ou les fibrilles non intégrées au reste du réseau formé, diffuseraient dans le milieu pré-incubé. Il pourrait interagir directement avec les fibroblastes ou recouvrir la zone sans cellule et favoriserait leur migration [34], [375]. Le fait que les cellules migrent plus est une propriété favorable dans un contexte de cicatrisation.

En conclusion, l'addition de collagène dans les hydrogels a permis d'améliorer l'infiltration des cellules dans les matériaux sans pour autant en modifier les propriétés physico-chimiques. L'impact sur l'invasion cellulaire de l'ajout du collagène ajouté par méthode d'imprégnation a été plus important que par la méthode *in situ*. L'effet de la méthode d'incorporation se retrouve aussi bien sur les tests directs qu'indirect. La formulation MPuD_(50:50)COLLi1% a fait l'objet d'une étude de variation en concentration de collagène imprégné pour en évaluer les impacts au niveau cellulaire.

1.1.b) Modulation de la concentration en collagène

Les matrices précédemment testées étaient imprégnées par une solution en collagène référencée MPuD_(50:50)COLLi1%. Deux autres concentrations de collagène 2 fois et 10 fois plus faibles ont également été testées, respectivement référencées MPuD_(50:50)COLLi0,5% et MPuD_(50:50)COLLi0,1%. L'incorporation du collagène et sa répartition dans l'hydrogel ont été analysées après marquage au rouge Sirius (Tableau 27).

Tableau 27 : Dénominations et concentrations initiales en collagène des formulations imprégnées. L'intensité de la coloration au RS a été observée macroscopiquement puis en fluorescence par microscopie confocale (Zeiss LSM 780, objectif 10x). Echelle 200µm.

	MPuD _(50:50) COLLi 1%	MPuD _(50:50) COLLi 0,5%	MPuD _(50:50) COLLi 0,1%
Aspect macroscopique Coloration RS			
Observation microscopique en fluorescence			

Le colorant se lie aux groupements basiques des acides aminés [376] et est donc représentatif de la teneur en collagène. Macroscopiquement, l'intensité de la coloration au RS est liée à la concentration en collagène. Cette tendance se retrouve en microscopie (Tableau 27) et a été confirmée par la mesure semi-quantitative de la surface de collagène liée au signal fluorescent (Figure 88).

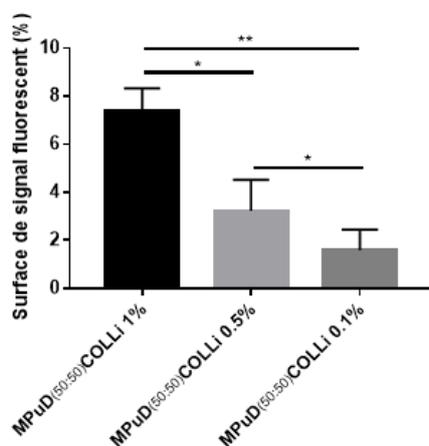


Figure 88 : Surface occupée par le signal fluorescent du collagène mesurée par ImageJ® à partir des acquisitions réalisées en microscopie confocale. Différences significatives indiquées par "*" et "**" ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, $n=3$).

La quantité de collagène retenue dans les matrices semble varier avec la concentration de la solution de collagène : la surface occupée par le signal décroît avec la concentration en collagène.

L'impact de la quantité de collagène sur le comportement des FHN a ensuite été étudié après 4 jours de culture (Figure 89).

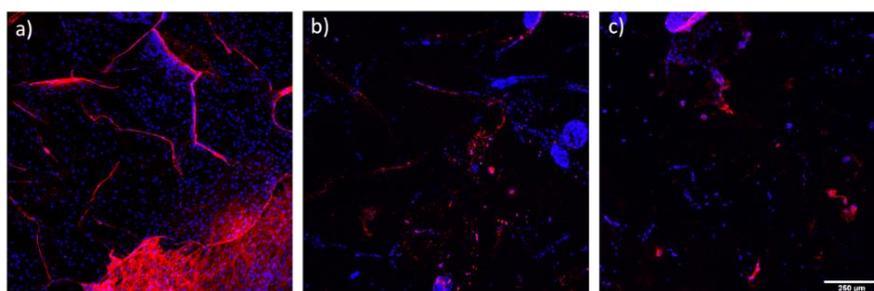


Figure 89 : Projection Z en intensité maximale de 370 µm d'épaisseur pour les matrices (a) MPuD_(50:50)COLLi 1% (b) MPuD_(50:50)COLLi 0,5% et (c) MPuD_(50:50)COLLi 0,01% ensemencées avec des FHN. Les cellules sont marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge). Echelle de 250 µm applicable à toutes les images.

Une relation directe entre la concentration en collagène et la quantité de cellules présentes sur le matériau est observée. Les formulations moins riches en collagène, MPuD_(50:50)COLLi 0,5% et MPuD_(50:50)COLLi 0,1% (Figure 89b et c), sont moins colonisées par les cellules que la formulation MPuD_(50:50)COLLi 1% (Figure 89a). Gobeaux *et al*, ont démontré que la concentration des solutions en

collagène impactait la conformation des fibrilles pendant la fibrillogénèse : plus la concentration de collagène est élevée, plus les fibres sont denses [377]. Cependant, les concentrations utilisées dans ces synthèses sont bien inférieures à celles décrites dans leur étude (<5mg/mL). Une concentration inférieure induit un réseau moins dense en collagène [368], ceci ayant des répercussions directes sur la capacité des cellules à adhérer et à migrer au sein des matériaux, avec un effet dose dépendant. Le collagène concentré à 1% en masse de polymères (MPuD_(50:50)COLLi1%) constitue la condition pour laquelle la colonisation cellulaire est la plus optimale et sera donc conservée pour les études suivantes. La concentration en collagène ne sera plus précisée dans les dénominations des formulations pour plus de simplicité.

I.1.c) Co-incorporation molécule A/collagène

La molécule A a démontré *in vitro* des effets sur l'amélioration de la migration des deux types cellulaires majoritaires de la peau : les fibroblastes et les kératinocytes. Dans le but d'améliorer l'activité cellulaire des hydrogels, elle a donc été utilisée en association avec le collagène. Pour ce faire, les méthodes d'incorporation *in situ* et d'imprégnation ont été utilisées pour combiner la molécule A et le collagène. Quatre combinaisons ont ainsi été obtenues, schématisées dans la Figure 90 conduisant à la synthèse de 4 formulations, répertoriées dans le Tableau 28.

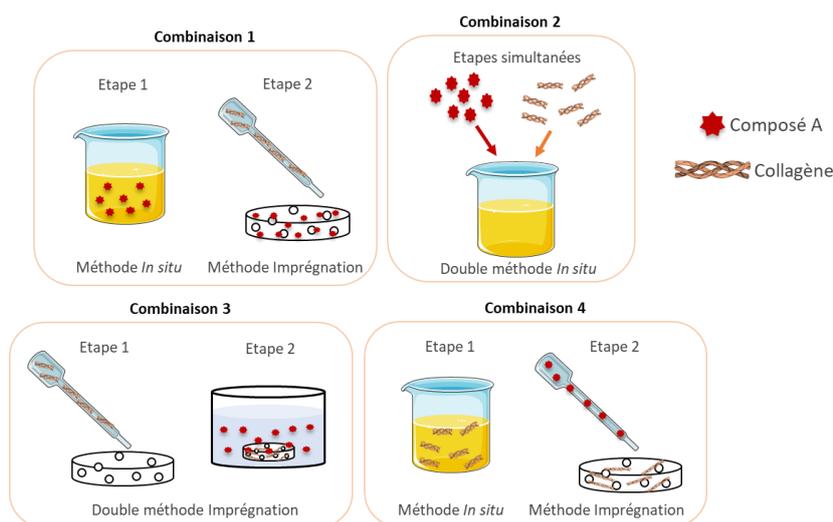


Figure 90 : Schémas récapitulatifs de l'association des méthodes d'incorporation molécule A/collagène

Tableau 28 : Dénominations des formulations issues de la combinaison des méthodes d'incorporation de la molécule A et du collagène

Combinaison	Dénomination
1	MPuD _(50:50) AxCOLLi
2	MPuD _(50:50) AxCOLLx
3	MPuD _(50:50) AiCOLLi
4	MPuD _(50:50) AiCOLLx

Pour les matrices MPuD_(50:50)AxCOLLi et MPuD_(50:50)AiCOLLi (Figure 90, combinaisons 1&3), le collagène a été imprégné dans les matériaux, et la molécule A a été introduite respectivement *in situ* et par imprégnation. Pour les formulation MPuD_(50:50)AxCOLLx et MPuD_(50:50)AiCOLLx (Figure 90, combinaisons 2&4), le collagène a été introduit *in situ* et la molécule A a été incorporée respectivement *in situ* et par imprégnation. Toutes ces formulations ont été positives à la coloration au RS (non montré) confirmant la présence de collagène dans toutes les formulations.

Les différentes combinaisons ont étéensemencées avec des FHN et mises en culture en 3D pendant 4 jours. Le noyau et le cytosquelette d'actine ont été marqués puis observés en fluorescence (Figure 91).

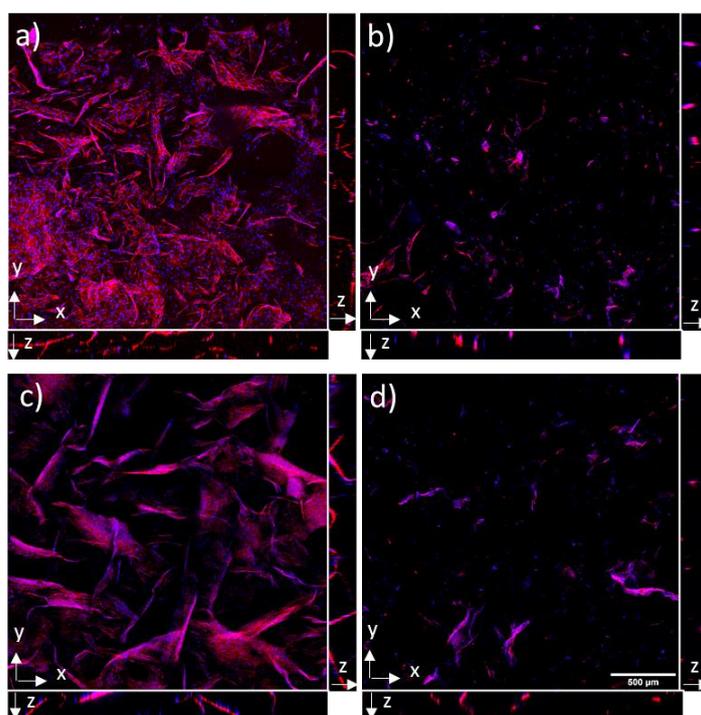


Figure 91 : Projection Z en intensité moyenne de 380 µm d'épaisseur des matrices (a) MPuD_(50:50)AxCOLLi (b) MPuD_(50:50)AxCOLLx (c) MPuD_(50:50)AiCOLLi et (d) MPuD_(50:50)AiCOLLx. Les FHN sont marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge). Les vues orthogonales des axes yz et zx sont représentées respectivement à droite et en bas de chacune des images. Echelle de 500 µm applicable à toutes les images.

Le nombre de FHN à la surface du matériau est lié à la méthode employée pour incorporer le collagène. Cette observation est en adéquation avec les résultats précédents (Figure 86). En effet, dans les combinaisons où le collagène a été imprégné, les cellules se répartissent dans les pores (Figure 91a et c), tandis que lorsqu'il est introduit *in situ*, les cellules adoptent une conformation étalée mais sont moins nombreuses et en amas isolés (Figure 91b et d). Des deux formulations dont le collagène a été incorporé *in situ*, il semble que la condition MPuD_(50:50)AiCOLLx (Figure 91d), présente une

colonisation cellulaire légèrement supérieure à son équivalent avec la molécule A ajouté *in situ* MPuD_(50:50)AxCOLLx (Figure 91b).

La colonisation cellulaire est favorisée dans les matrices où le collagène a été imprégné. De plus, l'invasion cellulaire semble être améliorée quand la molécule A est incorporée *in situ* (MPuD_(50:50)AxCOLLi, Figure 91a) plutôt qu'imprégnée (MPuD_(50:50)AiCOLLi, Figure 91c). Les études antérieures de fonctionnalisation par la molécule A (Chapitre III, §II.1.b) avaient montré des résultats similaires. En effet, lorsqu'elle était imprégnée dans la matrice, la molécule A était totalement libérée dans le surnageant après 2-3h. Il est à noter que dans les conditions de culture, le milieu est changé tous les deux jours. Le composé A diffuse vraisemblablement dans le premier milieu d'incubation et reste alors en contact avec les cellules pendant une courte durée. A l'inverse, quand il est incorporé *in situ*, le composé A est retenu dans le réseau de polymères. Les cellulesensemencées dans cette condition (incorporation *in situ*) avaient l'activité métabolique la plus importante à 4 jours (Chapitre III, §II.4.b). La combinaison d'incorporation molécule A/collagène imprégné serait donc moins efficace que la combinaison avec la molécule A incorporée *in situ*.

Afin d'analyser les effets sur un tapis cellulaire apportés par le collagène et la molécule A, des matrices MPuD_(50:50) ont été produites comme décrit précédemment (Figure 90). Ces matrices ont par la suite été incubées dans du milieu de culture pendant 24h. De la même manière que décrit en §I.1.a.iii), les extraits obtenus ont ensuite été mis au contact d'un tapis cellulaire comportant une zone sans cellules et la migration des FHN a été quantifiée après 24h d'incubation (Figure 92).

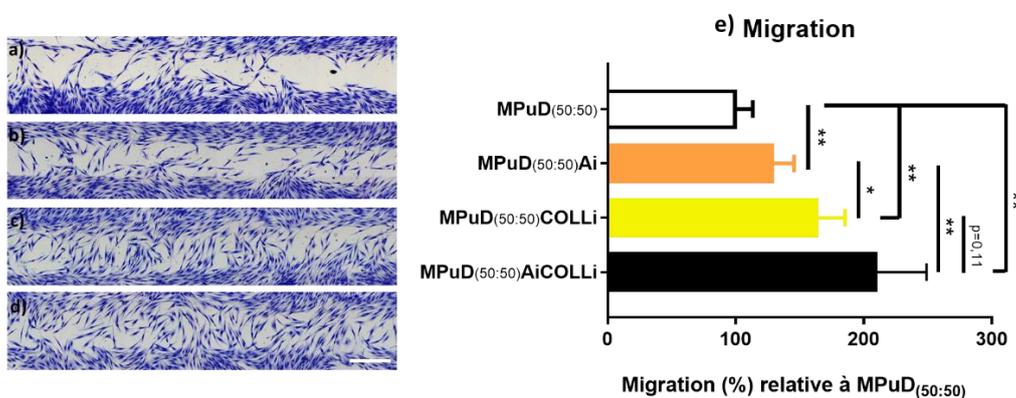


Figure 92 : : Images (a) à (d) : des tapis cellulaires en contact avec les extraits des matériaux (a) MPuD_(50:50), (b) MPuD_(50:50)Ai, (c) MPuD_(50:50)COLLi et (d) MPuD_(50:50)AiCOLLi (Zeiss Axiocam 208). Echelle 500µm applicable à toutes les images. (e) Quantification de la migration cellulaire avec significativité indiquée par "***" (p<0,01) et la valeur p "p=0,11" (n≥4)

La migration des FHN observée est différente entre chacune des conditions. Les milieux préconditionnés avec les formulations MPuD_(50:50)Ai présentent un nombre de cellules

significativement plus élevé dans l'aire de migration (Figure 92b) par rapport à la condition non fonctionnalisée MPuD_(50:50) (Figure 92a et e). Dans les études ultérieures, il a été démontré que la molécule A incorporée par imprégnation était totalement libérée dans le milieu en quelques heures (Chapitre III, §II.1.b). La molécule se retrouve alors dans le milieu de culture puis mise en contact avec le tapis cellulaire. Le composé A peut ainsi interagir avec les fibroblastes et améliorer leur migration. De la même façon, le collagène imprégné dans les formulations MPuD_(50:50)COLLi présentent une zone plus colonisée (Figure 92c). Cependant les cellules migrent plus qu'avec le composé A (Figure 92e). Cela peut être dû à la différence d'activité exercée par les composés. En effet, la molécule A aurait plutôt une activité métabolique sur les cellules cutanées tandis que le revêtement formé par le collagène servirait plutôt de support mécanique aux fibroblastes, comme évoqué plus haut (§I.1.a.iii). Enfin, on retrouve nettement plus de cellules dans les zones en contact avec les extraits de la formulation combinée MPuD_(50:50)AiCOLLi (Figure 92d et e) que dans les conditions traitées avec MPuD_(50:50)Ai. Bien que la différence ne soit pas statistiquement significative avec la condition MPuD_(50:50)COLLi, le nombre de fibroblastes ayant migré dans la zone d'intérêt semble plus élevé pour la formulation combinée. Cela pourrait être dû à un effet synergique, résultat de l'association collagène/molécule A. Des travaux supplémentaires seraient nécessaires afin d'étudier cet effet potentialisateur.

En conclusion, le collagène a été incorporé avec succès dans les matrices de pullulane/dextrane, que ce soit *in situ* dans la solution de polysaccharides ou par « imprégnation » du matériau lyophilisé (Figure 82). L'addition de cette protéine de la MEC ne semble pas avoir d'impact sur le taux de gonflement, la dégradation et les propriétés mécaniques des matériaux par rapport à la condition sans collagène (Figure 84 et Figure 85). Cette fonctionnalisation a permis d'améliorer la colonisation des hydrogels par les fibroblastes primaires. La méthode d'incorporation la plus efficace est l'imprégnation de collagène avec une solution concentrée à 1% (Figure 86 et Figure 89). La combinaison avec la molécule A incorporée *in situ* semble améliorer la colonisation et la migration cellulaire (Figure 91 et Figure 92).

I.2) Fonctionnalisation par des charges positives

Dans les études précédentes, le dextrane modifié avait été utilisé dans le but d'améliorer la rétention du composé B (Chapitre III; §II.2.c). Cette fonctionnalisation avait engendré des modifications structurelles de l'hydrogel de pullulane/dextrane, visibles après observation en MEB (Figure 69). Dans la littérature, l'addition de charges dans les biomatériaux est également une stratégie employée pour permettre l'adhésion cellulaire [378]–[380]. Dans cette partie, le rôle de ces

charges sur les propriétés physico-chimiques et le comportement de cellules ensemencées dans la formulation $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}$ ont été étudiés et comparés à un contrôle non fonctionnalisé $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$.

1.2.a) Impact sur les propriétés physico-chimiques

Après observations macroscopiques et microscopiques de la surface des matrices fonctionnalisées lyophilisées, (Chapitre III, §II.2.c), celles-ci semblaient plus denses et moins poreuses que le contrôle (Figure 69). Pour approfondir ces études, la microstructure interne des formulations synthétisées avec et sans dextrane modifié a été analysée en MEB après découpe transversale (Figure 93 a et b). Ensuite, la surface des hydrogels à l'état hydraté a été analysée en MEB environnementale (Figure 93c et d).

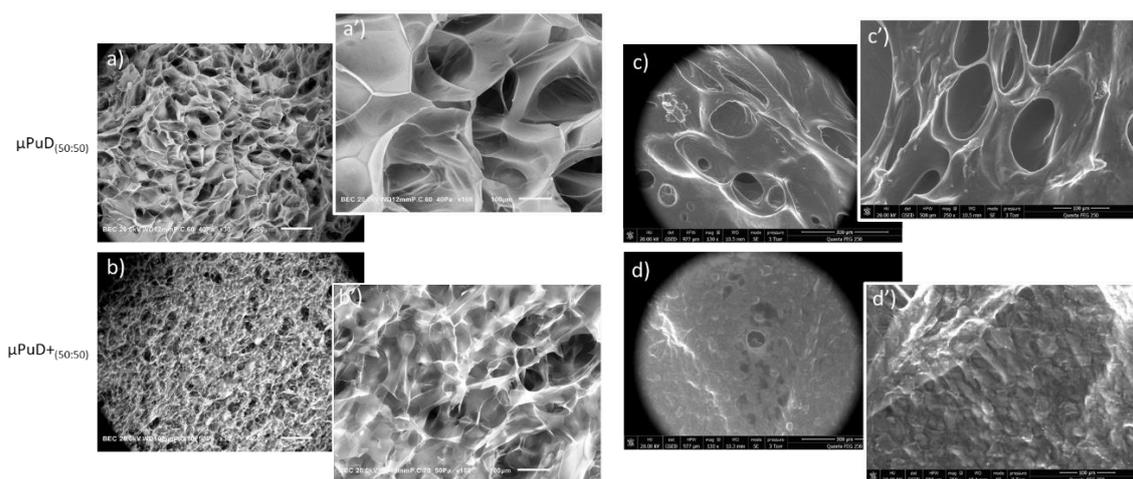


Figure 93 : Etude en microscopie électronique à balayage des matériaux fonctionnalisés et non fonctionnalisés par des charges positives. (a) et (b) Observations en MEB (Joel Carryscope) des coupes transversales des matrices lyophilisées, synthétisées avec et sans dextrane modifié, échelle 500µm. Images (c) et (d) Observations en surface en MEB (Philips XI30), après hydratation dans l'eau, échelle 300µm. Images (a') à (d') correspondent aux agrandissements, échelle 100µm.

Les matrices $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ lyophilisées, révèlent une structure interne ouverte et poreuse (Figure 93a) similaire aux autres formulations à base de pullulane/dextrane. En revanche, les matrices $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}$ semblent présenter des tailles inférieures de pores (Figure 93b). Ces observations confirment les conclusions faites d'après leur aspect macroscopique (Figure 68). Ces différences de porosité sont également observées à l'état hydraté (Figure 93c et d). La lyophilisation est couramment utilisée pour la création de pores dans les hydrogels [232]. Le procédé de formation des pores a été décrit dans les hydrogels à base de pullulane/dextrane préparés au Laboratoire U1148 [316] mais pourrait se dérouler différemment dans cet hydrogel. Par ailleurs, des aspérités avaient été remarquées à la surface des matériaux lyophilisés (Figure 69). Elles sont ici retrouvées dans la structure interne des matériaux lyophilisés (Figure 93b) et persistent après hydratation (Figure 93d).

Afin de mieux comprendre la formation de ces aspérités, la structure microscopique des matrices à l'état hydraté a été analysée sur des matrices fluorescentes synthétisées avec du dextrane FITC (Figure 94). Les matrices ont été observées hydratées dans du PBS avant lyophilisation (Figure 94a et c) et après lyophilisation (Figure 94b et d).

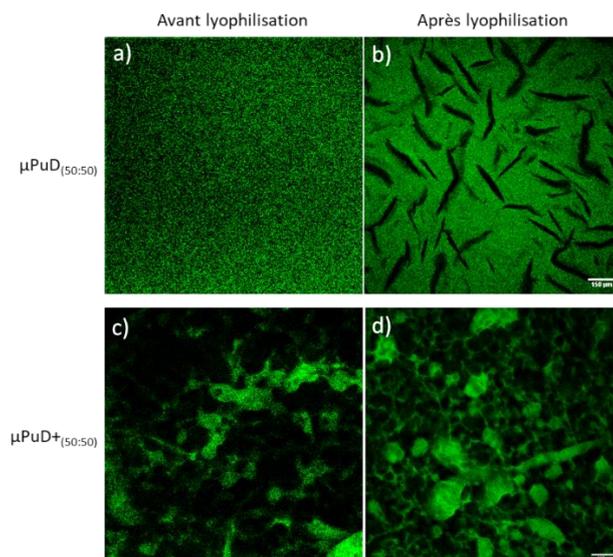


Figure 94 : Observation de plans des matrices préparées avec du dextrane FITC et hydratées avec du PBS 1X, avant (a et c) et après (b et d) lyophilisation. Les sections sont acquises à partir de 50 µm de profondeur. Echelles 150µm applicables à toutes les images.

Les matrices non fonctionnalisées, $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$, ne présentent pas de pores avant lyophilisation (Figure 94a). Après lyophilisation, elles présentent une porosité, déjà observée dans les autres formulations à base de pullulane/dextrane (Figure 94b). Toutefois, les matrices $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}$ n'ont pas le même aspect. En effet, l'hydrogel non lyophilisé présente déjà une microstructure en son sein (Figure 94c). Cette caractéristique est retrouvée après lyophilisation (Figure 94d) avec une structure générale qui semble différente. Les zones sans signal fluorescent pouvant être une phase riche en pullulane sans FITC. Icoz *et al* ont étudié la miscibilité entre des dextrans modifiés [381]. Ils ont démontré que la présence de sels ($\geq 2\text{M}$) en quantité suffisante favorisait les interactions intramoléculaires plutôt qu'intermoléculaires, ce qui diminuerait la miscibilité entre les polymères.

Pour évaluer l'effet de la fonctionnalisation par des charges sur les propriétés physico-chimiques des matériaux, le taux de gonflement, la vitesse de dégradation *in vitro* (Figure 95) ainsi que les propriétés mécaniques ont été étudiées (Figure 96).

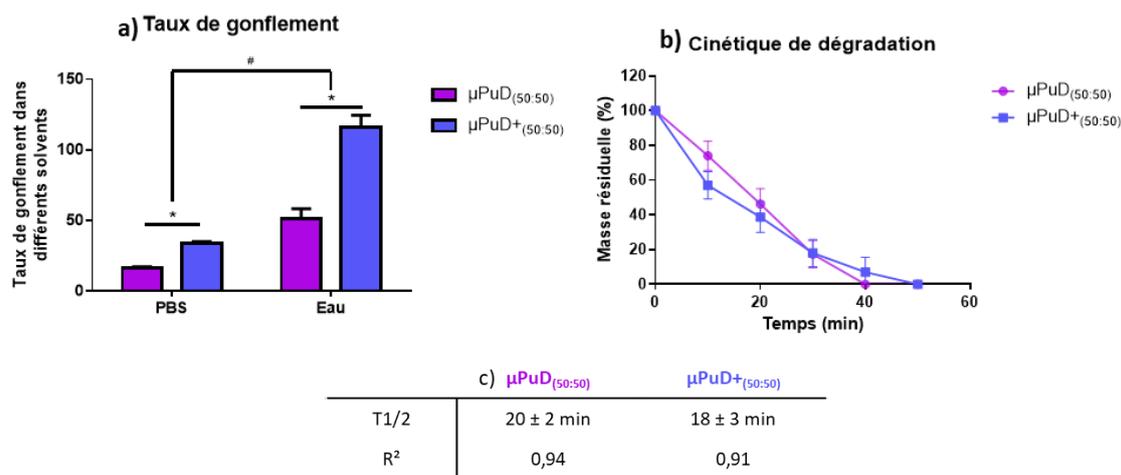


Figure 95 : Caractérisation des matériaux fonctionnalisés avec dextrane modifié (a) Capacités d'absorption dans l'eau et le PBS et (b) cinétique de dégradation avec (c) leur t1/2 calculé après régression non linéaire. Les différences significatives ou non sont indiquées respectivement par "*" et "#" ($p < 0,05$) et "ns" ($p > 0,05$), ($n=4$).

Comme observé dans les études précédentes, (Chapitre III, §II.2.c) les matrices comportant des charges positives, $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}$, absorbent deux fois plus la solution de PBS que le contrôle non fonctionnalisé, $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ (Figure 95a). Cette différence de gonflement est exacerbée dans l'eau. En effet, les matrices $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ retiennent 3 fois plus d'eau par rapport au PBS alors que les $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}$ gonflent plus de 3,7 fois.

L'état de dissociation des charges portées par le dextrane modifié pourrait être conditionné par le pH et des ions présents dans le solvant. En effet, entre les pH 5,5 (eau) et pH 7,4 (PBS), le degré de ionisation des groupements greffés pourrait différer. Ainsi, dans l'eau, le dextrane modifié serait très majoritairement ionisé. Les charges se repousseraient et étendraient le réseau de polymères. Ceci pourrait alors expliquer que les matrices ont des capacités d'absorption plus élevées, et plus particulièrement dans l'eau. Par ailleurs, la présence d'un nombre élevé de charges positives doit favoriser les interactions avec les molécules d'eau.

Comme évoqué précédemment, ces différences pourraient également être le résultat d'un taux de réticulation plus faible. La réticulation du dextrane modifié par le STMP se déroule très certainement comme avec les autres polysaccharides [311]. Bien que la quantité de STMP introduite dans les différentes formulations soit identique, il peut ne pas réagir de la même manière quand l'hydrogel est fonctionnalisé. En effet, la fonctionnalisation pourrait interférer avec le greffage du STMP que ce soit par la présence des charges ou par diminution des fonctions hydroxyles disponibles après substitution des groupements d'intérêt sur le dextrane. La quantification de phosphore par la méthode de dosage colorimétrique, précédemment utilisée, ne permet pas ici d'évaluer la teneur en

phosphore finale dans l'hydrogel. D'autres méthodes telles que l'analyse élémentaire du phosphore ou de l'ICP (Spectrométrie à plasma à couplage inductif) seraient à envisager pour vérifier le taux de réticulation.

Les cinétiques de dégradation obtenues après digestion enzymatique révèlent des profils similaires entre les différentes conditions : les matrices se dégradent en moins de 50 min (Figure 95b). La présence de ces charges positives n'empêche donc pas la dégradation par les glucosidases (Figure 95c). Les vitesses de dégradation sont similaires entre les deux formulations étudiées (Figure 95c). Dans l'hypothèse où les hydrogels fonctionnalisés seraient moins réticulés, il était attendu qu'ils se dégradent plus vite (Chapitre III, §1.2.c). Le taux de réticulation pourrait donc être similaire entre les formulations fonctionnalisées, ou bien la différence de porosité pourrait contrebalancer la dégradation. En effet, les matrices fonctionnalisées sont moins poreuses que leur contrôle (Figure 93) ce qui restreindrait la surface spécifique accessible aux enzymes, diminuant alors la vitesse de dégradation. Ces hypothèses restent à confirmer.

L'impact sur les propriétés mécaniques a ensuite été évalué par des tests de cisaillement en balayage en fréquence réalisés sur les matrices hydratées dans du NaCl 0,9% (Figure 96).

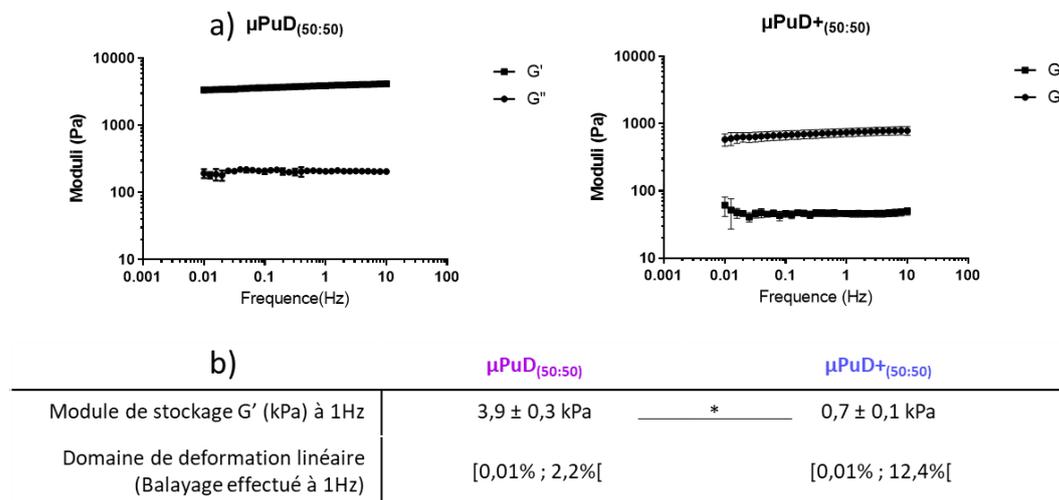


Figure 96 : Propriétés mécaniques des matrices fonctionnalisées avec du DEAE (a) Balayage en fréquence des matrices $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ avec et sans dextrane modifié. (b) Tableau des valeurs de G' et du domaine de déformation linéaire à 1Hz. La significativité statistique des valeurs est représentée par "*" ($p < 0,05$, $n=4$)

Les hydrogels synthétisés avec le dextrane modifié ont un comportement viscoélastique avec un réseau percolant ($G' > G''$), comme observé pour les formulations non fonctionnalisées (Figure 96a). Les matrices $\mu\text{PuD}_{+(50:50)}$ ont un module de stockage (G') significativement inférieur à celui des matrices $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ (Figure 96b). Par ailleurs, la plage du domaine de déformation linéaire est

beaucoup plus étendue pour les hydrogels $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ (12%) (Figure 96b). Abbadessa *et al* ont étudié les propriétés rhéologiques d'hydrogels dont le module de stockage G' était modifié lorsqu'il y avait une séparation de phase, et dépendait du ratio en polymère. Dans la formulation avec la séparation de phase la plus prononcée et la plus concentrée en polymères, le G' était diminué avec une augmentation de la température de gélification [382]. Il est probable que la microstructure observée dans les matrices de pullulane/dextrane modifié (Figure 94c et d) ait un impact sur la capacité du système à stocker l'énergie et par conséquent sur les propriétés rhéologiques. Elle rendrait l'hydrogel plus apte à dissiper l'énergie, le rendant moins rigide avec une valeur de G' plus faible.

1.2.b) Interactions cellules/matériaux

Pour évaluer l'effet de la fonctionnalisation par les charges positives sur les cellules, les matériaux ont étéensemencés par des fibroblastes humains. Des observations en microscopie confocale ont été effectuées après 4 jours de culture par marquage du noyau avec du DAPI et du cytosquelette avec la phalloïdine (Figure 97).

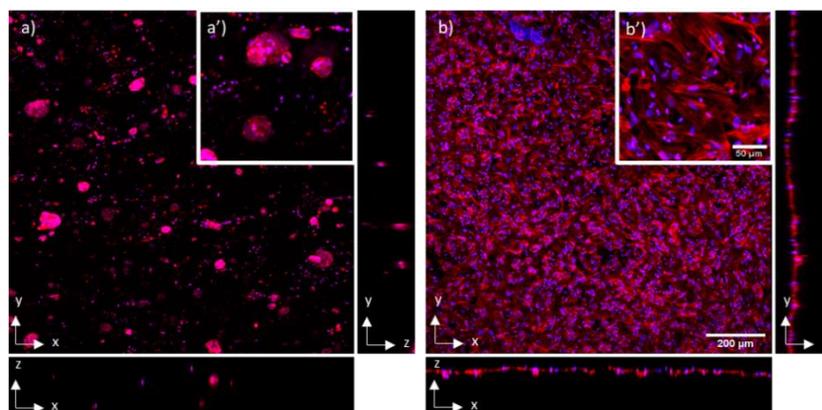


Figure 97 : Projection Z en intensité maximale de 200 μm d'épaisseur dans les matrices (a) $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ et (b) $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ ensemencées avec des FHN. Représentations des vues orthogonales à droite et en bas de chacune des projections. Les cellules sont marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge). Echelle de 200 μm applicable aux images (a) et (b) et projections orthogonales et échelle de 50 μm applicable aux agrandissements (a') et (b').

Les cellules dans le matériau $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ sont rondes et en amas isolés, et elles sont réparties dans la profondeur de l'hydrogel (Figure 97a). Les formulations $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ présentent une colonisation cellulaire bien plus dense mais répartie à la surface (Figure 97b). Les cellules sont étalées (Figure 97b') mais ne semblent pas pénétrer à l'intérieur du matériau. Il se peut que les cellules rencontrent des difficultés à pénétrer en profondeur dans le matériau à cause de la plus petite taille des pores et que par la suite, la monocouche de FHN limite l'infiltration cellulaire. Ces résultats sont en accord avec d'autres études où la fonctionnalisation de surfaces par différentes méthodes avaient permis d'améliorer l'adhésion de certains types cellulaires (CHO, HUVEC) [365], [383]. Plusieurs mécanismes peuvent être impliqués dans l'adhésion cellulaire sur une surface chargée. Parmi les hypothèses

possibles, les membranes cellulaires, chargées globalement négativement, pourraient interagir par liaisons électrostatiques avec des surfaces cationiques [319], [384]. Une autre hypothèse serait que l'adhésion des cellules serait médiée par l'adsorption de protéines sur le matériau fonctionnalisé. Ces protéines peuvent provenir du milieu de culture ou être sécrétées par les cellules elles-mêmes [384], [385]. Les cellules adhèrent alors sur les protéines qui se sont adsorbées à la surface des matériaux [386].

I.3) Conclusion sur la fonctionnalisation des hydrogels

Le collagène a pu être incorporé dans les hydrogels avec les deux méthodes d'incorporation étudiées, sans modification des propriétés physico-chimiques des matériaux. La répartition du collagène à l'interface des pores obtenue par la méthode d'imprégnation permet la meilleure adhésion et colonisation cellulaire. La concentration des solutions de collagène utilisées ont un effet dose-dépendant sur l'adhésion cellulaire avec une valeur optimale à 1% m/m de PS. La co-incorporation du collagène imprégné avec la molécule A introduite *in situ* semble améliorer la répartition cellulaire.

La fonctionnalisation du réseau par des charges positives a permis d'obtenir un aspect et des propriétés du matériau très différents de ceux observés sur les matrices précédentes. En effet, ces hydrogels semblent plus denses avec une taille de pores inférieure et comporte une micro architecture particulière. Les matériaux, sont également moins rigides avec un taux de gonflement plus élevé. Ils restent néanmoins dégradables par les enzymes spécifiques avec la même cinétique que les formulations non fonctionnalisées. La présence de ces charges a permis l'adhésion et la colonisation de fibroblastes à la surface des hydrogels de pullulane/dextrane, et ce, sans avoir recours à la fonctionnalisation par des protéines de la MEC.

La répartition cellulaire étant différente entre les fonctionnalisations par addition de protéine de la MEC et de charges, les deux stratégies ont été plus amplement étudiées pour discriminer la méthode la plus efficace. A cet effet, les formulations MPuD_(50:50)COLLi, MPuD_(50:50)AxCOLLi et μ PuD_(50:50) ont été sélectionnées pour poursuivre les études sur l'invasion cellulaire et explorer la réaction à leur implantation à travers deux modèles animaux.

II] Preuve de concept

Les matériaux fonctionnalisés par du collagène (MPuD_(50:50)COLLi et MPuD_(50:50)AxCOLLi) et par des charges positives (μ PuD_(50:50)) induisent de meilleures réponses cellulaires par rapport aux matériaux non fonctionnalisés. La preuve de concept de leur utilisation en tant que substituts cutanés a été évaluée à travers plusieurs essais précliniques et comparée à un produit commercial, Intégra®. La matrice de régénération dermique Intégra® (Ref. 62021) a été choisie car il s'agit du traitement de référence des brûlures. C'est une matrice poreuse, formée d'un réseau de fibres réticulées de collagène de type I et de chondroïtine-6-sulfate [387], [388]. Ses composants sont d'origine animale et respectivement extraits de tendon bovin et de cartilage de requin [388]. Ce dispositif médical est indiqué dans la prise en charge des plaies avec une perte partielle ou totale du derme post-excision [387]. Ce substitut cutané acellulaire constitue ainsi un bon référentiel pour évaluer les performances des biomatériaux qui ont été développés. Afin d'étudier la biocompatibilité des formulations, des études *in vitro* et *in vivo* ont été réalisées.

II.1) Interactions cellules/matériaux

L'interaction entre les matériaux et les cellules a été évaluée, comme précédemment (Chapitre III, §II.4.b), après contact indirect à court terme (24h) et contact direct à moyen terme (8 jours). Le contact indirect permet d'évaluer la toxicité de produits éventuellement libérés par les échantillons sur un tapis cellulaire de FHN (Figure 98). Le contact direct, quant à lui, permet d'observer la répartition et la colonisation des cellules ensemencées sur les hydrogels. La morphologie adoptée par les FHN a été étudiée comme précédemment, de même que la synthèse de protéines de la MEC (Figure 99 et Figure 100). Les matériaux ont également été ensemencés avec des kératinocytes (KHN), cellules majoritaires de l'épiderme, afin d'évaluer la possibilité de la reformation d'une barrière cutanée (Figure 101).

II.1.a) Contact indirect

Les études de cytotoxicité ont été réalisées par contact indirect du milieu de culture pré-incubé avec les matériaux pendant 24h puis avec des tapis cellulaires (Figure 98). Elles ont été comparées au contrôle non incubé « Ctrl positif » et au contrôle incubé 10 minutes avec du triton 0,1% « Ctrl négatif ». Après 24h d'incubation, les tapis cellulaires ont été marqués à l'aide d'un kit de viabilité (live/dead assay[®]) et le nombre de cellules vivantes et mortes a été décompté (Figure 98a). Les surnageants ont également été prélevés pour évaluer la quantité de LDH libérée dans le milieu (Figure 98b).

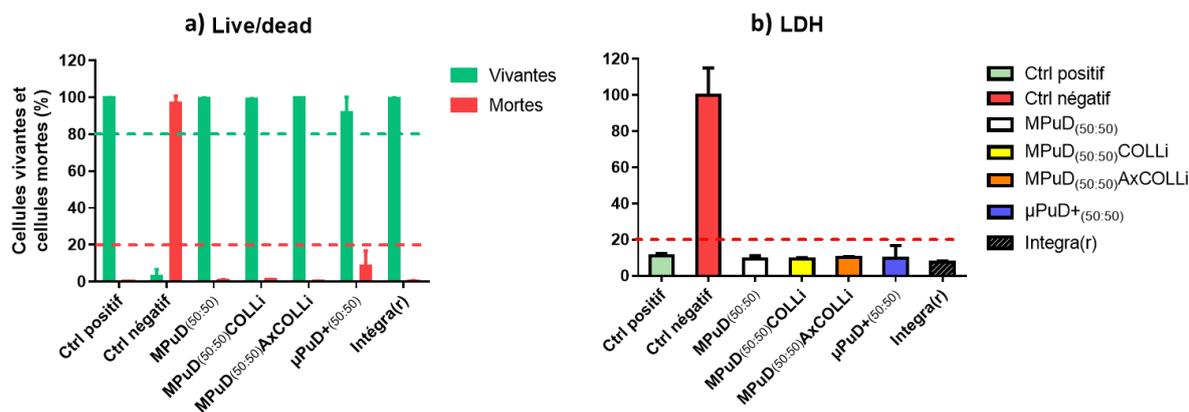


Figure 98 : Etude de cytotoxicité par contact indirect. La figure (a) représente le taux de survie cellulaire par dénombrement des cellules vivantes (vert) et mortes (rouge) et la figure (b) le taux de lactate déshydrogénase libérée dans le milieu (n≥3). Les lignes pointillées représentent les limites minimale de viabilité (vert) et maximale de mortalité (rouge) qui déterminent la cytotoxicité des matériaux.

Après 24H d'incubation, plus de 99% de cellules étaient vivantes pour le contrôle positif et moins de 5% l'étaient pour le contrôle négatif. Les milieux préconditionnés avec les matériaux ont démontré la même proportion de survie cellulaire que le contrôle positif (supérieure à 90%). Ces résultats sont corrélés par la quantité de lactate déshydrogénase (LDH) mesurée dans les milieux après 24H au contact des cellules. Cette enzyme est un marqueur d'intégrité des membranes cellulaires. Moins de 4% de LDH a été retrouvée dans les surnageants du « ctrl positif » et des formulations testées.

Le collagène utilisé dans la synthèse est d'origine animale. Il est de grade clinique (GMP) et stérile. La modification chimique du dextrane pourrait être toxique pour les cellules, c'est pourquoi il était important d'étudier les effets des hydrogels après contact avec les cellules. Ces études de cytotoxicité par contact indirect témoignent de l'absence de produits toxiques libérés par les formulations contrôle et de référence. Par ailleurs, si les éléments qui ont servi à la fonctionnalisation des matériaux sont libérés dans le milieu (collagène et le dextrane modifié) ceux-ci ne provoquent pas de mort cellulaire (% de cellules vivantes >20%). De plus, le dextrane modifié qui n'aurait pas réticulé dans l'hydrogel au cours de la synthèse aura certainement été éliminé lors des étapes de rinçages.

II.1.b) Contact direct

Les matériaux ont étéensemencés avec des fibroblastes primaires (FHN) et mis en culture jusqu'à 8 jours. La répartition et la morphologie des cellules dans les matériaux ainsi que la présence de composants de la MEC ont été analysés. Des anticorps spécifiques ont permis d'observer la présence de collagène de type III, de fibronectine et d'acide hyaluronique. Ces paramètres ont été étudiés à 4 jours (Figure 99) et 8 jours (Figure 100).

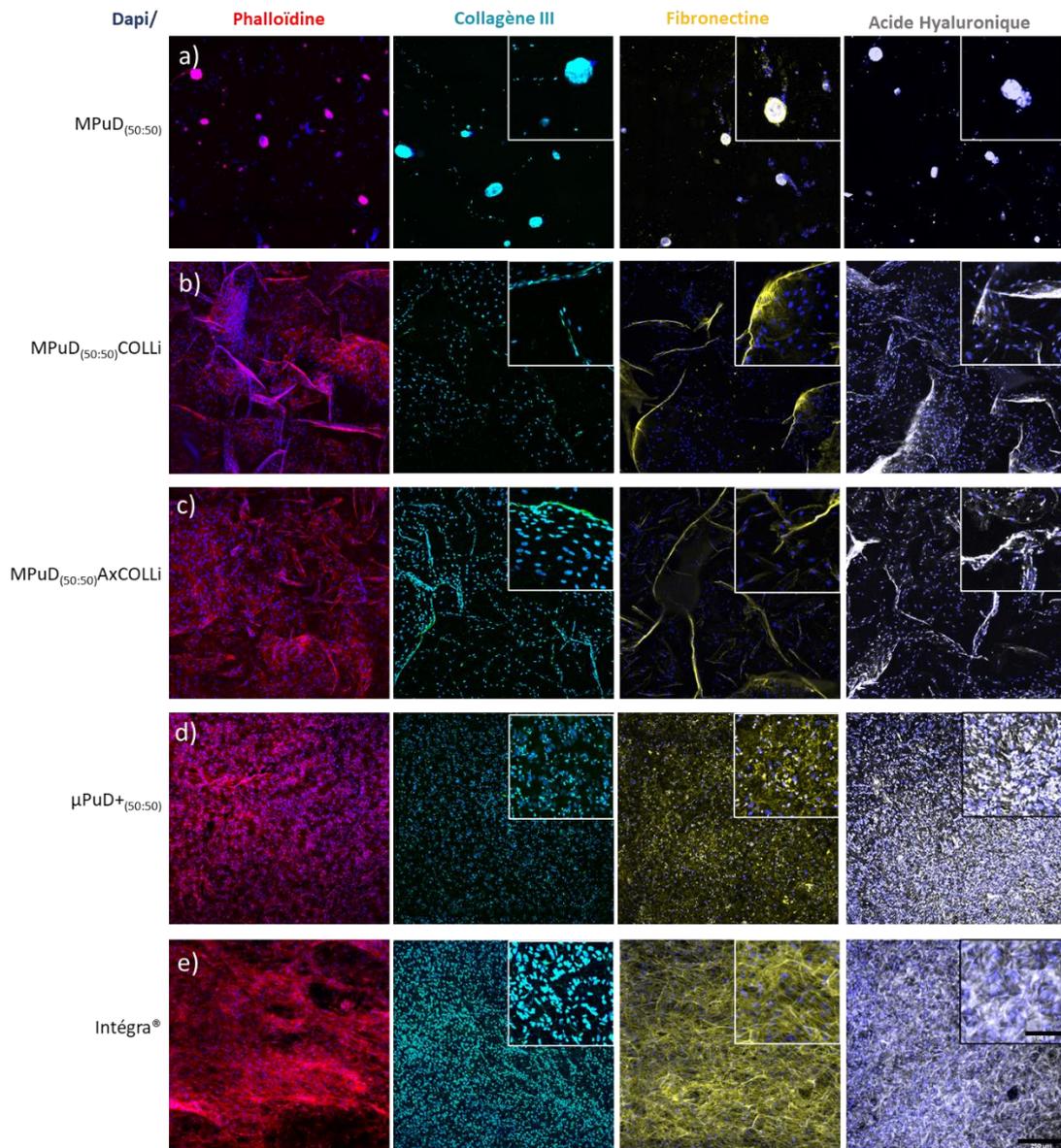


Figure 99 : Culture de fibroblastes ensemencés dans les matériaux. Acquisitions projetées en Z, en intensité maximale réalisées en microscopie confocale (Zeiss, LSM 750) et traitées par le logiciel ImageJ®. Observations après 4 jours des FHN par marquage du noyau (DAPI, Bleu) associé de gauche à droite à la morphologie des cellules par marquage de l'actine (phalloïdine, rouge) et à la synthèse de composants de la MEC : collagène III (vert), de la fibronectine (jaune) et de l'acide hyaluronique (blanc) avec échelle de 250 µm applicable aux images. Agrandissements des marquages spécifiques (haut à droite), échelle de 100µm applicable à tous les encarts.

Après 4 jours de culture, les FHN se répartissent différemment au sein des formulations, comme observé dans les études précédentes (Figure 99, colonne de gauche). En effet, les cellules dans les formulations non fonctionnalisées, MuD_(50:50) (Figure 99a) adoptent une conformation ronde en agrégat. Les formulations MPuD_(50:50)COLLi et MPuD_(50:50)AxCOLLi (Figure 99b et c) montrent des cellules étalées qui tapissent les pores, vraisemblablement grâce à l'adsorption du collagène de type I. Par ailleurs, l'infiltration des cellules au sein des matériaux est directement liée à leur porosité. En effet, les formulations à base de MPuD, fonctionnalisées ou non, présentent des pores de grande taille

et interconnectés dans toute la matrice (Figure 93). Au contraire, les matrices $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}$ quant à elles sont plus denses et moins poreuses (Figure 93). Les cellules y sont d'ailleurs réparties à la surface avec une morphologie étalée. L'adhésion cellulaire serait directe ou indirecte (par l'intermédiaire de protéines) sur le matériau grâce à la présence de charges positives [384]. Les cellules se répartissent de la même manière sur le matériau Intégra® (Figure 99c et d) que sur $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}$. Les fibroblastes sont capables d'adhérer et de migrer grâce au collagène de type I et à la chondroïtine sulfate qui composent la matrice Intégra® [389]. Bien que Intégra® soit décrit comme étant une matrice poreuse [390], dont la taille n'est pas précisée dans la documentation, les cellules restent préférentiellement en surface. La porosité doit avoir un ordre de grandeur similaire ou inférieur à celui des matrices chargées.

La capacité des fibroblastes à sécréter des composants matriciels après 4 jours de culture a pu être évaluée (Figure 99). Dans les conditions non fonctionnalisées $\text{MPuD}_{(50:50)}$, du signal lié à la présence des composés a été observé. Cependant, quels que soient les éléments, ils sont très peu présents, localisés autour des noyaux des agrégats et répartis de façon similaire à l'actine (Figure 99a). Cette répartition suggère une présence intracellulaire et sans présence de sécrétion structurée. Les formulations fonctionnalisées et la référence présentent toutes une sécrétion de matrice (Figure 99b à e). De même que précédemment, le signal semble être localisé près des cellules et est maintenu même en profondeur du matériau pour les matrices fonctionnalisées avec du collagène (Figure 99b et c). Le marquage de la MEC est présent à la surface des matrices chargées positivement et d'Intégra® (Figure 99d et e). Les molécules matricielles sont qualitativement présentes en plus grande quantité dans les hydrogels fonctionnalisés et Intégra® (Figure 99b à e) que dans les matériaux non fonctionnalisés (Figure 99a). La capacité des fibroblastes à synthétiser ces protéines et glycosaminoglycanes est dépendante de leur adhésion au substrat.

Dans les formulations $\text{MPuD}_{(50:50)\text{COLLi}}$, $\text{MPuD}_{(50:50)\text{AxCOLLi}}$, $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}$ et Intégra®, de la MEC a pu être sécrétée et conservée sur les matériaux. Diverses interactions ont pu jouer un rôle. Dans les matrices riches en collagène de type I, des affinités avec la fibronectine et l'acide hyaluronique ont pu permettre de maintenir les protéines - sécrétées par les cellules ou issues du SVF - les rendant accessibles à un remodelage matriciel par les FHN [37], [391]. Quant aux matrices $\mu\text{PuD}^{+}_{(50:50)}$ les charges positives présentes dans le réseau [392] permettent des interactions, notamment électrostatiques, pouvant entraîner la rétention de la MEC excrétée [364], [393], [394].

Les différentes conditions ont également été analysées après 8 jours d'ensemencement (Figure 100).

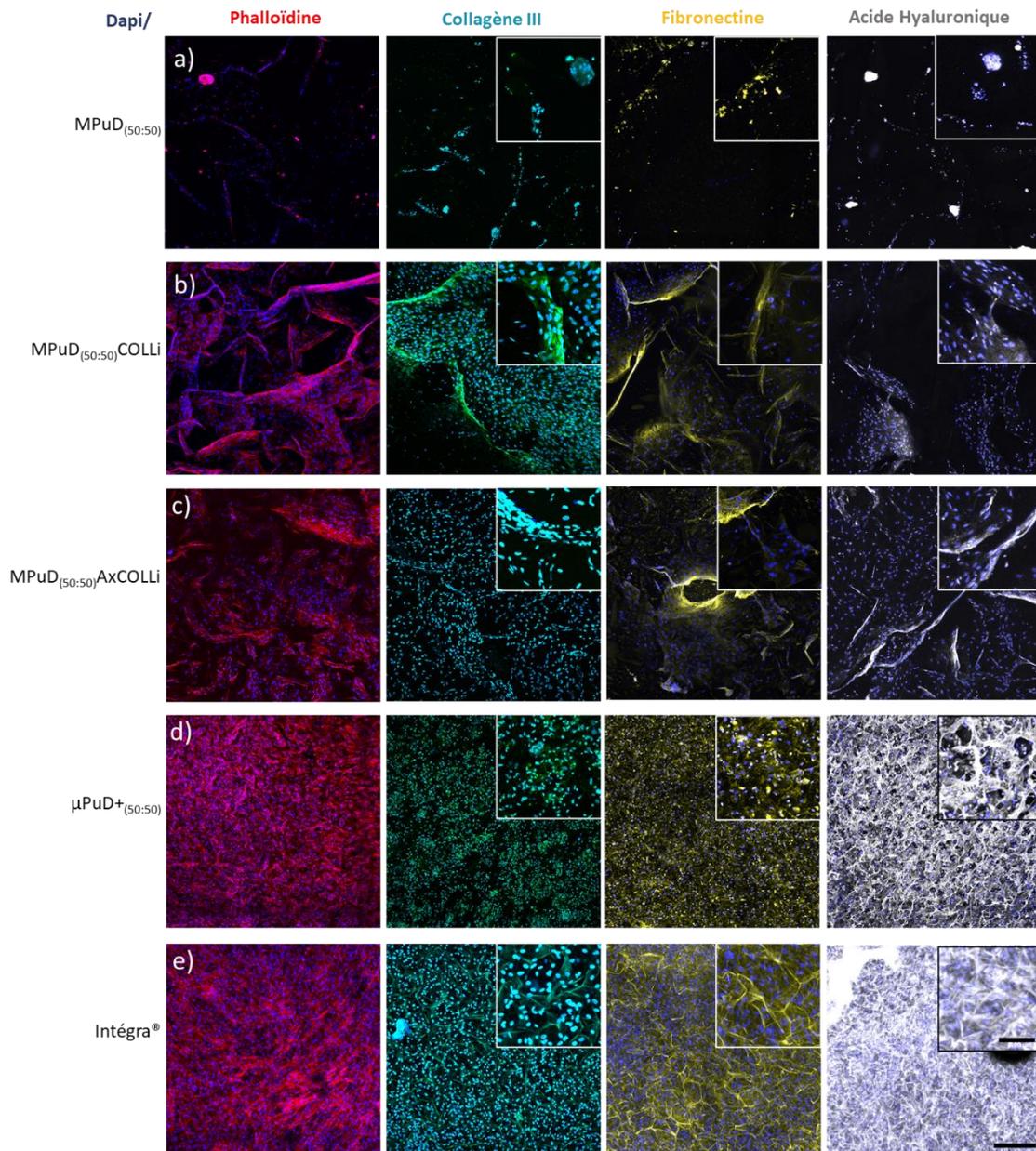


Figure 100 : Culture de fibroblastes ensemencés dans les matériaux pendant 8 jours. Acquisitions projetées en Z, en intensité maximale réalisées en microscopie confocale (Zeiss, LSM 750) et traitées par le logiciel ImageJ®. Observation après 8 jours des FHN par marquage du noyau (DAPI, Bleu) associé de gauche à droite à la morphologie des cellules par marquage de l'actine (phalloïdine, rouge et à la synthèse de composant de la MEC : collagène III (vert), de la fibronectine (jaune) et de l'acide hyaluronique (blanc), échelle 250 μm applicable aux images. Agrandissements des marquages spécifiques (haut à droite), échelle de 100 μm applicable à tous les encarts.

Les mêmes tendances de colonisation des matériaux par les FHN sont retrouvées après 8 jours de culture (Figure 100). Il n'y a pas de diminution apparente du nombre de cellules par rapport aux acquisitions réalisées à 4 jours, à l'exception des matrices non fonctionnalisées MPuD_(50:50) (Figure 100a). Ces matériaux ne possèdent pas de constituants capables de supporter l'adhésion des cellules

et la diminution du nombre peut être liée à des phénomènes d'anoïkis par défaut d'adhésion. Les trois composants de la MEC recherchés sont également présents à 8 jours sur les matériaux fonctionnalisés (Figure 100c à d).

La sécrétion de MEC semble similaire entre les matériaux MPuD_(50:50) enrichis en collagène, avec et sans molécule A, respectivement MPuD_(50:50)AxCOLLi et MPuD_(50:50)COLLi (Figure 99b et c et Figure 100b et c). Les matrices chargées présentent quant à elles une adhésion protéique dans les hydrogels plus importante tout en restant inférieure à la référence commerciale (Figure 99c et d et Figure 100c et d). La quantité d'éléments constitutifs de la MEC semble augmenter après 8 jours de culture par rapport à 4 jours, à l'exception de la condition non fonctionnalisée MPuD_(50:50) (Figure 99 et Figure 100).

La présence de ces molécules dans les matériaux d'intérêt atteste d'une activité cellulaire compatible avec la formation et le remodelage d'une nouvelle MEC ce qui est nécessaire dans le cadre d'utilisation en tant que substitut cutané. En effet, le collagène de type III, la fibronectine et l'acide hyaluronique sont des molécules structurales constitutives de la MEC dermique saine mais également de la matrice provisoire mise en place pendant la cicatrisation [34]. La fibronectine et le collagène de type III apparaissent dès les premières phases de cicatrisation [30] et l'acide hyaluronique pendant la phase de réparation [34]. Ces éléments sont d'autant plus importants qu'ils sont impliqués dans la régulation autocrine du métabolisme des fibroblastes dans les différentes étapes de la cicatrisation [395].

Par la suite, les matériaux ont étéensemencés par des KHN et mis en culture jusqu'à 8 jours. La répartition et la morphologie des cellules dans les matériaux ont été analysées en microscopie confocale à 4 et 8 jours (Figure 101).

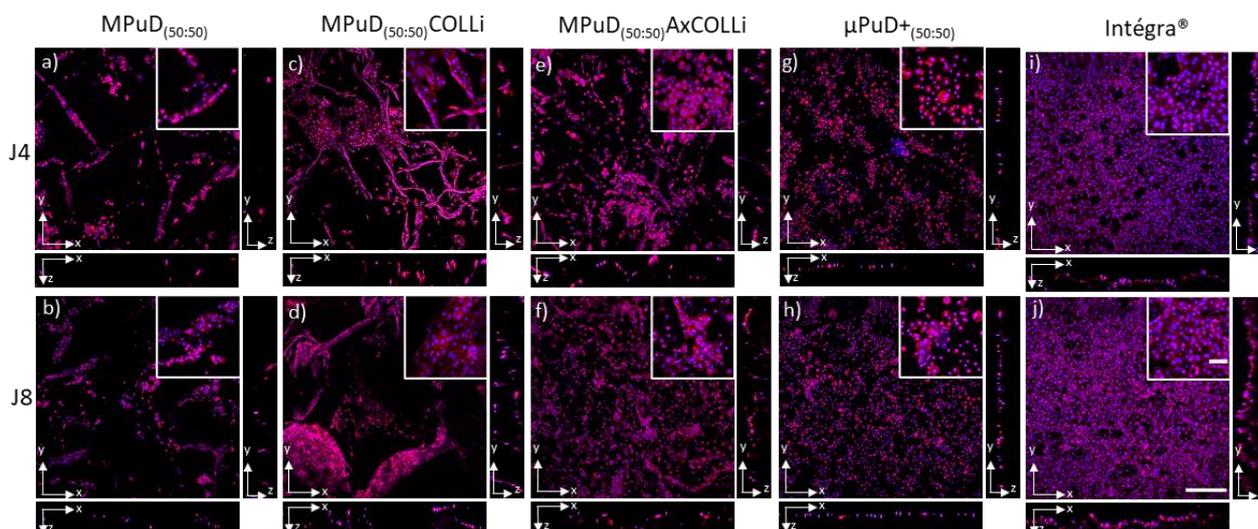


Figure 101 : Projection Z en intensité maximale d'épaisseur de 200 μm des différentes conditions ensemencées avec des KHN. Représentations des vues orthogonales à droite (y ; z) et en bas (x ; z) de chacune des projections. Les cellules sont marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge) après 4 jours (ligne du haut) et 8 jours (ligne du bas) de culture. Echelle de 250 μm applicable à toutes les images et leur projection orthogonale. Encarts zoomés des cellules en haut à droite de chaque image avec une échelle de 50 μm applicable à tous.

Après 4 et 8 jours de culture, les kératinocytes sont présents pour toutes les conditions. Les cellules adoptent une conformation ronde dont on distingue le noyau (Figure 101). La morphologie des KHN dans les matrices est proche de sa conformation dans l'épiderme : cubique à prismatique. Les cellules sont réparties dans la profondeur de la formulation contrôle $\text{MPuD}_{(50:50)}$ (Figure 101a et b), probablement logées à l'intérieur des pores (vues orthogonales Figure 101a à b). Les KHN se répartissent de la même manière dans les matrices enrichies en collagène, $\text{MPuD}_{(50:50)\text{COLLi}}$ et $\text{MPuD}_{(50:50)\text{AxCOLLi}}$ (Figure 101c à f). Les cellules semblent toutefois plus nombreuses, ce qui pourrait être dû à une interaction avec le collagène présent à l'interface des pores. Bien que les kératinocytes de l'épiderme interagissent avec du collagène de type IV de la lame basale [7], [8], il a déjà été montré *in vitro* que les KHN étaient capables d'adhérer sur du collagène de type I [397], [398]. Cette adhésion au collagène de type I interviendrait pendant l'étape de réépithélialisation après une lésion cutanée permettant la migration des kératinocytes [30]. La répartition des cellules dans la formulation $\text{MPuD}_{(50:50)\text{AxCOLLi}}$ (Figure 101e et f) paraît plus diffuse que pour la formulation $\text{MPuD}_{(50:50)\text{COLLi}}$ (Figure 101c et d), ce qui pourrait être en lien avec la présence du composé A.

Les hydrogels formulés avec du dextrane modifié (Figure 101g et h) et Intégra® (Figure 101i et j) présentent des cellules à la surface des matériaux (vues orthogonales Figure 101g à j). Cette différence de répartition en surface et en profondeur est similaire à celle observée précédemment avec les FHN. Encore une fois, la taille des pores ou l'inhibition de contact ne permettraient pas aux KHN de pénétrer en profondeur. Par ailleurs, il se peut que ce type cellulaire interagisse moins avec les charges

présentes dans les formulations $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$. Cependant, dans le cas des kératinocytes, leur pénétration dans le matériau n'est pas nécessaire, car dans l'épiderme les kératinocytes se répartissent en couches qui reposent sur le derme par l'intermédiaire de la lame basale. La formulation $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ présente moins de cellules que la référence Intégra®. Les constituants d'Intégra® favorisent l'adhésion cellulaire, notamment grâce au collagène qui agit de la même manière que dans les matériaux fonctionnalisés $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{COLLi}$ et $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{AxCOLLi}$.

Aucune différence significative entre les deux temps n'est visible, la colonisation cellulaire des hydrogels 4 jours après l'ensemencement apparaît semblable à 8 jours. A 4 jours, les cellules ont colonisé les matériaux et leur quantité ne semble pas diminuer avec le temps. Il serait intéressant d'approfondir ces études avec une analyse de la prolifération cellulaire accompagnée de l'état de différenciation des KHN à ces deux temps pour déterminer si les formulations ont des impacts différents.

En conclusion, les matériaux sélectionnés ont été comparés à une matrice non fonctionnalisée et à un produit commercial. Ces études ont démontré qu'ils étaient capables d'être colonisés par les deux types cellulaires majoritaire de la peau, en surface ou en profondeur et supportent la sécrétion de composants matriciels en fonction de leur porosité et leurs fonctionnalisations. Les matrices chargées positivement induisent un comportement cellulaire similaire à Intégra®. La caractérisation de ces hydrogels s'est poursuivie par des études de biocompatibilité après implantation chez l'animal.

II.2) Interactions hôte/matériau

La biocompatibilité des dispositifs médicaux destinés à être implantés doit être évaluée avant d'envisager une application chez l'homme. Elle repose sur les événements biologiques se produisant aux interfaces entre les biomatériaux et les tissus environnementaux. Cette réponse peut varier considérablement et conduire à l'intégration ou au rejet des matériaux testés. Bien qu'*in vitro* les réponses cellulaires observées soient encourageantes, il est difficile de les corréler à une réponse *in vivo* car le système est plus complexe et implique plus de variables. Il est nécessaire de déterminer la réponse d'un organisme vivant à l'implantation des biomatériaux développés pour s'assurer de leur sécurité et de leur efficacité [399]. Dans un premier temps, les différentes formulations ont ainsi été implantées en sous-cutané chez des souris pour évaluer leur dégradation et leur intégration. Dans un second temps, les formulations ont été implantées chez la souris dans des plaies d'excision de profondeur totale de la peau pour observer leur devenir dans un contexte de cicatrisation.

II.2.a) Implantation sous-cutanée

Les différents hydrogels ont été implantés en sous-cutané pour évaluer l'intégration et la dégradation des matériaux *in vivo*. Les zones d'intérêt ont été explantées après 8 semaines, fixées, congelées, coupées et montées sur lames. Les coupes ont ensuite été colorées par du bleu alcian pour visualiser les glucides et contre-colorées au rouge nucléaire pour marquer les noyaux. L'intégration de l'hydrogel, l'état de sa dégradation et la densité cellulaire l'ayant colonisée ont été évalués à partir des explants de peau (Figure 102 et Figure 103).

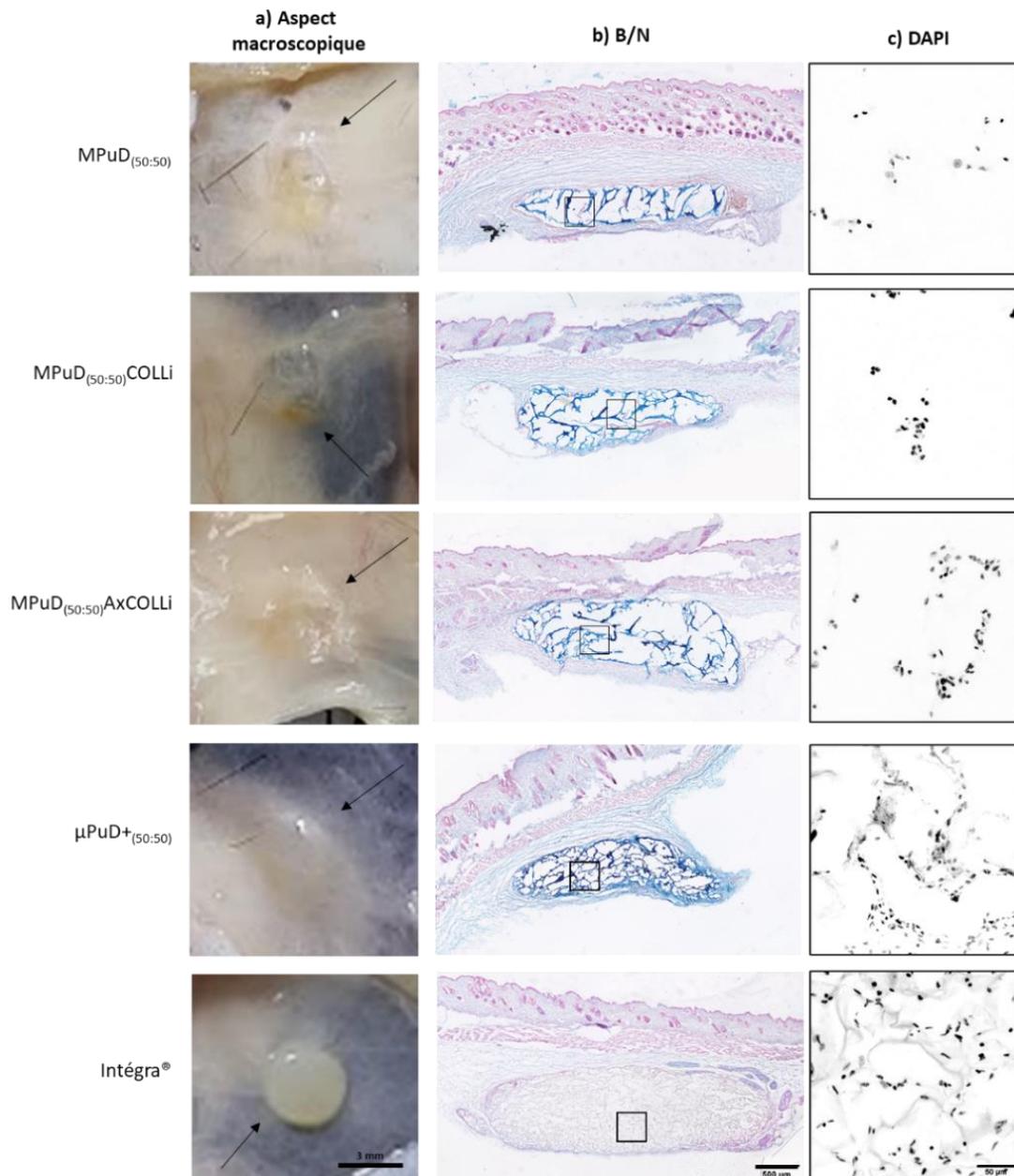


Figure 102 : Implantation sous-cutanée des différents matériaux. Colonne (a) aspect macroscopique des hydrogels implantés indiqué par une flèche noire, échelle 3mm applicable à toutes les images de la colonne (a). Colonne (b) les explants de peau avec les matériaux implantés après 8 semaines, échelle 500 μm applicable à toutes les images de la colonne (b). Colonne (c) grossissement d'une zone des matériaux implantés à 8 semaines, marqués au DAPI (noir et blanc, inversion des couleurs), échelle 50 μm applicable à toutes les images de la colonne (c).

Dans les premiers jours après l'implantation, des renflements se sont formés sous la peau quelle que soit la condition, mais de façon beaucoup moins importante pour Intégra®. Ce phénomène pourrait s'expliquer par l'implantation des matrices à l'état lyophilisé, qui s'hydratent avec les liquides de l'environnement sous-cutané. Intégra® est implanté hydraté car conditionné et utilisé ainsi en clinique. Le gonflement des hydrogels conduit à une augmentation de leur taille après implantation ce qui peut contribuer à l'aspect observé [400] mais également participer à l'apparition d'une réaction inflammatoire. Ces renflements disparaissent à partir d'une semaine post implantation, témoignant d'une inflammation transitoire, aiguë, physiologique à la suite à l'introduction d'un corps étranger [401].

Après 8 semaines d'implantation, toutes les matrices étaient encore visibles macroscopiquement (Figure 102a). Les matrices à base de pullulane/dextrane sont entourées de tissus conjonctifs, comparable à Intégra, sans présence de capsule fibrotique ni de cellules géantes (Figure 102b). Le mélange de pullulane et de dextrane utilisé pour former des biomatériaux a déjà montré une bonne réponse de l'hôte, après implantation chez le rat, avec une réaction inflammatoire et fibrotique moins importante par rapport aux hydrogels 100% pullulane et 100% dextrane [296]. L'apparence macroscopique des hydrogels MPuD_(50:50), MPuD_(50:50)COLLi, MPuD_(50:50)AxCOLLi et μ PuD_(50:50) (Figure 102a) est semblable à l'état observé au cours des expériences de dégradation *in vitro* (§1.1.a.ii) et (1.2.a)). Ces derniers semblent avoir perdu leur intégrité, apparaissant déformés, avec une géométrie mal détournée. En revanche, la référence Intégra® conserve des délimitations plus nettes. Ces observations sont retrouvées en microscopie après coloration au bleu alcian/rouge nucléaire (Figure 102b). Les matrices de pullulane/dextrane prennent une coloration bleue marquée tandis qu'Intégra® prend une coloration bleue beaucoup plus claire. Il est possible que les charges positives du bleu alcian [402] interagissent avec les charges négatives des phosphates issus des ponts de réticulation et donnent cette coloration plus intense. Les matrices étudiées semblent en effet moins denses, ne présentent par la forme rectangulaire initiale de la coupe frontale d'un disque tandis que les contours d'Intégra® sont plus homogènes. De plus, les implants présentent tous des noyaux cellulaires dans la cavité d'implantation (Figure 102c).

La densité de matière et la colonisation cellulaire présentes dans les zones d'implantation ont été mesurées à partir des coupes histologiques et représentées dans la Figure 103.

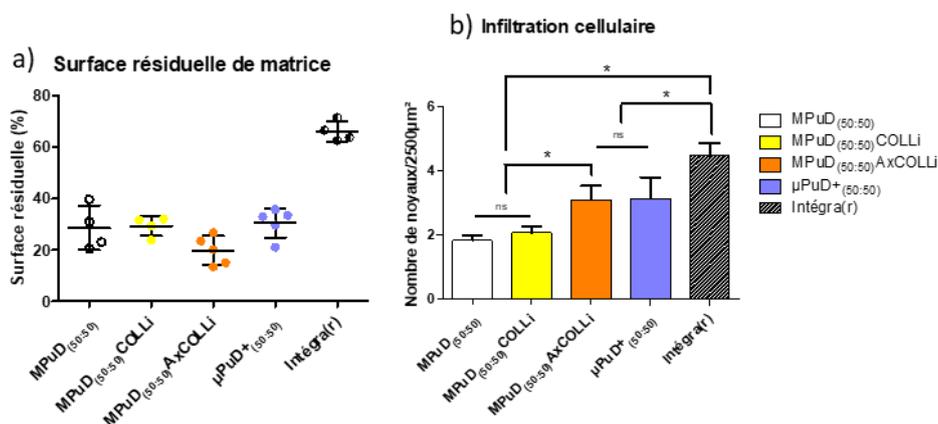


Figure 103 : (a) Surfaces résiduelles d'hydrogel rapportées à l'aire occupée par l'implant en (%) mesurée à partir de la Figure 102b. (b) Nombre de noyaux présents dans la zone occupée par l'implant par 2500 μ m² mesurée à partir de la Figure 102c. La significativité est représentée par " * " avec $p < 0,05$ et la non significativité par " ns " ($n \geq 4$).

La quantification de la densité de matière résiduelle (Figure 103a) montre que 8 semaines post-implantation, les matrices à base de pullulane/dextrane sont moins denses qu'Intégra®. En effet, elles présentent environ 30% de surface résiduelle contre 66% pour Intégra®. Les hydrogels à base de pullulane et de dextrane ont une fraction poreuse élevée (30 à 50%, Chapitre III, §1.2.a) et seraient donc potentiellement moins denses que le produit commercial à l'état initial. Ces résultats devront cependant être normalisés par la densité de matière dans les jours suivant l'implantation afin de confirmer leur dégradation. Les aspects macroscopiques et microscopiques corrélés avec les densités de matière suggèrent que les hydrogels sont dégradés lorsqu'ils sont implantés en sous-cutané. Cette caractéristique constituerait un avantage pour des formulations développées en termes de biodégradabilité des matériaux dans le cadre du traitement de plaies profondes. En effet, les biomatériaux utilisés comme matrice provisoire pour combler la perte de substance doivent idéalement se dégrader progressivement, au profit du tissu en formation. De plus, les conditions enrichies en molécule A et collagène (MPuD_(50:50)AxCOLLi) sont celles présentant la plus faible densité de matière (20 ± 6%) par rapport aux conditions non fonctionnalisées (29 ± 9%) et fonctionnalisées par du collagène seul (29 ± 4%). Cette différence pourrait être liée à la présence du composé A. En effet, la molécule A pourrait favoriser le processus de dégradation. Cependant, pour affirmer que ces différences existent, il serait nécessaire de comparer les cinétiques de dégradation par rapport à leur état initial.

Par ailleurs le nombre de noyaux observé est plus élevé dans les matrices MPuD_(50:50)AxCOLLi (3,1 ± 0,5 noyaux/2500 μ m²) et μ PuD_(50:50) (3,2 ± 0,7 noyaux/2500 μ m²) que dans les MPuD_(50:50) et MPuD_(50:50)COLLi (respectivement 1,8 ± 0,2 et 2,1 ± 0,2 noyaux/2500 μ m²). L'incorporation de la molécule A couplée au collagène se démarque encore une fois de ses contrôles, avec une colonisation

cellulaire plus importante, similaire à la formulation chargée positivement. Une synergie des actions de ces deux composés constitue une hypothèse, évoquée auparavant lors de l'évaluation de l'infiltration cellulaire dans les combinaisons collagène/molécule A (§I.1.c). La présence de charges positives semble également être plus favorable à la pénétration cellulaire, vraisemblablement en lien avec les propriétés observées dans les études *in vitro*. Le nombre de noyaux comptabilisés dans la zone matricielle reste néanmoins 1,5 fois plus élevé dans la condition commerciale (Figure 103b). Ces observations peuvent en partie s'expliquer par la densité de matière de l'implant et sa composition. Intégra® possède une densité plus importante que les autres échantillons et est majoritairement constitué de collagène de type I propice à l'adhésion cellulaire et à la migration des fibroblastes.

Ces résultats mettent en évidence l'infiltration par les cellules de l'hôte des biomatériaux. De plus, les matériaux étudiés semblent être dégradés par l'organisme, indiquant un remodelage et signe d'intégration par les tissus [401]. Dans le cas d'Intégra, l'invasion cellulaire semble plus marquée que dans les formulations testées avec une biodégradation moindre. Il serait intéressant de compléter ces résultats par une évaluation de l'état des hydrogels et de la présence de différents marqueurs à différents temps jusqu'à dégradation complète. La sécrétion de composés matriciels ainsi que la cinétique de dégradation permettront de mieux discriminer les étapes inflammatoires et de remodelage dans chacune des conditions.

II.2.b) Implantation dans un modèle de plaie cutanée

La biocompatibilité et l'efficacité des hydrogels étudiés ont ensuite été évaluées dans des modèles de plaie cutanée d'excision totale chez la souris. Une différence physiologique majeure à prendre en compte entre la cicatrisation chez l'homme et chez les rongeurs sont que ces derniers possèdent un tégument mobile responsable d'une peau « lâche ». De plus, la contraction est présente pendant presque tout le processus de fermeture de la plaie, tandis que chez l'homme c'est une étape qui arrive plus tardivement au moment de la phase de prolifération [59]. Dans le modèle de cicatrisation étudié, un anneau de silicone a été suturé sur chaque plaie afin d'éviter la cicatrisation par contraction [309]. Cette précaution permet d'induire une cicatrisation par formation de tissus de granulation et ré-épithélialisation avec une faible contraction, plus comparable au processus de cicatrisation physiologique humain [403].

Les implants ont été déposés dans la plaie, et laissés pendant 7 jours. L'aspect macroscopique du lit de la plaie a été suivi quotidiennement, conformément aux réglementations du bien-être animal, afin de surveiller le changement de couleur signe de nécrose, d'inflammation, d'infection ou

d'épithélialisation. L'évolution des plaies a été mesurée à partir de photographies étalonnées (Figure 104). Les aires des plaies ont été calculées à partir de ces images et rapportées à l'aire initiale (Figure 105). Après 7 jours d'implantation, l'ensemble du lit de la plaie et des tissus adjacents aux implants a été excisé, fixé, congelé et coupé pour coloration histologique (Figure 106).

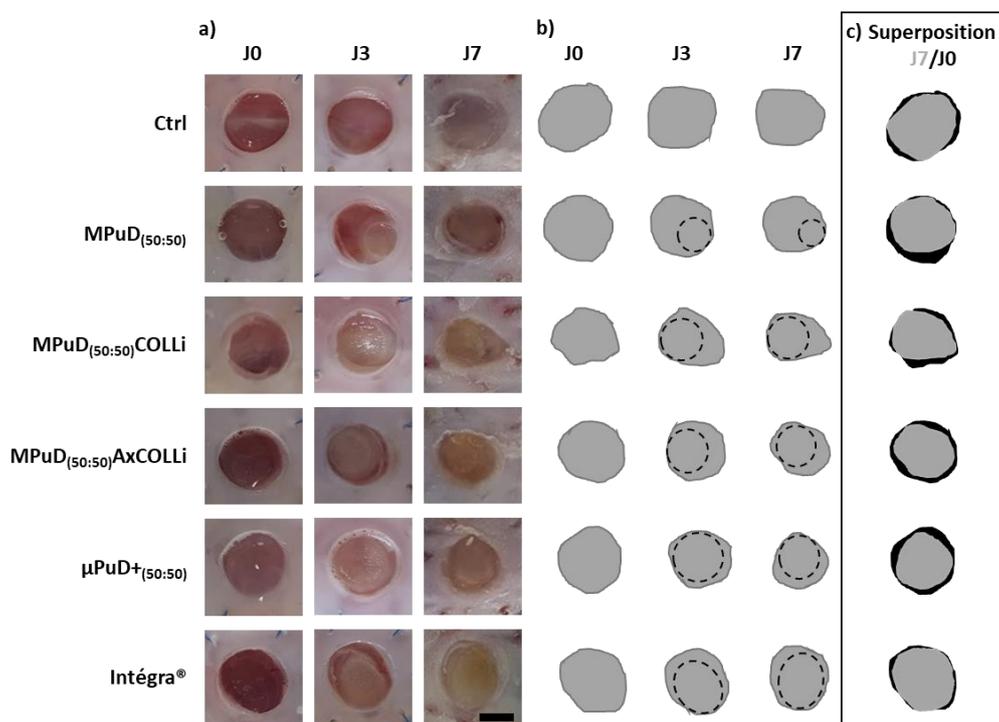


Figure 104 : (a) Aspect macroscopique des plaies immédiatement (T0), à 3 et 7 jours après excision. (b) Représentations schématiques des aires de la plaie (gris) et des implants (en pointillés). (c) Superposition des représentations des aires à T0 et J7. Echelle 2,5mm applicable à toutes les images.

Les hydrogels ont été apposés au sein du lit des plaies. Afin de prévenir un assèchement de la zone, l'ensemble plaie/silicone a été recouvert par un film transparent semi-perméable (Tégaderm®) permettant les échanges gazeux, la protection et l'observation des plaies. Les matrices à base de pullulane/dextrane ont été implantées à l'état lyophilisé. Intégra® quant à lui est conditionné à l'état hydraté et doit être rincé par du sérum physiologique plusieurs fois avant utilisation. Les matériaux développés dans ce projet sont destinés à être conditionnés et utilisés à l'état lyophilisé. Cette forme permet en effet une bonne conservation, une manipulation simple et une utilisation immédiate. Le fluide corporel sécrété par la plaie a été absorbé par l'hydrogel. Ce changement d'état est susceptible de réduire la perte de liquide et engendrer un environnement humide, favorable à la régénération cutanée [6].

Les échantillons ont été implantés pendant 7 jours sans qu'aucun signe macroscopique de rejet, de nécrose ou d'inflammation sévère n'ait été discernable au cours de l'expérience. Néanmoins certaines plaies avaient présenté des signes d'infection dans des expériences précédentes. La

survenue de ces infections a pu être diminuée grâce à la mise en place d'actions correctrices au niveau du mode opératoire chez les animaux et de l'environnement. La coloration des plaies est rouge à rose pâle (Figure 105a), et correspond à une coloration physiologique d'après la classification des lits de la plaie [404]. Comme représenté sur la Figure 104b (zones grises), toutes les plaies semblent diminuer au cours du temps, avec une aire plus petite à 7 jours qu'à T0 (Figure 104c, zones noires).

Par ailleurs, tous les implants ont été retrouvés au sein des plaies, dans un état hydraté à 3 jours et hydraté ou sec à 7 jours, en fonction de l'intégrité du système suture/silicone/Tegaderm®. En effet, comme énoncé précédemment, la peau des souris est lâche et la tension exercée par les points de suture semble induire un relâchement du tissu, accompagné d'une perte d'étanchéité de l'environnement de la plaie. Cette perte d'étanchéité rend le site plus sensible à la dessiccation et à l'infection. Les matrices à base de pullulane/dextrane sont transparentes tandis qu'Intégra® est plus opaque. Cette différence de couleur semble intrinsèque au matériau et a également été observée en sous-cutané (Figure 102a). Il est à noter que les hydrogels de pullulane/dextrane ne recouvrent pas complètement la plaie, contrairement à Intégra®. Ce phénomène est lié à la rétraction de la matrice au moment de l'hydratation, qui diminue en diamètre (diamètre sec \approx 5mm). Les hydrogels implantés doivent recouvrir toute la plaie pour une protection et une efficacité optimale. Pour ce faire, il a été envisagé de les implanter avec un diamètre plus important, mais cela aurait rendu difficile l'introduction des matrices à travers le diamètre interne du silicone (6mm). De plus, prédire les variations de taille entre l'état hydraté et l'état sec avant application rendrait son utilisation en clinique plus fastidieuse. Afin d'ajuster au mieux l'implant, une solution serait d'hydrater juste avant implantation les matériaux pour les découper à la taille de la plaie. Dans cette optique, il serait alors possible de les hydrater simplement avec du sérum physiologique ou avec des solutions antiseptiques, antibactériennes ou encore avec un agent thérapeutique pour en renforcer l'efficacité. Ces stratégies seront testées lors d'expérimentations ultérieures. Les implants ne semblent pas changer de place dans la plaie entre les jours 3 et 7, et seraient donc possiblement intégrés dans le lit de la plaie.

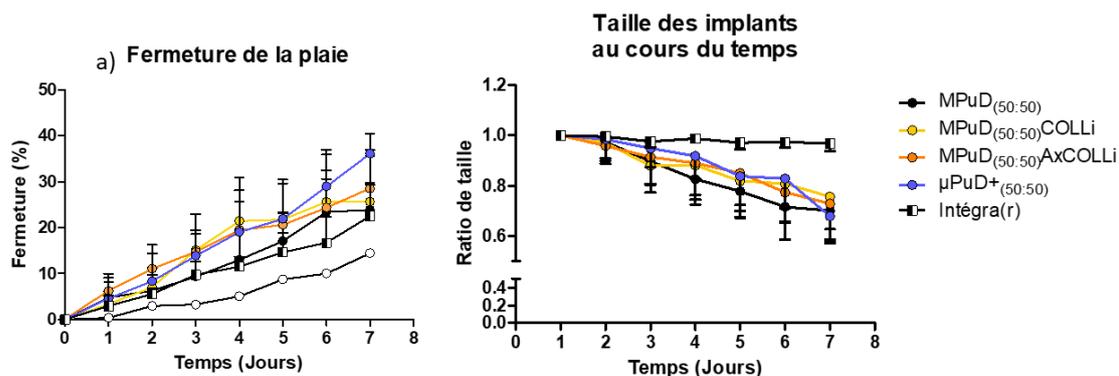


Figure 105 : (a) Suivi de l'aire des plaies rapportée à l'aire initiale de chacune des conditions ($n \geq 5$ pour biomatériaux et $n=1$ pour contrôle négatif). (b) Suivi du diamètre des implants au cours du temps rapporté au jour 1 ($n=5$).

Les profils de fermeture de la plaie ont été suivis pendant 7 jours après la création des plaies (Figure 105a). La présence des implants ne semble pas gêner la fermeture quand on la compare au contrôle sans implant. La variabilité entre les échantillons d'une même condition est importante, avec des écart-types à chacun des temps compris entre 2 et 10%, ne permettant pas de conclure définitivement sur des différences significatives. Pourtant, une tendance se dégage à J7 avec une fermeture plus rapide pour les matrices $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ (violet, $36 \pm 4\%$), par rapport aux matrices co-incorporées collagène/molécule A $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{AxCOLLi}$ (orange, $29 \pm 8\%$), celles contenant du collagène seul $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{COLLi}$ (jaune, $26 \pm 10\%$), et $\text{Intégra}^{\text{®}}$ (noir et blanc, $23 \pm 7\%$) et aux hydrogels non fonctionnalisés $\text{MPuD}_{(50:50)}$ (noir, $24 \pm 6\%$). Il a été observé dans d'autres études que les différences statistiques entre les fermetures étaient visibles 9 jours après incision chez la souris [400] et le rat [289]. Il serait intéressant de réaliser l'étude jusqu'à fermeture complète (temps d'implantation supérieur à 15 jours) [400]. Des essais préliminaires ont été effectués jusqu'à 10 jours mais les points de suture des silicones cisailaient la peau conduisant à la fois à l'assèchement et à la contraction des plaies. Afin améliorer la fixation du silicone, de la colle pourrait être utilisée [405]. Cette approche a préalablement été testée au laboratoire mais les colles provoquaient des irritations cutanées et les silicones finissaient par se décoller avant la fin de l'expérience.

Les expériences de cicatrisation pourraient être réalisées sans utiliser d'anneaux de silicone [153], [289], [406]. Ces modèles sont plus éloignés du processus de cicatrisation humaine, mais suivraient le mécanisme de réparation physiologique de l'animal sans les inconvénients apportés par les dispositifs pour empêcher la contraction. Cela pourrait diminuer les variations inter échantillons tout en limitant l'induction de points d'entrées aux infections formés par les sutures. Ces modèles murins restent cependant utiles pour effectuer une sélection préliminaire des formulations avant d'utiliser une espèce plus proche pour obtenir des données transposables à l'homme.

La mesure des diamètres des matériaux, confirme ce qui avait été observé macroscopiquement. En effet, la taille des matériaux à base de pullulane/dextrane diminue avec le temps pour les différentes conditions. Intégra® conserve globalement la même taille (Figure 105). Cette variation pourrait s'expliquer par une dessiccation progressive diminuant le gonflement ou alors résultant d'une dégradation. Par ailleurs, dans les études de caractérisation précédentes, il a été observé que le gonflement des hydrogels à base de pullulane et de dextrane dépendait du pH et de la force ionique (§1.1.a.ii) et §1.2.a)). La composition du liquide présent dans la plaie [95] diffère en fonction de l'étape de la cicatrisation et pourrait aussi moduler le gonflement de l'hydrogel. Le diamètre des hydrogels diminue avec l'aire des plaies, ce qui laisse envisager que les hydrogels à base de pullulane/dextrane seraient capables de se déformer sous l'action des différents acteurs de la cicatrisation.

L'examen histologique fournit des informations importantes sur l'état d'une plaie. Les explants de peau ont alors été coupés puis colorés pour analyse. Les coupes histologiques ont été réalisées sur échantillons congelés afin de préserver les hydrogels, sensibles aux étapes de déshydratation pour l'inclusion en paraffine. Cependant, lors des colorations, les échantillons de peau se détachaient partiellement voire totalement des lames, rendant leur lecture impossible. Différents revêtements de lames ont donc été testés afin de résoudre ce problème. Le revêtement le plus efficace a été celui à base d'une solution de gélatine et a permis d'obtenir une meilleure intégrité des échantillons. Grâce à ce revêtement, les échantillons ont été colorés et rincés à la pipette pour éviter des pertes supplémentaires de matière liées aux bains successifs. Cependant, cette technique est moins standardisée et pourrait expliquer les différences d'intensités visibles entre les échantillons. Grâce à ces mises au point, des coupes histologiques ont pu être obtenues pour observation préliminaire et sont présentées dans la Figure 106.

L'excision de profondeur totale est une plaie de type III induisant une cicatrisation secondaire [20]. Différents paramètres peuvent être évalués à 7 jours pour comparer les cicatrisations : la réponse inflammatoire, la ré-épithélialisation à partir des berges de la plaie et l'apparence du tissu de granulation [277], [287]. Seule une coloration hématoxyline et éosine permettant d'observer respectivement les noyaux et le cytoplasme a pu être réalisée pour le moment. Les marqueurs de l'inflammation et de vascularisation n'ont pas pu être étudiés à partir de ces coupes. Le tissu de granulation n'a pas non plus pu être clairement délimité.

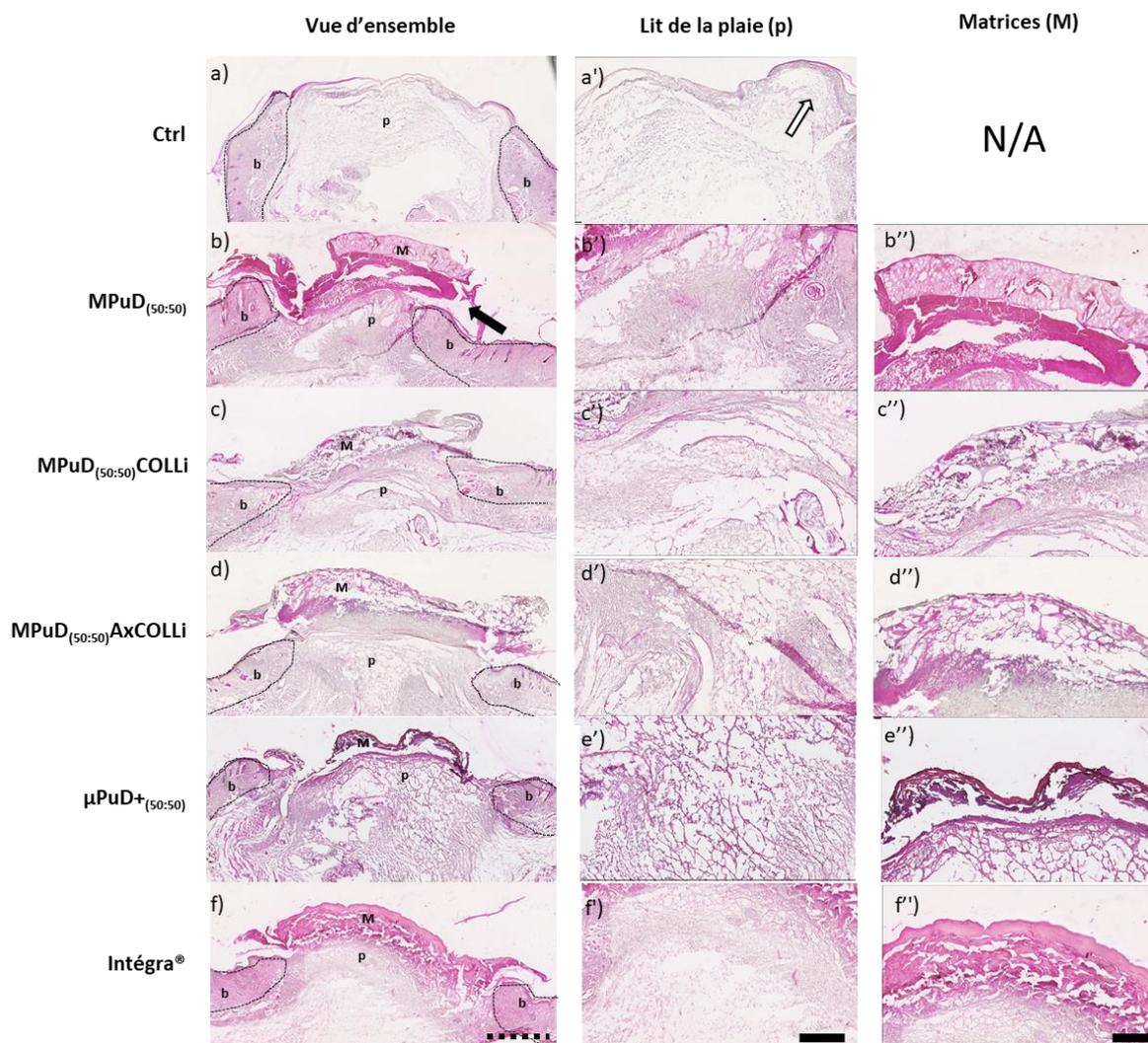


Figure 106 : Coupes histologiques coloration H/E de l'ensemble du tissu (a à f). N/A pour « non applicable » car dans le contrôle négatif il n'y a pas de matrice. Les berges de la plaie sont représentées par les zones avec l'annotation "b" sur les images (a à f). Le lit de la plaie est indiqué par l'annotation "p" et la matrice par l'annotation "m" sur les images (a à f) avec une échelle pointillée de 1mm applicable à toute la colonne. Les agrandissements des berges de la plaie sont représentés sur les images (a' à f') et des matériaux implantés (b'' à f'') avec des échelles noires de 250 μm applicables aux images de leur colonne respective. La flèche noire représente une couche entre la matrice et le lit de la plaie, et la flèche blanche une langue épithéliale.

La langue épithéliale, que l'on peut observer dans le contrôle négatif (Figure 106a', flèche blanche) est difficile à discerner dans les plaies avec les implants. Une couche de cellules séparant le matériau du lit de la plaie est remarquée pour la condition non fonctionnalisée MPuD_(50:50), (Figure 106b, flèche noire) absente du contrôle négatif (Figure 106a). D'après la littérature, il pourrait s'agir de cellules du sang et de cellules inflammatoire ou d'accumulation de protéines [407]. Certains échantillons, MPuD_(50:50)COLLi, MPuD_(50:50)AxCOLLi et μPuD_(50:50), ont présenté des réactions similaires. Cette observation est moins marquée pour Intégra® (Figure 106f''). L'apparition de cette couche pourrait être la conséquence de la déshydratation de l'échantillon pendant le temps de l'expérimentation ou du recouvrement partiel des plaies par les matrices de pullulane/dextrane des plaies.

De manière générale, il n'y a pas ou peu de colonisation cellulaire visible sur la partie en contact avec l'extérieur. La migration cellulaire semble donc se faire entre les matériaux et le tissu de granulation [30]. Les matériaux enrichis en collagène (Figure 106c'' et d''), et Intégra® semblent avoir intégré le lit de la plaie avec une colonisation cellulaire plus importante, probablement liée à la formation de tissu. Cette différence peut être à la fois le résultat de la présence de collagène de type I, commune aux trois formulations, et à la porosité plus importante des formulations MPuD_(50:50). En effet, dans les études cellulaires 3D (Figure 99 à Figure 101) ces conditions avaient démontré une infiltration cellulaire en profondeur des matrices. Au contraire, la formulation μ PuD_(50:50) semble moins intégrée car plus fine que les autres conditions avec une colonisation cellulaire. La différence d'aspect de l'échantillon pourrait être due à une dégradation par les cellules de la même manière qu'après implantation en sous-cutané (Figure 102d).

Les différentes difficultés rencontrées pendant ces expérimentations dans des modèles de plaies n'ont pas permis de finaliser ces études au cours de ce travail de thèse. Elles ont tout de même permis de mettre en évidence que le modèle ainsi que la méthode d'application des biomatériaux devaient être optimisés. Par ailleurs, les paramètres évoqués (marqueurs de l'inflammation, de la néoangiogénèse, du collagène etc.) doivent être analysés avec d'autres colorations et immunomarquages spécifiques [33] des différentes étapes de la cicatrisation. Enfin, utiliser un modèle avec des comorbidités associées (diabète, obésité) [408], [409] ou générer des plaies chroniques tels que les ulcères [410] constitueraient des modèles plus pertinents. Les échantillons étudiés ici ont pour objectif d'être utilisés en tant que substitut dermique. Il serait alors intéressant d'adapter le processus de soin à ce qui est réalisé actuellement en clinique : ajouter une couche superficielle au dispositif temporaire [411] ou les recouvrir par une greffe autologue épidermique [388], [412]. De plus, l'espèce animale choisie pour ces premiers tests peut également être mieux adaptée. En effet, l'idéal serait d'appliquer ces procédures dans un modèle dont la cicatrisation physiologique est similaire à celle de l'homme, comme le porc [273], [413].

III] Conclusion de la preuve de concept des fonctionnalisations

Afin d'améliorer les capacités des matrices de pullulane et de dextrane à être colonisées par les cellules cutanées, il a été choisi de les fonctionnaliser dans un premier temps avec du collagène de type I et enrichi ou non avec le composé A. Dans un second temps, les charges positives ont été greffées au réseau de polymère. La caractérisation physico-chimique et cellulaire de ces composés ont conduit à la sélection de 3 matériaux : MPuD_(50:50)COLLi, MPuD_(50:50)AxCOLLi et μ PuD_(50:50).

Ces hydrogels et leur contrôle non fonctionnalisé ont été comparés à une référence commerciale, Intégra®. Des études *in vitro* et *in vivo* ont été menées pour en évaluer l'efficacité et la sécurité. Les études de cytotoxicité ont démontré qu'aucun des matériaux ne libérait des composants toxiques pour les cellules. Les cellules du derme et de l'épiderme ensemencées en 3D étaient capables d'adhérer dans la profondeur ou en surface des matériaux fonctionnalisés. Certains composants communs à la MEC native et provisoire du derme, sécrétés par les fibroblastes, ont été retrouvés dans les trois conditions et le produit commercial. L'incorporation de la molécule A dans les hydrogels semble apporter une amélioration dans la colonisation cellulaire dont l'efficacité et le mécanisme d'action doivent être plus amplement explorés.

Par la suite, une étude préclinique des hydrogels réticulés de pullulane/dextrane a été réalisée sur un modèle d'implantation sous cutanée et de plaie profonde. Les études d'implantation sous-cutanée ont révélé que les hydrogels avaient une bonne biocompatibilité avec une colonisation par les cellules hôtes accompagnée d'une dégradation progressive des matrices. Le collagène associé à la molécule A semble améliorer l'infiltration de cellules et la dégradabilité du matériau avec une densité de matière résiduelle plus faible. L'addition de charges positives au matériau ne semble pas empêcher sa dégradation et présente la colonisation cellulaire la plus élevée après le produit commercial. En effet, Intégra® avait la meilleure colonisation cellulaire mais avec la densité de matière la plus élevée et donc probablement une dégradation et un remaniement plus lents. Une étude préliminaire d'application des hydrogels dans des modèles de plaies cutanées chez la souris a permis d'observer le comportement des formulations dans un contexte de cicatrisation. Bien que la mise en œuvre ait été difficile et nécessite d'être optimisée, les hydrogels de pullulane/dextrane ne semblent pas provoquer de réaction inflammatoire excessive, de nécrose ou d'infections. Les plaies étaient capables de se fermer avec une tendance plus rapide pour la condition $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ et une meilleure intégration tissulaire pour la formulation $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{AxCOLLi}$.

Des résultats très prometteurs ont été obtenus en comparaison au produit commercial le plus utilisé à savoir Intégra®. En effet, par rapport à ce produit, une matrice de collagène très dense et moins dégradable, les formulations $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{AxCOLLi}$ et $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ à base de polysaccharides fonctionnalisés, ont démontré de très bonnes propriétés en tant que support de migration cellulaire. Dans le cas de la formulation $\text{MPuD}_{(50:50)}\text{AxCOLLi}$, ces matrices ne comportent qu'une très faible quantité de collagène en comparaison à Intégra® et l'utilisation de la molécule A, d'origine végétale, a permis d'en potentialiser l'action. De l'autre côté, les hydrogels fonctionnalisés par des charges positives, avec des propriétés physico-chimiques et une topographie modifiées, ont donné des

résultats comparables à la référence commerciale sans la présence de protéines issues de tissu animal. De plus, ces formulations semblent présenter une meilleure dégradation et potentiellement une meilleure intégration. Ces formulations constituent des candidats prometteurs pour la cicatrisation des plaies, dont l'évaluation de l'efficacité pré-clinique doit être poursuivie.

CONCLUSION GENERALE

Les plaies cutanées correspondent à une interruption de la continuité de la peau et de ses fonctions. Elles sont d'étiologies diverses et dans la plupart des cas, sont réparées grâce au processus de cicatrisation qui se met en place immédiatement après la lésion. Cependant, des facteurs locaux ou systémiques peuvent allonger le délai de cicatrisation. Lorsque les plaies ne guérissent pas, elles deviennent chroniques. La cicatrisation est alors pathologique et les fonctions de la peau ne sont pas restaurées. Les personnes atteintes sont exposées au risque de développer de graves complications.

Le traitement thérapeutique des plaies chroniques nécessite l'application de dispositifs capables d'apporter des facteurs permettant de restaurer la cicatrisation altérée et/ou d'apporter un support pour combler la perte de substance. Dans ce dernier cas, le matériau sert de matrice provisoire pour les cellules environnantes. Il existe de nombreux biomatériaux pour l'ingénierie tissulaire cutanée mais la plupart restent aujourd'hui des traitements provisoires pour préparer le site de la plaie en vue d'une greffe de peau. Le développement de biomatériaux à base d'hydrogel est très prometteur et est largement étudié pour tenter d'apporter un traitement optimal à ce type de plaie. Le développement de ces biomatériaux repose sur plusieurs stratégies dont deux ont été développées dans ce travail de recherche. En effet, deux applications de dispositifs à partir d'hydrogels de pullulane et de dextrane ont été étudiées, sous la forme d'une plateforme de libération pour des ingrédients actifs favorisant une activité métabolique et de substituts cutanés servant de matrice provisoire pour la régénération.

Dans la première partie de ce travail, des formulations reposant sur une base technologique de polysaccharides réticulés par du STMP ont été développées dans le contexte de réparation cutanée en tant que plateforme de libération pour des composés extraits de plantes. Ces derniers sont actuellement produits par l'entreprise Silab et utilisés en cosmétique. Ils ont démontré *in vitro* une action sur le métabolisme des cellules de la peau et ont potentiellement la capacité d'accélérer la réparation cutanée. Les molécules ont pu être incorporées par trois méthodes différentes dans les matériaux et deux profils de libération ont été mis en évidence : l'un, très lent, basé sur la dégradation du matériau et l'autre, rapide, basé sur une diffusion contrôlée par les forces osmotiques. Les cinétiques de libération ont pu être confirmées à travers plusieurs modèles : *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*.

La deuxième partie de ce travail a consisté à formuler un substitut cutané. L'axe de recherche a été d'améliorer les interactions cellules/matériaux afin de servir de matrice provisoire et ainsi favoriser la cicatrisation de plaie profonde. Pour cela, les matrices polysaccharidiques issues de la première partie de cette étude ont été fonctionnalisées. Dans cette optique, ces matériaux ont été

enrichis soit en collagène de type I, soit avec des charges positives. Ces modifications ont permis d'améliorer la colonisation par les deux types cellulaires majoritaires de la peau et acteurs principaux de la cicatrisation que sont les kératinocytes et les fibroblastes. En effet, leur adhésion a été améliorée et la production de composants de la MEC a pu être observée. Par ailleurs, les résultats *in vivo* ont montré des résultats préliminaires prometteurs par rapport à un produit commercialisé largement utilisé, Intégra®. Ces études sont à approfondir notamment avec une optimisation de l'analyse histologique des échantillons. Des études complémentaires sur des modèles *in vivo* plus proches de la cicatrisation humaine seront également nécessaires afin de mieux comprendre l'impact des fonctionnalisations des différentes formulations développées dans cette étude.

Suite à ce projet de thèse, de nombreuses pistes restent à explorer pour approfondir ce sujet de recherche.

Dans un premier temps, la caractérisation des ingrédients actifs de grade cosmétique pourrait être améliorée, notamment avec l'identification de la fraction active du produit A et sa purification. Ces études complémentaires permettraient d'optimiser l'efficacité et de mieux contrôler la synthèse du produit final. Des études de biodistribution après administration locale ou systémique, notamment grâce à des études de radioactivité pour la molécule A, permettraient de déterminer les voies d'élimination de ce composé. L'étude de marqueurs cellulaires supplémentaires tels que des marqueurs d'adhésion, de différenciation (myofibroblastes) et de prolifération apporterait plus d'informations quant à l'activité des cellulesensemencées en 3D au sein des matériaux. De plus, l'effet synergique de l'association de la molécule A avec le collagène serait intéressant à analyser pour une meilleure compréhension des mécanismes impliqués. Des essais de coculture avec différents types cellulaires, fibroblastes/kératinocytes à l'interface eau/air et également avec des cellules endothéliales, permettraient d'étudier les bénéfices de ces matériaux sur une éventuelle vascularisation et mise en place du tissu de granulation. Cette étude est en cours au sein de la société Siltiss.

Dans un second temps, démontrer les performances de ces matrices composites constituerait un véritable défi dans le domaine de la médecine régénérative. Des améliorations de protocole pourraient être apportées comme par exemple mimer les implantations chirurgicales réalisées en clinique (traitement des plaies, méthode d'implantation) ou travailler dans un environnement plus adapté au traitement de plaies ouvertes (conditions aseptiques, zone EOPS) afin de diminuer les

risques infectieux. L'étude de ces différents matériaux dans des plaies chez le porc serait pertinente et permettrait d'approfondir les effets sur les interactions entre ces matériaux et les tissus cicatriciels.

Enfin, les matériaux de pullulane/dextrane pourraient être synthétisés suivant différentes formes selon l'application visée. Pour la libération des composés actifs, il serait intéressant d'utiliser un gel topique formé de billes hydratées par une solution d'intérêt. Pour l'application en tant que substitut dermique, une seconde couche, en face externe, pourrait être ajoutée pour restaurer la fonction de barrière et maintenir l'hydratation de l'hydrogel. Ces biomatériaux devraient subir une étape de stérilisation terminale, pour assurer leur innocuité et respecter les exigences en vue d'une utilisation en clinique. La stérilisation gamma étant déjà mise en œuvre pour ce type de biomatériaux à base de polysaccharides, il sera intéressant d'en étudier l'impact sur ces matériaux.

En conclusion, les hydrogels à base de pullulane et de dextrane sont des plateformes versatiles pour la mise au point de biomatériaux. Ils sont très prometteurs pour des applications cutanées, soit pour délivrer des facteurs permettant l'amélioration de la cicatrisation, soit pour agir comme matrice provisoire dans les plaies. Ce travail de thèse a été transversal, commençant par la synthèse d'un grand nombre de formulations, suivie de leurs analyses physico-chimiques, de l'évaluation des propriétés biologiques et de la confirmation de ces résultats sur des modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Ce projet offre des perspectives dans le domaine de l'ingénierie tissulaire cutanée et dans le développement de nouvelles matrices pour le traitement de plaies chroniques.

Dès lors que les essais précliniques complémentaires pourront attester de leur sécurité et leur efficacité, le transfert technologique de ces matrices de polysaccharides pourra alors être initié. La société Siltiss, avec laquelle ce travail a été fait en partenariat, pourra reprendre ces résultats, et prendre alors en charge le transfert et l'industrialisation des procédés. La mise en place d'une production en conditions GMP permettra des études pré-cliniques à plus grande échelle pour aboutir à une application clinique.

REFERENCES

- [1] P. F. Millington et R. Wilkinson, *Skin*. Cambridge: Cambridge University Press, 2009.
- [2] S. Kusuma, RaviK. Vuthoori, M. Piliang, et JamesE. Zins, « Skin Anatomy and Physiology », in *Plastic and Reconstructive Surgery*, MariaZ. Siemionow et M. Eisenmann-Klein, Éd. Springer London, 2010, p. 161-171.
- [3] « Wound Types », *Wound Care Centers*. www.woundcarecenters.org (consulté le févr. 22, 2016).
- [4] M. Flour, « The physiopathology of vulnerable skin ». *World Wide Wounds*, sept. 2009, [En ligne]. Disponible sur: <http://www.worldwidewounds.com/2009/September/Flour/vulnerable-skin-1.html>.
- [5] « Wounds », *The Free Dictionary*. .
- [6] A. J. Singer et R. A. Clark, « Cutaneous wound healing », *N. Engl. J. Med.*, vol. 341, n° 10, p. 738-746, sept. 1999, doi: 10.1056/NEJM199909023411006.
- [7] S. Guo et L. A. DiPietro, « Factors Affecting Wound Healing », *Journal of Dental Research*, vol. 89, n° 3, p. 219-229, mars 2010, doi: 10.1177/0022034509359125.
- [8] C. Thomas Hess, « Checklist for Factors Affecting Wound Healing »: *Advances in Skin & Wound Care*, vol. 24, n° 4, p. 192, avr. 2011, doi: 10.1097/01.ASW.0000396300.04173.ec.
- [9] The American College of Wound Healing and Tissue Repair, « Patient-Centered Outcomes in Wound Care », déc. 2013.
- [10] Z. Moore, *Wound Care*, vol. 1. Bejin: MDPI, 2015.
- [11] C. K. Sen *et al.*, « Human skin wounds: A major and snowballing threat to public health and the economy », *Wound Repair and Regeneration*, vol. 17, n° 6, p. 763-771, nov. 2009, doi: 10.1111/j.1524-475X.2009.00543.x.
- [12] K. D. Schaum, « The Ups and Downs of the 2016 Medicare Physician Fee Schedule »: *Advances in Skin & Wound Care*, vol. 29, n° 2, p. 54-56, févr. 2016, doi: 10.1097/01.ASW.0000479406.60064.e5.
- [13] « Patient-centered Outcomes in wound care ». Consulté le: févr. 12, 2016. [En ligne]. Disponible sur: https://www.angio.org/wp-content/uploads/2013/10/Wound_Care_White_Paper.pdf.
- [14] K. LeBlanc et S. Baranoski, « SkinTears: State of the Science : Consensus Statements for the prevention, Prediction, Assessment, and Treatment of Skin Tears », sept. 2011.
- [15] S. D. Ramsey *et al.*, « Incidence, outcomes, and cost of foot ulcers in patients with diabetes », *Diabetes Care*, vol. 22, n° 3, p. 382-387, mars 1999.
- [16] M. Bitsch, D. M. Saunte, M. Lohmann, P. E. Holstein, B. Jørgensen, et F. Gottrup, « Standardised method of surgical treatment of chronic leg ulcers », *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg*, vol. 39, n° 3, p. 162-169, 2005, doi: 10.1080/02844310510006196.
- [17] P. Massol, « Plaies chroniques : les soins locaux », *Egora*, n° 175, p. 24, avr. 2018.
- [18] « Histologie de la peau et de ses annexes ». Collège des Enseignants en Dermatologie de France, mai 2011.
- [19] P. Muehlbauer et C. McGowan, Éd., *Skin cancer*. Pittsburgh, Pa: Oncology Nursing Society, 2009.
- [20] S.-K. Han, *Innovations and Advances in Wound Healing*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2016.
- [21] « Wound Basics », *Wound Care Centers*. www.woundcarecenters.org (consulté le janv. 27, 2016).
- [22] G. K. Menon, « Skin Basics; Structure and Function », in *Lipids and Skin Health*, A. Pappas, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2015, p. 9-23.
- [23] S. Paxton, M. Peckham, K. Adele, S. Paxton, K. Adele, et M. Peckham, « The Leeds Histology Guide », 2003, Consulté le: oct. 25, 2016. [En ligne]. Disponible sur: http://www.histology.leeds.ac.uk/skin/epidermis_cells.php.

- [24] B. Dréno, « Anatomie et physiologie de la peau et de ses annexes », *Annales de Dermatologie et de Vénérologie*, vol. 136, p. S247-S251, oct. 2009, doi: 10.1016/S0151-9638(09)72527-X.
- [25] M. Démarchez, « L'épiderme et la différenciation des kératinocytes », <http://biologiedelapeau.fr>, oct. 25, 2015. <http://biologiedelapeau.fr/> (consulté le févr. 19, 2017).
- [26] « Histologie et histophysiologie de la peau et de ses annexes », in *Annales de dermatologie et de vénérologie*, vol. 132, Elsevier Masson, 2005.
- [27] T. C. Wikramanayake, O. Stojadinovic, et M. Tomic-Canic, « Epidermal Differentiation in Barrier Maintenance and Wound Healing », *Adv Wound Care (New Rochelle)*, vol. 3, n° 3, p. 272-280, mars 2014, doi: 10.1089/wound.2013.0503.
- [28] Université Parsi Sud, « Cours_Systèmes cutanés et oculaires ». 2013.
- [29] C. Has et A. Nyström, « Epidermal Basement Membrane in Health and Disease », in *Current Topics in Membranes*, vol. 76, Elsevier, 2015, p. 117-170.
- [30] P. Rousselle, M. Montmasson, et C. Garnier, « Extracellular matrix contribution to skin wound re-epithelialization », *Matrix Biology*, vol. 75-76, p. 12-26, janv. 2019, doi: 10.1016/j.matbio.2018.01.002.
- [31] Z. Zaidi et S. W. Lanigan, « Skin: Structure and Function », in *Dermatology in Clinical Practice*, London: Springer London, 2010, p. 1-15.
- [32] A. Falabella et R. Kirsner, Éd., *Wound healing*. Boca Raton: Talyor & Francis, 2005.
- [33] J. Zhu et R. E. Marchant, « Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds », *Expert Rev Med Devices*, vol. 8, n° 5, p. 607-626, sept. 2011, doi: 10.1586/erd.11.27.
- [34] L. E. Tracy, R. A. Minasian, et E. J. Caterson, « Extracellular Matrix and Dermal Fibroblast Function in the Healing Wound », *Advances in Wound Care*, vol. 5, n° 3, p. 119-136, mars 2016, doi: 10.1089/wound.2014.0561.
- [35] L. D. Muiznieks et F. W. Keeley, « Molecular assembly and mechanical properties of the extracellular matrix: A fibrous protein perspective », *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*, vol. 1832, n° 7, p. 866-875, juill. 2013, doi: 10.1016/j.bbadis.2012.11.022.
- [36] J. K. Mouw, G. Ou, et V. M. Weaver, « Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction », *Nat Rev Mol Cell Biol*, vol. 15, n° 12, p. 771-785, déc. 2014, doi: 10.1038/nrm3902.
- [37] A. Nyström et L. Bruckner-Tuderman, « Matrix molecules and skin biology », *Seminars in Cell & Developmental Biology*, vol. 89, p. 136-146, mai 2019, doi: 10.1016/j.semcd.2018.07.025.
- [38] J. M. Sorrell, « Fibroblast heterogeneity: more than skin deep », *Journal of Cell Science*, vol. 117, n° 5, p. 667-675, mars 2004, doi: 10.1242/jcs.01005.
- [39] I. D. Papel, Éd., *Facial plastic and reconstructive surgery*, 3. ed. New York: Thieme, 2009.
- [40] F. M. Watt et H. Fujiwara, « Cell-Extracellular Matrix Interactions in Normal and Diseased Skin », *Cold Spring Harb Perspect Biol*, vol. 3, n° 4, avr. 2011, doi: 10.1101/cshperspect.a005124.
- [41] P. Goetz et C. Busser, « Fonctions physiologiques de la peau », in *La phytocosmétologie thérapeutique*, Springer Paris, 2007, p. 25-37.
- [42] J. Chavoïn, « Les brûlures ». [En ligne]. Disponible sur: http://www.medecine.ups-tlse.fr/dcem4/module11/sem6/brulures_201a.pdf.
- [43] É. Larousse, « Définitions : ulcère - Dictionnaire de français Larousse », *Larousse*. <http://www.larousse.fr/dictionnaires/francais> (consulté le nov. 08, 2016).
- [44] W. H. Eaglstein et V. Falanga, « Chronic wounds », *Surg. Clin. North Am.*, vol. 77, n° 3, p. 689-700, juin 1997.
- [45] J. Oliverio, E. Gero, K. L. Whitacre, et J. Rankin, « Wound Care Algorithm: Diagnosis and Treatment », *Advances in Skin & Wound Care*, vol. 29, n° 2, p. 65-72, févr. 2016, doi: 10.1097/01.ASW.0000473132.88076.af.

- [46] M.-C. Husson, « Escarre, ulcères, pied diabétique : pansements et biomatériaux. Aide à la cicatrisation. », vol. 24, n° 6, déc. 2003.
- [47] D. Mathieu, J.-C. Linke, et F. Wattel, « Non-Healing Wounds », in *Handbook on Hyperbaric Medicine*, D. Mathieu, Éd. Springer Netherlands, 2006, p. 401-428.
- [48] A. J. M. Boulton, « The diabetic foot: grand overview, epidemiology and pathogenesis », *Diabetes/Metabolism Research and Reviews*, vol. 24, n° S1, p. S3-S6, mai 2008, doi: 10.1002/dmrr.833.
- [49] M. J. McNeely *et al.*, « The independent contributions of diabetic neuropathy and vasculopathy in foot ulceration. How great are the risks? », *Diabetes Care*, vol. 18, n° 2, p. 216-219, févr. 1995.
- [50] « The different types of wounds », in *Wound care handbook*, .
- [51] « Clinical Guidelines (Nursing): Wound assessment and management ». https://www.rch.org.au/rchcpg/hospital_clinical_guideline_index/Wound_assessment_and_management/ (consulté le nov. 24, 2019).
- [52] NPUAP, « Pressure Injury Stages ». <http://www.npuap.org/resources/educational-and-clinical-resources/npuap-pressure-injury-stages/> (consulté le nov. 08, 2016).
- [53] G. C. Gurtner, S. Werner, Y. Barrandon, et M. T. Longaker, « Wound repair and regeneration », *Nature*, vol. 453, n° 7193, Art. n° 7193, mai 2008, doi: 10.1038/nature07039.
- [54] E. Universalis, « RÉGÉNÉRATION ET CICATRISATION », *Encyclopædia Universalis*. <http://www.universalis.fr/encyclopedie/regeneration-et-cicatrisation/> (consulté le nov. 23, 2019).
- [55] P. S. Murphy et G. R. D. Evans, « Advances in Wound Healing: A Review of Current Wound Healing Products », *Plastic Surgery International*, vol. 2012, p. 1-8, 2012, doi: 10.1155/2012/190436.
- [56] J. A. Schilling, « Wound healing », *Surg. Clin. North Am.*, vol. 56, n° 4, p. 859-874, août 1976.
- [57] N. Fournier et S. Mordon, « Nonablative remodeling with a 1,540 nm erbium:glass laser », *Dermatol Surg*, vol. 31, n° 9 Pt 2, p. 1227-1235; discussion 1236, sept. 2005.
- [58] G. Broughton, J. E. Janis, et C. E. Attinger, « The Basic Science of Wound Healing »., *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 117, n° SUPPLEMENT, p. 12S-34S, juin 2006, doi: 10.1097/01.prs.0000225430.42531.c2.
- [59] S.-K. Han, « Basics of Wound Healing », in *Innovations and Advances in Wound Healing*, Springer Berlin Heidelberg, 2016, p. 1-37.
- [60] T. Velnar, T. Bailey, et V. Smrkolj, « The wound healing process: an overview of the cellular and molecular mechanisms », *J. Int. Med. Res.*, vol. 37, n° 5, p. 1528-1542, oct. 2009.
- [61] B. K. Sun, Z. Sipsrashvili, et P. A. Khavari, « Advances in skin grafting and treatment of cutaneous wounds », *Science*, vol. 346, n° 6212, p. 941-945, nov. 2014, doi: 10.1126/science.1253836.
- [62] P. Olczyk, Ł. Mencner, et K. Komosińska-Vassev, « The Role of the Extracellular Matrix Components in Cutaneous Wound Healing », *Biomed Res Int*, vol. 2014, 2014, doi: 10.1155/2014/747584.
- [63] M. Kurkinen, A. Vaheri, P. J. Roberts, et S. Stenman, « Sequential appearance of fibronectin and collagen in experimental granulation tissue », *Lab. Invest.*, vol. 43, n° 1, p. 47-51, juill. 1980.
- [64] C.-H. Heldin et B. Westermarck, « Role of platelet-derived growth factor in vivo », in *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair | Richard Clark | Springer*, 2nd éd., New York: Plenum Press: RAF Clark, 1996, p. 249-273.
- [65] M. B. Witte et A. Barbul, « General principles of wound healing », *Surg. Clin. North Am.*, vol. 77, n° 3, p. 509-528, juin 1997.
- [66] T. N. Demidova-Rice, M. R. Hamblin, et I. M. Herman, « Acute and Impaired Wound Healing: Pathophysiology and Current Methods for Drug Delivery, Part 1 », *Advances in Skin & Wound Care*, vol. 25, n° 7, p. 304-314, juill. 2012, doi: 10.1097/01.ASW.0000416006.55218.d0.
- [67] R. A. F. Clark et P. M. Henson, *The Molecular and cellular biology of wound repair*. New York: Plenum Press: Springer, 1996.

- [68] M. S. Agren et M. Werthén, « The extracellular matrix in wound healing: a closer look at therapeutics for chronic wounds », *Int J Low Extrem Wounds*, vol. 6, n° 2, p. 82-97, juin 2007, doi: 10.1177/1534734607301394.
- [69] S. Ricard-Blum et R. Salza, « Matricryptins and matrikines: biologically active fragments of the extracellular matrix », *Experimental Dermatology*, vol. 23, n° 7, p. 457-463, juill. 2014, doi: 10.1111/exd.12435.
- [70] P. Mallefet et A. C. Dweck, « Mechanisms involved in wound healing », *The Biomedical Scientist*, p. 609-615, juill. 2008.
- [71] M. C. Robson, D. L. Steed, et M. G. Franz, « Wound healing: biologic features and approaches to maximize healing trajectories », *Curr Probl Surg*, vol. 38, n° 2, p. 72-140, févr. 2001, doi: 10.1067/msg.2001.111167.
- [72] D. R. Yager et B. C. Nwomeh, « The proteolytic environment of chronic wounds », *Wound Repair and Regeneration*, vol. 7, n° 6, p. 433-441, nov. 1999, doi: 10.1046/j.1524-475X.1999.00433.x.
- [73] H. Ellis, « Wound Healing and Wound Infection: Theory and Surgical Practice Thomas K. Hunt. 234 × 155 mm. Pp. 303+x. Illustrated. 1980. Hemel Hempstead: Prentice Hall £12.30 », *Br J Surg*, vol. 68, n° 2, p. 142-142, févr. 1981, doi: 10.1002/bjs.1800680227.
- [74] R. A. Clark, J. M. Lanigan, P. DellaPelle, E. Manseau, H. F. Dvorak, et R. B. Colvin, « Fibronectin and fibrin provide a provisional matrix for epidermal cell migration during wound reepithelialization », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 79, n° 5, p. 264-269, nov. 1982.
- [75] B. P. Toole, « Proteoglycans and Hyaluronan in Morphogenesis and Differentiation », in *Cell Biology of Extracellular Matrix*, E. D. Hay, Éd. Springer US, 1991, p. 305-341.
- [76] R. A. Clark, L. D. Nielsen, M. P. Welch, et J. M. McPherson, « Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF-beta », *J. Cell. Sci.*, vol. 108 (Pt 3), p. 1251-1261, mars 1995.
- [77] A. Desmoulière, C. Chaponnier, et G. Gabbiani, « Tissue repair, contraction, and the myofibroblast », *Wound Repair and Regeneration*, vol. 13, n° 1, p. 7-12, janv. 2005, doi: 10.1111/j.1067-1927.2005.130102.x.
- [78] B. Hinz, « Formation and function of the myofibroblast during tissue repair », *J. Invest. Dermatol.*, vol. 127, n° 3, p. 526-537, mars 2007, doi: 10.1038/sj.jid.5700613.
- [79] F. Grinnell, « Fibroblast biology in three-dimensional collagen matrices », *Trends Cell Biol.*, vol. 13, n° 5, p. 264-269, mai 2003.
- [80] C. C. Yang, S. D. Lin, et H. S. Yu, « Effect of growth factors on dermal fibroblast contraction in normal skin and hypertrophic scar », *J. Dermatol. Sci.*, vol. 14, n° 2, p. 162-169, févr. 1997.
- [81] R. A. Clark, J. M. Folkvord, C. E. Hart, M. J. Murray, et J. M. McPherson, « Platelet isoforms of platelet-derived growth factor stimulate fibroblasts to contract collagen matrices. », *J Clin Invest*, vol. 84, n° 3, p. 1036-1040, sept. 1989.
- [82] R. D. Paladini, K. Takahashi, N. S. Bravo, et P. A. Coulombe, « Onset of re-epithelialization after skin injury correlates with a reorganization of keratin filaments in wound edge keratinocytes: defining a potential role for keratin 16 », *J. Cell Biol.*, vol. 132, n° 3, p. 381-397, févr. 1996.
- [83] B. K. Pilcher, J. A. Dumin, B. D. Sudbeck, S. M. Krane, H. G. Welgus, et W. C. Parks, « The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix », *J. Cell Biol.*, vol. 137, n° 6, p. 1445-1457, juin 1997.
- [84] T. H. Bugge, K. W. Kombrinck, M. J. Flick, C. C. Daugherty, M. J. Danton, et J. L. Degen, « Loss of fibrinogen rescues mice from the pleiotropic effects of plasminogen deficiency », *Cell*, vol. 87, n° 4, p. 709-719, nov. 1996.
- [85] P. Mignatti, D. Rifkin, H. Welbus, et Parks WC, « Proteases and tissue remodeling », in *The molecular and cellular biology of wound repair*, 2nd éd., New York: Plenum Press: RAF Clark, 1996, p. 427-474.
- [86] J. Madri, S. Sankar, et A. Romanic, « Angiogenesis », in *The Molecular and Cellular Biology of Wound Repair*, 2nd éd., New York: Plenum Press: RAF Clark, 1996, p. 355-371.

- [87] R. Humar, « Hypoxia enhances vascular cell proliferation and angiogenesis in vitro via rapamycin (mTOR) -dependent signaling », *The FASEB Journal*, vol. 16, n° 8, p. 771-780, juin 2002, doi: 10.1096/fj.01-0658com.
- [88] G. Henry et W. L. Garner, « Inflammatory mediators in wound healing », *Surg. Clin. North Am.*, vol. 83, n° 3, p. 483-507, juin 2003, doi: 10.1016/S0039-6109(02)00200-1.
- [89] A. Desmoulière, M. Redard, I. Darby, et G. Gabbiani, « Apoptosis mediates the decrease in cellularity during the transition between granulation tissue and scar. », *Am J Pathol*, vol. 146, n° 1, p. 56-66, janv. 1995.
- [90] N. K. Rai, K. Tripathi, D. Sharma, et V. K. Shukla, « Apoptosis: a basic physiologic process in wound healing », *Int J Low Extrem Wounds*, vol. 4, n° 3, p. 138-144, sept. 2005, doi: 10.1177/1534734605280018.
- [91] « Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds », *Wound Repair and Regeneration*, vol. 8, n° 5, p. 347-352, sept. 2000, doi: 10.1111/j.1524-475X.2000.00347.x.
- [92] G. S. Lazarus *et al.*, « Definitions and guidelines for assessment of wounds and evaluation of healing », *Arch Dermatol*, vol. 130, n° 4, p. 489-493, avr. 1994.
- [93] G. S. Schultz *et al.*, « Wound bed preparation: a systematic approach to wound management », *Wound Repair Regen*, vol. 11 Suppl 1, p. S1-28, mars 2003.
- [94] V. Falanga, « The chronic wound: impaired healing and solutions in the context of wound bed preparation », *Blood Cells, Molecules, and Diseases*, vol. 32, n° 1, p. 88-94, févr. 2004, doi: 10.1016/j.bcmd.2003.09.020.
- [95] K. F. Cutting, « Wound exudate: composition and functions », *British Journal of Community Nursing*, vol. 8, n° Sup3, p. S4-S9, sept. 2003, doi: 10.12968/bjcn.2003.8.Sup3.11577.
- [96] E. Öhnstedt, H. Lofton Tomenius, E. Vågesjö, et M. Phillipson, « The discovery and development of topical medicines for wound healing », *Expert Opinion on Drug Discovery*, vol. 14, n° 5, p. 485-497, mai 2019, doi: 10.1080/17460441.2019.1588879.
- [97] D. S. Frank, « Dietitians Online Blog: Pressure Ulcer Awareness - Pressure Injury Prevention Points and Nutrition Intervention », *Dietitians Online Blog*, nov. 21, 2019. <http://dietitians-online.blogspot.com/2016/11/pressure-ulcer-awareness-day-pressure.html> (consulté le avr. 21, 2020).
- [98] E. Farstvedt, T. S. Stashak, et A. Othic, « Update on topical wound medications », *Clinical Techniques in Equine Practice*, vol. 3, n° 2, p. 164-172, juin 2004, doi: 10.1053/j.ctep.2004.08.003.
- [99] K. Fan, J. Tang, J. Escandon, et R. S. Kirsner, « State of the Art in Topical Wound-Healing Products », *Plastic and Reconstructive Surgery*, vol. 127, p. 44S-59S, janv. 2011, doi: 10.1097/PRS.0b013e3181f8e275.
- [100] R. G. Sibbald *et al.*, « Preparing the wound bed--debridement, bacterial balance, and moisture balance », *Ostomy Wound Manage*, vol. 46, n° 11, p. 14-22, 24-28, 30-35; quiz 36-37, nov. 2000.
- [101] R. G. Frykberg et J. Banks, « Challenges in the Treatment of Chronic Wounds », *Adv Wound Care (New Rochelle)*, vol. 4, n° 9, p. 560-582, sept. 2015, doi: 10.1089/wound.2015.0635.
- [102] L. P. da Silva, R. L. Reis, V. M. Corrello, et A. P. Marques, « Hydrogel-Based Strategies to Advance Therapies for Chronic Skin Wounds », *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 21, n° 1, p. 145-169, 2019, doi: 10.1146/annurev-bioeng-060418-052422.
- [103] N. S. Greaves, S. A. Iqbal, M. Baguneid, et A. Bayat, « The role of skin substitutes in the management of chronic cutaneous wounds », *Wound Repair Regen*, vol. 21, n° 2, p. 194-210, avr. 2013, doi: 10.1111/wrr.12029.
- [104] R. Langer et J. P. Vacanti, « Tissue engineering », *Science*, vol. 260, n° 5110, p. 920-926, mai 1993.
- [105] « Biomaterials », *National institute of Biomedical Imaging and Bioengineering*. <https://www.nibib.nih.gov/science-education/science-topics/biomaterials> (consulté le avr. 16, 2020).

- [106] L. G. Donaruma, « Definitions in biomaterials, D. F. Williams, Ed., Elsevier, Amsterdam, 1987, 72 pp. », *J. Polym. Sci. C Polym. Lett.*, vol. 26, n° 9, p. 414-414, sept. 1988, doi: 10.1002/pol.1988.140260910.
- [107] C. P. Bergmann et A. Stumpf, « Biomaterials », in *Dental Ceramics*, Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013, p. 9-13.
- [108] Z. Zhang, O. Ortiz, R. Goyal, et J. Kohn, « Biodegradable Polymers », in *Principles of Tissue Engineering*, Elsevier, 2014, p. 441-473.
- [109] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, et J. E. Lemons, « Introduction - Biomaterials Science: An Evolving, Multidisciplinary Endeavor », in *Biomaterials Science (Third Edition)*, B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, et J. E. Lemons, Éd. Academic Press, 2013, p. xxv-xxxix.
- [110] N. A. Peppas, J. Z. Hilt, A. Khademhosseini, et R. Langer, « Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology », *Advanced Materials*, vol. 18, n° 11, p. 1345-1360, juin 2006, doi: 10.1002/adma.200501612.
- [111] Y. Luo *et al.*, « 3D Scaffolds », in *Principles of Tissue Engineering*, Elsevier, 2014, p. 475-494.
- [112] Q. L. Loh et C. Choong, « Three-Dimensional Scaffolds for Tissue Engineering Applications: Role of Porosity and Pore Size », *Tissue Eng Part B Rev*, vol. 19, n° 6, p. 485-502, déc. 2013, doi: 10.1089/ten.teb.2012.0437.
- [113] D. Mooney et R. Langer, « Engineering Biomaterials for Tissue Engineering: The 10–100 Micron Size Scale », in *The Biomedical Engineering Handbook*, J. Bronzino, Éd. CRC Press LLC, 2000.
- [114] B. Dhandayuthapani, Y. Yoshida, T. Maekawa, et D. S. Kumar, « Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review », *International Journal of Polymer Science*, vol. 2011, p. 1-19, 2011, doi: 10.1155/2011/290602.
- [115] M. W. Tibbitt et K. S. Anseth, « Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture », *Biotechnology and Bioengineering*, vol. 103, n° 4, p. 655-663, juill. 2009, doi: 10.1002/bit.22361.
- [116] F. J. O'Brien, « Biomaterials & scaffolds for tissue engineering », *Materials Today*, vol. 14, n° 3, p. 88-95, mars 2011, doi: 10.1016/S1369-7021(11)70058-X.
- [117] I. V. Yannas, E. Lee, D. P. Orgill, E. M. Skrabut, et G. F. Murphy, « Synthesis and characterization of a model extracellular matrix that induces partial regeneration of adult mammalian skin. », *Proc Natl Acad Sci U S A*, vol. 86, n° 3, p. 933-937, févr. 1989.
- [118] Tomlins et Paul, *Characterisation and Design of Tissue Scaffolds*, 1^{re} éd. Woodhead Publishing, 2016.
- [119] null Mikos, null McIntire, null Anderson, et null Babensee, « Host response to tissue engineered devices », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 33, n° 1-2, p. 111-139, août 1998.
- [120] D. F. Williams, « On the mechanisms of biocompatibility », *Biomaterials*, vol. 29, n° 20, p. 2941-2953, juill. 2008, doi: 10.1016/j.biomaterials.2008.04.023.
- [121] A. Bianchera, O. Catanzano, J. Boateng, et L. Elviri, « The Place of Biomaterials in Wound Healing », in *Therapeutic Dressings and Wound Healing Applications*, John Wiley & Sons, Ltd, 2020, p. 337-366.
- [122] E. S. Place, J. H. George, C. K. Williams, et M. M. Stevens, « Synthetic polymer scaffolds for tissue engineering », *Chem. Soc. Rev.*, vol. 38, n° 4, p. 1139-1151, mars 2009, doi: 10.1039/B811392K.
- [123] L. Bidault, « D'un matériau innovant vers un pansement actif et un substitut cutané », phdthesis, Université de Cergy Pontoise, 2012.
- [124] S. P. Zhong, Y. Z. Zhang, et C. T. Lim, « Tissue scaffolds for skin wound healing and dermal reconstruction », *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*, vol. 2, n° 5, p. 510-525, sept. 2010, doi: 10.1002/wnan.100.
- [125] P. B. Milan *et al.*, « Accelerated wound healing in a diabetic rat model using decellularized dermal matrix and human umbilical cord perivascular cells », *Acta Biomaterialia*, vol. 45, p. 234-246, nov. 2016, doi: 10.1016/j.actbio.2016.08.053.

- [126] T. Gilbert, T. Sellaro, et S. Badylak, « Decellularization of tissues and organs », *Biomaterials*, mars 2006, doi: 10.1016/j.biomaterials.2006.02.014.
- [127] A. Gaspar, L. Moldovan, D. Constantin, A. Stanciuc, P. Sarbu Boeti, et I. Efrimescu, « Collagen-based scaffolds for skin tissue engineering », *J Med Life*, vol. 4, n° 2, p. 172-177, mai 2011.
- [128] H.-J. Tseng, T.-L. Tsou, H.-J. Wang, et S. Hsu, « Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering: Characterization of chitosan-gelatin scaffolds for dermal tissue engineering », *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, vol. 7, n° 1, p. 20-31, janv. 2013, doi: 10.1002/term.492.
- [129] K. Murakami *et al.*, « Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings », *Biomaterials*, vol. 31, n° 1, p. 83-90, janv. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.031.
- [130] T. G. Sahana et P. D. Rekha, « Biopolymers: Applications in wound healing and skin tissue engineering », *Molecular Biology Reports*, vol. 45, n° 6, p. 2857-2867, déc. 2018, doi: 10.1007/s11033-018-4296-3.
- [131] J. F. Mano *et al.*, « Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends », *J R Soc Interface*, vol. 4, n° 17, p. 999-1030, déc. 2007, doi: 10.1098/rsif.2007.0220.
- [132] N. B. Shelke, R. James, C. T. Laurencin, et S. G. Kumbhar, « Polysaccharide biomaterials for drug delivery and regenerative engineering », *Polymers for Advanced Technologies*, vol. 25, n° 5, p. 448-460, 2014, doi: 10.1002/pat.3266.
- [133] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, et E. Schacht, « Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications: A Review », *Biomacromolecules*, vol. 12, n° 5, p. 1387-1408, mai 2011, doi: 10.1021/bm200083n.
- [134] S. Pina *et al.*, « Scaffolding Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine Applications », *Materials*, vol. 12, n° 11, p. 1824, juin 2019, doi: 10.3390/ma12111824.
- [135] E. S. Place, N. D. Evans, et M. M. Stevens, « Complexity in biomaterials for tissue engineering », *Nature Materials*, vol. 8, n° 6, p. 457-470, juin 2009, doi: 10.1038/nmat2441.
- [136] R. Z. Murray, Z. E. West, A. J. Cowin, et B. L. Farrugia, « Development and use of biomaterials as wound healing therapies », *Burns & Trauma*, vol. 7, p. s41038-018-0139-7, déc. 2019, doi: 10.1186/s41038-018-0139-7.
- [137] A. S. Hoffman, « Hydrogels for biomedical applications », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, n° 1, p. 3-12, janv. 2002, doi: 10.1016/S0169-409X(01)00239-3.
- [138] N. Kashyap, N. Kumar, et M. N. V. R. Kumar, « Hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications », *Crit Rev Ther Drug Carrier Syst*, vol. 22, n° 2, p. 107-149, 2005, doi: 10.1615/critrevtherdrugcarriersyst.v22.i2.10.
- [139] V. Jones, « Wound dressings », *BMJ*, vol. 332, n° 7544, p. 777-780, avr. 2006, doi: 10.1136/bmj.332.7544.777.
- [140] S. T. Tan et R. Dosan, « Lessons From Epithelialization: The Reason Behind Moist Wound Environment », *The Open Dermatology Journal*, vol. 13, n° 1, juill. 2019, doi: 10.2174/1874372201913010034.
- [141] J. P. E. Junker, R. A. Kamel, E. j. Catterson, et E. Eriksson, « Clinical Impact Upon Wound Healing and Inflammation in Moist, Wet, and Dry Environments », *Advances in Wound Care*, vol. 2, n° 7, p. 348-356, juill. 2013, doi: 10.1089/wound.2012.0412.
- [142] B. Gupta, R. Agarwal, et M. S. Alam, « Hydrogels for wound healing applications », in *Biomedical Hydrogels*, Elsevier, 2011, p. 184-227.
- [143] E. A. Kamoun, E.-R. S. Kenawy, et X. Chen, « A review on polymeric hydrogel membranes for wound dressing applications: PVA-based hydrogel dressings », *J Adv Res*, vol. 8, n° 3, p. 217-233, mai 2017, doi: 10.1016/j.jare.2017.01.005.
- [144] S. MacNeil, « Progress and opportunities for tissue-engineered skin », *Nature*, vol. 445, n° 7130, p. 874-880, févr. 2007, doi: 10.1038/nature05664.

- [145] F. X. Maquart et J. C. Monboisse, « Extracellular matrix and wound healing », *Pathol. Biol.*, vol. 62, n° 2, p. 91-95, avr. 2014, doi: 10.1016/j.patbio.2014.02.007.
- [146] C. Cam, S. Zhu, N. F. Truong, P. O. Scumpia, et T. Segura, « Systematic evaluation of natural scaffolds in cutaneous wound healing », *J Mater Chem B Mater Biol Med*, vol. 3, n° 40, p. 7986-7992, oct. 2015, doi: 10.1039/C5TB00807G.
- [147] M. D. Shoulders et R. T. Raines, « COLLAGEN STRUCTURE AND STABILITY », *Annu Rev Biochem*, vol. 78, p. 929-958, 2009, doi: 10.1146/annurev.biochem.77.032207.120833.
- [148] S. Chattopadhyay et R. T. Raines, « Collagen-Based Biomaterials for Wound Healing », *Biopolymers*, vol. 101, n° 8, p. 821-833, août 2014, doi: 10.1002/bip.22486.
- [149] E. J. Wood, « Skin wound healing », *Clinical Dermatology*, vol. 23, n° 3, p. 33-34, sept. 2007.
- [150] C. Helary *et al.*, « Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes », *Biomaterials*, vol. 31, n° 3, p. 481-490, janv. 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.09.073.
- [151] H.-J. Jang, Y.-M. Kim, B.-Y. Yoo, et Y.-K. Seo, « Wound-healing effects of human dermal components with gelatin dressing », *J Biomater Appl*, vol. 32, n° 6, p. 716-724, 2018, doi: 10.1177/0885328217741758.
- [152] C. Prost-Squarcioni et C. Le Roux-Villet, « La peau et ses annexes », in *Cicatrisation.info : le livre*, Cicatrisation.info, 2008.
- [153] B. Wang, W. Yang, J. McKittrick, et M. A. Meyers, « Keratin: Structure, mechanical properties, occurrence in biological organisms, and efforts at bioinspiration », *Progress in Materials Science*, vol. 76, p. 229-318, mars 2016, doi: 10.1016/j.pmatsci.2015.06.001.
- [154] H. Lee *et al.*, « Human hair keratin and its-based biomaterials for biomedical applications », *Tissue Eng Regen Med*, vol. 11, n° 4, p. 255-265, août 2014, doi: 10.1007/s13770-014-0029-4.
- [155] S. Balaji *et al.*, « Preparation and comparative characterization of keratin–chitosan and keratin–gelatin composite scaffolds for tissue engineering applications », *Materials Science and Engineering: C*, vol. 32, n° 4, p. 975-982, mai 2012, doi: 10.1016/j.msec.2012.02.023.
- [156] R. Kelly, « Keratins in wound healing », in *Wound Healing Biomaterials*, Elsevier, 2016, p. 353-365.
- [157] P. M. Pechter *et al.*, « Keratin dressings speed epithelialization of deep partial-thickness wounds », *Wound Repair Regen*, vol. 20, n° 2, p. 236-242, avr. 2012, doi: 10.1111/j.1524-475X.2012.00768.x.
- [158] L. Tang, J. O. Sierra, R. Kelly, R. S. Kirsner, et J. Li, « Wool-derived keratin stimulates human keratinocyte migration and types IV and VII collagen expression », *Exp. Dermatol.*, vol. 21, n° 6, p. 458-460, juin 2012, doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01505.x.
- [159] T. Aper, A. Schmidt, M. Duchrow, et H.-P. Bruch, « Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample », *Eur J Vasc Endovasc Surg*, vol. 33, n° 1, p. 33-39, janv. 2007, doi: 10.1016/j.ejvs.2006.08.008.
- [160] A. D. Metcalfe et M. W. J. Ferguson, « Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration », *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 4, n° 14, p. 413-437, juin 2007, doi: 10.1098/rsif.2006.0179.
- [161] P. Heher, S. Mühleder, R. Mittermayr, H. Redl, et P. Slezak, « Fibrin-based delivery strategies for acute and chronic wound healing », *Adv. Drug Deliv. Rev.*, vol. 129, p. 134-147, 2018, doi: 10.1016/j.addr.2017.12.007.
- [162] G. Thilagavathi et S. Viju, « 11 - Silk as a suture material », in *Advances in Silk Science and Technology*, A. Basu, Éd. Woodhead Publishing, 2015, p. 219-232.
- [163] C. Vepari et D. L. Kaplan, « Silk as a Biomaterial », *Prog Polym Sci*, vol. 32, n° 8-9, p. 991-1007, 2007, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2007.05.013.
- [164] A. C. Berardi, *Extracellular Matrix for Tissue Engineering and Biomaterials*. Springer, 2018.
- [165] B. Kundu *et al.*, « Silk proteins for biomedical applications: Bioengineering perspectives », *Progress in Polymer Science*, vol. 39, n° 2, p. 251-267, févr. 2014, doi: 10.1016/j.progpolymsci.2013.09.002.

- [166] D. Jao, X. Mou, et X. Hu, « Tissue Regeneration: A Silk Road », *J Funct Biomater*, vol. 7, n° 3, août 2016, doi: 10.3390/jfb7030022.
- [167] B.-M. Min, G. Lee, S. H. Kim, Y. S. Nam, T. S. Lee, et W. H. Park, « Electrospinning of silk fibroin nanofibers and its effect on the adhesion and spreading of normal human keratinocytes and fibroblasts in vitro », *Biomaterials*, vol. 25, n° 7-8, p. 1289-1297, avr. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.08.045.
- [168] R. E. Unger, K. Peters, M. Wolf, A. Motta, C. Migliaresi, et C. J. Kirkpatrick, « Endothelialization of a non-woven silk fibroin net for use in tissue engineering: growth and gene regulation of human endothelial cells », *Biomaterials*, vol. 25, n° 21, p. 5137-5146, sept. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.12.040.
- [169] A. Kirschning, N. Dibbert, et G. Dräger, « Chemical Functionalization of Polysaccharides-Towards Biocompatible Hydrogels for Biomedical Applications », *Chemistry*, vol. 24, n° 6, p. 1231-1240, janv. 2018, doi: 10.1002/chem.201701906.
- [170] L. Fu, J. Zhang, et G. Yang, « Present status and applications of bacterial cellulose-based materials for skin tissue repair », *Carbohydrate Polymers*, vol. 92, n° 2, p. 1432-1442, févr. 2013, doi: 10.1016/j.carbpol.2012.10.071.
- [171] P. Basu, U. Narendrakumar, R. Arunachalam, S. Devi, et I. Manjubala, « Characterization and Evaluation of Carboxymethyl Cellulose-Based Films for Healing of Full-Thickness Wounds in Normal and Diabetic Rats », *ACS Omega*, vol. 3, n° 10, p. 12622-12632, oct. 2018, doi: 10.1021/acsomega.8b02015.
- [172] T. W. Wong et N. A. Ramli, « Carboxymethylcellulose film for bacterial wound infection control and healing », *Carbohydrate Polymers*, vol. 112, p. 367-375, nov. 2014, doi: 10.1016/j.carbpol.2014.06.002.
- [173] M. Gupta et A. K. Gupta, « In vitro cytotoxicity studies of hydrogel pullulan nanoparticles prepared by AOT/N-hexane micellar system », *J Pharm Pharm Sci*, vol. 7, n° 1, p. 38-46, févr. 2004.
- [174] R. S. Singh, N. Kaur, V. Rana, et J. F. Kennedy, « Pullulan: A novel molecule for biomedical applications », *Carbohydrate Polymers*, vol. 171, p. 102-121, sept. 2017, doi: 10.1016/j.carbpol.2017.04.089.
- [175] R. S. Singh, N. Kaur, et J. F. Kennedy, « Pullulan and pullulan derivatives as promising biomolecules for drug and gene targeting », *Carbohydrate Polymers*, vol. 123, p. 190-207, juin 2015, doi: 10.1016/j.carbpol.2015.01.032.
- [176] S. Tabasum *et al.*, « A review on versatile applications of blends and composites of pullulan with natural and synthetic polymers », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 120, p. 603-632, déc. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.07.154.
- [177] P. Thangavel, S. P. Vilvanathan, I. Kuttalam, et S. Lonchin, « Topical administration of pullulan gel accelerates skin tissue regeneration by enhancing collagen synthesis and wound contraction in rats », *Int. J. Biol. Macromol.*, vol. 149, p. 395-403, avr. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.01.187.
- [178] G. Sun et J. J. Mao, « Engineering dextran-based scaffolds for drug delivery and tissue repair », *Nanomedicine (Lond)*, vol. 7, n° 11, p. 1771-1784, nov. 2012, doi: 10.2217/nnm.12.149.
- [179] M. H. Gil et I. Research Signpost (Trivandrum, *Carbohydrates applications in medicine*. 2014.
- [180] S. A. Varghese, S. M. Rangappa, S. Siengchin, et J. Parameswaranpillai, « Chapter 2 - Natural polymers and the hydrogels prepared from them », in *Hydrogels Based on Natural Polymers*, Y. Chen, Éd. Elsevier, 2020, p. 17-47.
- [181] N. M. Neves et R. L. Reis, *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*. John Wiley & Sons, 2016.
- [182] G. Sun *et al.*, « Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing », *PNAS*, vol. 108, n° 52, p. 20976-20981, déc. 2011, doi: 10.1073/pnas.1115973108.

- [183] F. Croisier et C. Jérôme, « Chitosan-based biomaterials for tissue engineering », *European Polymer Journal*, vol. 49, n° 4, p. 780-792, avr. 2013, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009.
- [184] O. S. Manoukian *et al.*, « Biomaterials for Tissue Engineering and Regenerative Medicine », in *Encyclopedia of Biomedical Engineering*, R. Narayan, Éd. Oxford: Elsevier, 2019, p. 462-482.
- [185] Y.-C. Chung et C.-Y. Chen, « Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan », *Bioresource Technology*, vol. 99, n° 8, p. 2806-2814, mai 2008, doi: 10.1016/j.biortech.2007.06.044.
- [186] B. G. Kozen, S. J. Kircher, J. Henao, F. S. Godinez, et A. S. Johnson, « An alternative hemostatic dressing: comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot », *Acad Emerg Med*, vol. 15, n° 1, p. 74-81, janv. 2008, doi: 10.1111/j.1553-2712.2007.00009.x.
- [187] D. Raafat, K. von Bargen, A. Haas, et H.-G. Sahl, « Insights into the Mode of Action of Chitosan as an Antibacterial Compound », *Appl Environ Microbiol*, vol. 74, n° 12, p. 3764-3773, juin 2008, doi: 10.1128/AEM.00453-08.
- [188] Y. Okamoto, R. Yano, K. Miyatake, I. Tomohiro, Y. Shigemasa, et S. Minami, « Effects of chitin and chitosan on blood coagulation », *Carbohydrate Polymers*, vol. 53, n° 3, p. 337-342, août 2003, doi: 10.1016/S0144-8617(03)00076-6.
- [189] S. Ahmed et S. Ikram, « Chitosan Based Scaffolds and Their Applications in Wound Healing », *Achievements in the Life Sciences*, vol. 10, n° 1, p. 27-37, juin 2016, doi: 10.1016/j.als.2016.04.001.
- [190] P. K. Dutta, J. Dutta, et V. S. Tripathi, « Chitin and chitosan: Chemistry, properties and applications », *JSIR Vol.63(01) [January 2004]*, janv. 2004, Consulté le: avr. 17, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <http://nopr.niscair.res.in/handle/123456789/5397>.
- [191] J. S. Boateng, K. H. Matthews, H. N. E. Stevens, et G. M. Eccleston, « Wound Healing Dressings and Drug Delivery Systems: A Review », *Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 97, n° 8, p. 2892-2923, août 2008, doi: 10.1002/jps.21210.
- [192] M. A. Fonder, G. S. Lazarus, D. A. Cowan, B. Aronson-Cook, A. R. Kohli, et A. J. Mamelak, « Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressings », *J. Am. Acad. Dermatol.*, vol. 58, n° 2, p. 185-206, févr. 2008, doi: 10.1016/j.jaad.2007.08.048.
- [193] V. Jones, J. E. Grey, et K. G. Harding, « Wound dressings », *BMJ*, vol. 332, n° 7544, p. 777-780, avr. 2006.
- [194] M. George et T. E. Abraham, « Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review », *J Control Release*, vol. 114, n° 1, p. 1-14, août 2006, doi: 10.1016/j.jconrel.2006.04.017.
- [195] M. Szekalska, A. Puciłowska, E. Szymańska, P. Ciosek, et K. Winnicka, « Alginate: Current Use and Future Perspectives in Pharmaceutical and Biomedical Applications », *International Journal of Polymer Science*, déc. 28, 2016. <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2016/7697031/> (consulté le juin 11, 2020).
- [196] K. Y. Lee et D. J. Mooney, « Hydrogels for Tissue Engineering », *Chemical Reviews*, vol. 101, n° 7, p. 1869-1880, juill. 2001, doi: 10.1021/cr000108x.
- [197] J. E. Rayahin, J. S. Buhrman, Y. Zhang, T. J. Koh, et R. A. Gemeinhart, « High and low molecular weight hyaluronic acid differentially influence macrophage activation », *ACS Biomater Sci Eng*, vol. 1, n° 7, p. 481-493, juill. 2015, doi: 10.1021/acsbomaterials.5b00181.
- [198] J. H. Park, E. J. Park, et H. S. Yi, « Wound Healing and Anti-inflammatory Effects of Topical Hyaluronic Acid Injection in Surgical-Site Infection Caused by Staphylococcus aureus », *Int J Low Extrem Wounds*, vol. 16, n° 3, p. 202-207, sept. 2017, doi: 10.1177/1534734617714142.
- [199] P. Pirnazar, L. Wolinsky, S. Nachnani, S. Haake, A. Pilloni, et G. W. Bernard, « Bacteriostatic effects of hyaluronic acid », *J. Periodontol.*, vol. 70, n° 4, p. 370-374, avr. 1999, doi: 10.1902/jop.1999.70.4.370.
- [200] F. Zhang, Z. Zhang, et R. J. Linhardt, « Chapter 3 - Glycosaminoglycans », in *Handbook of Glycomics*, R. D. Cummings et J. M. Pierce, Éd. San Diego: Academic Press, 2010, p. 59-80.

- [201] J. Melrose, « Glycosaminoglycans in Wound Healing », *Bone Tissue Regen Insights*, vol. 7, p. BTRI.S38670, janv. 2016, doi: 10.4137/BTRI.S38670.
- [202] S. E. L. Vidal, K. A. Tamamoto, H. Nguyen, R. D. Abbott, D. M. Cairns, et D. L. Kaplan, « 3D biomaterial matrix to support long term, full thickness, immuno-competent human skin equivalents with nervous system components », *Biomaterials*, vol. 198, p. 194-203, 2019, doi: 10.1016/j.biomaterials.2018.04.044.
- [203] P. Aramwit, « Introduction to biomaterials for wound healing », in *Wound Healing Biomaterials*, Elsevier, 2016, p. 3-38.
- [204] U. Hersel, C. Dahmen, et H. Kessler, « RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond », *Biomaterials*, vol. 24, n° 24, p. 4385-4415, nov. 2003, doi: 10.1016/s0142-9612(03)00343-0.
- [205] M. P. Lutolf *et al.*, « Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics », *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, vol. 100, n° 9, p. 5413-5418, avr. 2003, doi: 10.1073/pnas.0737381100.
- [206] N. A. Peppas, Y. Huang, M. Torres-Lugo, J. H. Ward, et J. Zhang, « Physicochemical foundations and structural design of hydrogels in medicine and biology », *Annu Rev Biomed Eng*, vol. 2, p. 9-29, 2000, doi: 10.1146/annurev.bioeng.2.1.9.
- [207] V. C. van der Veen, M. B. A. van der Wal, M. C. E. van Leeuwen, M. M. W. Ulrich, et E. Middelkoop, « Biological background of dermal substitutes », *Burns*, vol. 36, n° 3, p. 305-321, mai 2010, doi: 10.1016/j.burns.2009.07.012.
- [208] H. J. C. de Vries, E. Middelkoop, J. R. Mekkes, R. P. Dutrieux, C. H. R. Wildevuur, et W. Westerhof, « Dermal regeneration in native non-cross-linked collagen sponges with different extracellular matrix molecules », *Wound Repair Regen*, vol. 2, n° 1, p. 37-47, janv. 1994, doi: 10.1046/j.1524-475X.1994.20107.x.
- [209] F. Berthod, D. Hayek, O. Damour, et C. Collombel, « Collagen synthesis by fibroblasts cultured within a collagen sponge », *Biomaterials*, vol. 14, n° 10, p. 749-754, août 1993, doi: 10.1016/0142-9612(93)90039-5.
- [210] T. Canal et N. A. Peppas, « Correlation between mesh size and equilibrium degree of swelling of polymeric networks », *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 23, n° 10, p. 1183-1193, 1989, doi: 10.1002/jbm.820231007.
- [211] J. Maitra et V. K. Shukla, « Cross-linking in Hydrogels - A Review », *American Journal of Polymer Science*, vol. 4, n° 2, p. 25-31, 2014.
- [212] I. M. El-Sherbiny et M. H. Yacoub, « Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges », *Global Cardiology Science and Practice*, vol. 2013, n° 3, p. 38, sept. 2013, doi: 10.5339/gcsp.2013.38.
- [213] B. Ma, X. Wang, C. Wu, et J. Chang, « Crosslinking strategies for preparation of extracellular matrix-derived cardiovascular scaffolds », *Regen Biomater*, vol. 1, n° 1, p. 81-89, nov. 2014, doi: 10.1093/rb/rbu009.
- [214] A. Bejenariu, M. Popa, V. Dulong, L. Picton, et D. Le Cerf, « Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behaviour », *Polymer Bulletin*, vol. 62, n° 4, p. 525-538, avr. 2009, doi: 10.1007/s00289-008-0033-8.
- [215] W. E. Hennink et C. F. van Nostrum, « Novel crosslinking methods to design hydrogels », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 54, n° 1, p. 13-36, janv. 2002, doi: 10.1016/S0169-409X(01)00240-X.
- [216] W. Hu, Z. Wang, Y. Xiao, S. Zhang, et J. Wang, « Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels », *Biomater. Sci.*, vol. 7, n° 3, p. 843-855, févr. 2019, doi: 10.1039/C8BM01246F.
- [217] S. Mane, S. Ponrathnam, et N. Chavan, « Effect of Chemical Crosslinking on Properties of Polymer Microbeads: A Review », *Canadian Chemical Transactions*, p. 473-485, janv. 2016, doi: 10.13179/canchemtrans.2015.03.04.0245.
- [218] N. Ranganathan, R. Joseph Bensingh, M. Abdul Kader, et S. K. Nayak, « Synthesis and Properties of Hydrogels Prepared by Various Polymerization Reaction Systems », in *Cellulose-Based*

- Superabsorbent Hydrogels*, Md. I. H. Mondal, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2018, p. 1-25.
- [219] M. Silindir et Y. Ozer, « The effect of radiation on a variety of pharmaceuticals and materials containing polymers », *PDA J Pharm Sci Technol*, vol. 66, n° 2, p. 184-199, avr. 2012, doi: 10.5731/pdajpst.2012.00774.
- [220] N. Gull, S. M. Khan, A. Islam, M. T. Z. Butt, et T. Jamil, « Chapter 3 - Modification of Polyaniline », in *Polyaniline Blends, Composites, and Nanocomposites*, P. M. Visakh, C. D. Pina, et E. Falletta, Éd. Elsevier, 2018, p. 61-93.
- [221] S. Rouif, « Radiation cross-linked polymers: Recent developments and new applications », *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, vol. 236, n° 1, p. 68-72, juill. 2005, doi: 10.1016/j.nimb.2005.03.252.
- [222] V. Markovic, « Radiation sources, shielding and safety », *Radiation Physics and Chemistry*, vol. 18, n° 1-2, p. 27-41, 1981.
- [223] M. K. McHale, L. A. Setton, et A. Chilkoti, « Synthesis and in Vitro Evaluation of Enzymatically Cross-Linked Elastin-Like Polypeptide Gels for Cartilaginous Tissue Repair », *Tissue Engineering*, vol. 11, n° 11-12, p. 1768-1779, nov. 2005, doi: 10.1089/ten.2005.11.1768.
- [224] O. Okay, « Self-Healing Hydrogels Formed via Hydrophobic Interactions », in *Supramolecular Polymer Networks and Gels*, vol. 268, S. Seiffert, Éd. Cham: Springer International Publishing, 2015, p. 101-142.
- [225] C. M. Hassan et N. A. Peppas, « Structure and Morphology of Freeze/Thawed PVA Hydrogels », *Macromolecules*, vol. 33, n° 7, p. 2472-2479, avr. 2000, doi: 10.1021/ma9907587.
- [226] S. Yang, K. F. Leong, Z. Du, et C. K. Chua, « The design of scaffolds for use in tissue engineering. Part I. Traditional factors », *Tissue Eng.*, vol. 7, n° 6, p. 679-689, déc. 2001, doi: 10.1089/107632701753337645.
- [227] M. Ferrari, Éd., *BioMEMS and biomedical nanotechnology*. New York: Springer, 2006.
- [228] E. M. Prieto et S. A. Guelcher, « 5 - Tailoring properties of polymeric biomedical foams », in *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*, P. A. Netti, Éd. Woodhead Publishing, 2014, p. 129-162.
- [229] Y.-Y. Hsu, J. D. Gresser, D. J. Trantolo, C. M. Lyons, P. R. J. Gangadharam, et D. L. Wise, « Effect of polymer foam morphology and density on kinetics of in vitro controlled release of isoniazid from compressed foam matrices », *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 35, n° 1, p. 107-116, avr. 1997, doi: 10.1002/(SICI)1097-4636(199704)35:1<107::AID-JBM11>3.0.CO;2-G.
- [230] T. Lu, Y. Li, et T. Chen, « Techniques for fabrication and construction of three-dimensional scaffolds for tissue engineering », *Int J Nanomedicine*, vol. 8, p. 337-350, 2013, doi: 10.2147/IJN.S38635.
- [231] S. Badylak, D. Freytes, et T. Gilbert, « Extracellular matrix as a biological scaffold material: Structure and function », *Acta Biomaterialia*, vol. 5, n° 1, p. 1-13, janv. 2009, doi: 10.1016/j.actbio.2008.09.013.
- [232] B. Subia, J. Kundu, et S. C., « Biomaterial Scaffold Fabrication Techniques for Potential Tissue Engineering Applications », in *Tissue Engineering*, D. Eberli, Éd. InTech, 2010.
- [233] L. Corté, « Principles in tissue engineering », présenté à Materials and processing methods for TE scaffolds, nov. 2015, Consulté le: oct. 20, 2016. [En ligne].
- [234] W. Zhao *et al.*, « Photo-responsive supramolecular hyaluronic acid hydrogels for accelerated wound healing », *Journal of Controlled Release*, vol. 323, p. 24-35, juill. 2020, doi: 10.1016/j.jconrel.2020.04.014.
- [235] J. Navarro *et al.*, « In Vivo Evaluation of Three-Dimensional Printed, Keratin-Based Hydrogels in a Porcine Thermal Burn Model », *Tissue Engineering Part A*, vol. 26, n° 5-6, p. 265-278, mars 2020, doi: 10.1089/ten.tea.2019.0181.
- [236] Y.-C. Chen, H.-O. Ho, D.-Z. Liu, W.-S. Siow, et M.-T. Sheu, « Swelling/Floating Capability and Drug Release Characterizations of Gastroretentive Drug Delivery System Based on a

- Combination of Hydroxyethyl Cellulose and Sodium Carboxymethyl Cellulose », *PLoS One*, vol. 10, n° 1, janv. 2015, doi: 10.1371/journal.pone.0116914.
- [237] S. B. Lee, Y. H. Kim, M. S. Chong, S. H. Hong, et Y. M. Lee, « Study of gelatin-containing artificial skin V: fabrication of gelatin scaffolds using a salt-leaching method », *Biomaterials*, vol. 26, n° 14, p. 1961-1968, mai 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2004.06.032.
- [238] W. Yang *et al.*, « Preparation and characterisation of a novel silk fibroin/hyaluronic acid/sodium alginate scaffold for skin repair », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 130, p. 58-67, juin 2019, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2019.02.120.
- [239] W. Wang *et al.*, « Cross-linked Collagen–Chondroitin Sulfate–Hyaluronic Acid Imitating Extracellular Matrix as Scaffold for Dermal Tissue Engineering », *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 16, n° 2, p. 269-279, juin 2009, doi: 10.1089/ten.tec.2009.0161.
- [240] C. Kilic Bektas, I. Kimiz, A. Sendemir, V. Hasirci, et N. Hasirci, « A bilayer scaffold prepared from collagen and carboxymethyl cellulose for skin tissue engineering applications », *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 29, n° 14, p. 1764-1784, sept. 2018, doi: 10.1080/09205063.2018.1498718.
- [241] P. Allen, J. Melero-Martin, et J. Bischoff, « Type I collagen, fibrin and PuraMatrix matrices provide permissive environments for human endothelial and mesenchymal progenitor cells to form neovascular networks », *J Tissue Eng Regen Med*, vol. 5, n° 4, p. e74-e86, avr. 2011, doi: 10.1002/term.389.
- [242] Q. Zhu *et al.*, « Enhanced healing activity of burn wound infection by a dextran-HA hydrogel enriched with sanguinarine », *Biomater. Sci.*, vol. 6, n° 9, p. 2472-2486, 2018, doi: 10.1039/C8BM00478A.
- [243] Y. Duan *et al.*, « Preparation and evaluation of curcumin grafted hyaluronic acid modified pullulan polymers as a functional wound dressing material », *Carbohydrate Polymers*, vol. 238, p. 116195, juin 2020, doi: 10.1016/j.carbpol.2020.116195.
- [244] V. W. Wong *et al.*, « Engineered Pullulan–Collagen Composite Dermal Hydrogels Improve Early Cutaneous Wound Healing », *Tissue Engineering Part A*, vol. 17, n° 5-6, p. 631-644, mars 2011, doi: 10.1089/ten.tea.2010.0298.
- [245] S. Khan *et al.*, « Preparation and structural characterization of surface modified microporous bacterial cellulose scaffolds: A potential material for skin regeneration applications in vitro and in vivo », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 117, p. 1200-1210, oct. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.044.
- [246] N. Zhang *et al.*, « Modulating cationicity of chitosan hydrogel to prevent hypertrophic scar formation during wound healing », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 154, p. 835-843, juill. 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.03.161.
- [247] M. P. Batista, V. S. S. Gonçalves, F. B. Gaspar, I. D. Nogueira, A. A. Matias, et P. Gurikov, « Novel alginate-chitosan aerogel fibres for potential wound healing applications », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 156, p. 773-782, août 2020, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.04.089.
- [248] G. Sandri *et al.*, « Chitosan/glycosaminoglycan scaffolds for skin reparation », *Carbohydrate Polymers*, vol. 220, p. 219-227, sept. 2019, doi: 10.1016/j.carbpol.2019.05.069.
- [249] A. Rahmanian-Schwarz *et al.*, « In vivo biocompatibility and biodegradation of a novel thin and mechanically stable collagen scaffold: Biocompatibility and Biodegradation of a Mechanically Stable Collagen Scaffold », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 102, n° 4, p. 1173-1179, avr. 2014, doi: 10.1002/jbm.a.34793.
- [250] D. Chouhan, N. Thatikonda, L. Nilebäck, M. Widhe, M. Hedhammar, et B. B. Mandal, « Recombinant Spider Silk Functionalized Silkworm Silk Matrices as Potential Bioactive Wound Dressings and Skin Grafts », *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, n° 28, p. 23560-23572, juill. 2018, doi: 10.1021/acsami.8b05853.

- [251] N. Bhardwaj, W. T. Sow, D. Devi, K. W. Ng, B. B. Mandal, et N.-J. Cho, « Silk fibroin–keratin based 3D scaffolds as a dermal substitute for skin tissue engineering », *Integr. Biol.*, vol. 7, n° 1, p. 53-63, 2015, doi: 10.1039/C4IB00208C.
- [252] J. Li et D. J. Mooney, « Designing hydrogels for controlled drug delivery », *Nature Reviews Materials*, vol. 1, n° 12, déc. 2016, doi: 10.1038/natrevmats.2016.71.
- [253] M. Lavergne, M. Derkaoui, C. Delmau, D. Letourneur, G. Uzan, et C. Le Visage, « Porous Polysaccharide-Based Scaffolds for Human Endothelial Progenitor Cells », *Macromolecular Bioscience*, vol. 12, n° 7, p. 901-910, juill. 2012, doi: 10.1002/mabi.201100431.
- [254] A. San Juan *et al.*, « Tubular cationized pullulan hydrogels as local reservoirs for plasmid DNA », *J Biomed Mater Res A*, vol. 83, n° 3, p. 819-827, déc. 2007, doi: 10.1002/jbm.a.31413.
- [255] F. Piraino et Š. Selimović, « A Current View of Functional Biomaterials for Wound Care, Molecular and Cellular Therapies », *BioMed Research International*, vol. 2015, p. 1-10, 2015, doi: 10.1155/2015/403801.
- [256] B. L. Farrugia, M. S. Lord, J. Melrose, et J. M. Whitelock, « The Role of Heparan Sulfate in Inflammation, and the Development of Biomimetics as Anti-Inflammatory Strategies », *J. Histochem. Cytochem.*, vol. 66, n° 4, p. 321-336, 2018, doi: 10.1369/0022155417740881.
- [257] K. Obara *et al.*, « Acceleration of wound healing in healing-impaired db/db mice with a photocrosslinkable chitosan hydrogel containing fibroblast growth factor-2 », *Wound Repair Regen*, vol. 13, n° 4, p. 390-397, août 2005, doi: 10.1111/j.1067-1927.2005.130406.x.
- [258] H. Babavalian, H. Tebyanian, A. M. Latifi, M. A. Shokrgozar, S. Bonakdar, et F. Shakeri, « The effect of synthetic alginate sulfate hydrogels with recombinant PDGF-BB on Wound healing », *Bratisl Lek Listy*, vol. 119, n° 6, p. 391-396, 2018, doi: 10.4149/BLL_2018_072.
- [259] R. Mateen et T. Hoare, « Injectable, in situ gelling, cyclodextrin–dextran hydrogels for the partitioning-driven release of hydrophobic drugs », *J. Mater. Chem. B*, vol. 2, n° 32, p. 5157-5167, juill. 2014, doi: 10.1039/C4TB00631C.
- [260] T. R. Thatiparti, A. J. Shoffstall, et H. A. von Recum, « Cyclodextrin-based device coatings for affinity-based release of antibiotics », *Biomaterials*, vol. 31, n° 8, p. 2335-2347, mars 2010, doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.11.087.
- [261] D. Y. Arifin, L. Y. Lee, et C.-H. Wang, « Mathematical modeling and simulation of drug release from microspheres: Implications to drug delivery systems », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, n° 12-13, p. 1274-1325, nov. 2006, doi: 10.1016/j.addr.2006.09.007.
- [262] C.-C. Lin et A. T. Metters, « Hydrogels in controlled release formulations: Network design and mathematical modeling », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 58, n° 12-13, p. 1379-1408, nov. 2006, doi: 10.1016/j.addr.2006.09.004.
- [263] M. L. Bruschi, Éd., « 5 - Mathematical models of drug release », in *Strategies to Modify the Drug Release from Pharmaceutical Systems*, Woodhead Publishing, 2015, p. 63-86.
- [264] F. Berthiaume, T. J. Maguire, et M. L. Yarmush, « Tissue Engineering and Regenerative Medicine: History, Progress, and Challenges », *Annual Review of Chemical and Biomolecular Engineering*, vol. 2, n° 1, p. 403-430, juill. 2011, doi: 10.1146/annurev-chembioeng-061010-114257.
- [265] J. T. Shores, A. Gabriel, et S. Gupta, « Skin Substitutes and Alternatives: A Review », *Advances in Skin & Wound Care*, vol. 20, n° 9, p. 493-508, sept. 2007, doi: 10.1097/01.ASW.0000288217.83128.f3.
- [266] R. P. Lanza, R. S. Langer, et J. Vacanti, Éd., *Principles of tissue engineering*, Fourth edition. Amsterdam: Academic Press, an imprint of Elsevier, 2014.
- [267] R. V. Shevchenko, S. L. James, et S. E. James, « A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction », *Journal of The Royal Society Interface*, vol. 7, n° 43, p. 229-258, févr. 2010, doi: 10.1098/rsif.2009.0403.
- [268] K. Vig *et al.*, « Advances in Skin Regeneration Using Tissue Engineering », *International Journal of Molecular Sciences*, vol. 18, n° 4, p. 789, avr. 2017, doi: 10.3390/ijms18040789.

- [269] S. Ud-Din et A. Bayat, « Non-animal models of wound healing in cutaneous repair: In silico, in vitro, ex vivo, and in vivo models of wounds and scars in human skin: Models of wound repair in human skin », *Wound Repair and Regeneration*, vol. 25, n° 2, p. 164-176, avr. 2017, doi: 10.1111/wrr.12513.
- [270] ISO 10993-6:2016, « Évaluation biologique des dispositifs médicaux — Partie 6: Essais concernant les effets locaux après implantation ». <https://www.iso.org/obp/ui/#iso:std:iso:10993:-6:ed-3:v1:fr> (consulté le avr. 20, 2020).
- [271] G. Ignacio, I. El-Amin, et V. Mendenhall, « Animal Models for Wound Healing », in *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier, 2016, p. 387-400.
- [272] K. G. Cornwell, A. Landsman, et K. S. James, « Extracellular Matrix Biomaterials for Soft Tissue Repair », *Clinics in Podiatric Medicine and Surgery*, vol. 26, n° 4, p. 507-523, oct. 2009, doi: 10.1016/j.cpm.2009.08.001.
- [273] T. P. Sullivan, W. H. Eaglstein, S. C. Davis, et P. Mertz, « The pig as a model for human wound healing », *Wound Repair Regen*, vol. 9, n° 2, p. 66-76, avr. 2001, doi: 10.1046/j.1524-475x.2001.00066.x.
- [274] L. Cardoso, M. C. Cleto, M. L. P. Barbo, A. R. Esposito, F. S. Orgaes, et E. A. de R. Duek, « Bioresorbable scaffold as a dermal substitute », *Int J Burns Trauma*, vol. 7, n° 4, p. 34-46, juill. 2017.
- [275] M. Aragona *et al.*, « Defining stem cell dynamics and migration during wound healing in mouse skin epidermis », *Nature Communications*, vol. 8, n° 1, avr. 2017, doi: 10.1038/ncomms14684.
- [276] D. Archana, J. Dutta, et P. K. Dutta, « Evaluation of chitosan nano dressing for wound healing: Characterization, in vitro and in vivo studies », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 57, p. 193-203, juin 2013, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2013.03.002.
- [277] H. Trøstrup, K. Thomsen, H. Calum, N. Hoiby, et C. Moser, « Animal models of chronic wound care: the application of biofilms in clinical research », *Chronic Wound Care Management and Research*, vol. Volume 3, p. 123-132, nov. 2016, doi: 10.2147/CWCMR.S84361.
- [278] W. J. Lindblad, « Considerations for selecting the correct animal model for dermal wound-healing studies », *J Biomater Sci Polym Ed*, vol. 19, n° 8, p. 1087-1096, 2008, doi: 10.1163/156856208784909390.
- [279] D. M. Ansell, K. A. Holden, et M. J. Hardman, « Animal models of wound repair: Are they cutting it? », *Experimental Dermatology*, vol. 21, n° 8, p. 581-585, août 2012, doi: 10.1111/j.1600-0625.2012.01540.x.
- [280] S. Giri *et al.*, « Skin regeneration in deep second-degree scald injuries either by infusion pumping or topical application of recombinant human erythropoietin gel », *Drug Design, Development and Therapy*, p. 2565, mai 2015, doi: 10.2147/DDDT.S79425.
- [281] R. F. El-Kased, R. I. Amer, D. Attia, et M. M. Elmazar, « Honey-based hydrogel: In vitro and comparative In vivo evaluation for burn wound healing », *Scientific Reports*, vol. 7, n° 1, p. 1-11, août 2017, doi: 10.1038/s41598-017-08771-8.
- [282] S.-J. Chang, D. Sartika, G.-Y. Fan, J.-H. Cherng, et Y.-W. Wang, « Animal Models of Burn Wound Management », *Animal Models in Medicine and Biology*, sept. 2019, doi: 10.5772/intechopen.89188.
- [283] B. J. Dunn *et al.*, « Hydrofluoric acid dermal burns. An assessment of treatment efficacy using an experimental pig model », *J Occup Med*, vol. 34, n° 9, p. 902-909, sept. 1992.
- [284] Y.-H. Lee, J.-J. Chang, M.-C. Yang, C.-T. Chien, et W.-F. Lai, « Acceleration of wound healing in diabetic rats by layered hydrogel dressing », *Carbohydrate Polymers*, vol. 88, n° 3, p. 809-819, avr. 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.12.045.
- [285] G. Fila *et al.*, « Murine Model Imitating Chronic Wound Infections for Evaluation of Antimicrobial Photodynamic Therapy Efficacy », *Frontiers in Microbiology*, vol. 7, août 2016, doi: 10.3389/fmicb.2016.01258.

- [286] K.-Y. Cheng *et al.*, « Wound Healing in Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Using Atmospheric-Pressure Argon Plasma Jet », *Scientific Reports*, vol. 8, n° 1, déc. 2018, doi: 10.1038/s41598-018-30597-1.
- [287] M. Birch, A. Tomlinson, et M. W. J. Ferguson, « Animal Models for Adult Dermal Wound Healing », in *Fibrosis Research: Methods and Protocols*, J. Varga, D. A. Brenner, et S. H. Phan, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 2005, p. 223-235.
- [288] A. Ehterami *et al.*, « In vitro and in vivo study of PCL/COLL wound dressing loaded with insulin-chitosan nanoparticles on cutaneous wound healing in rats model », *International Journal of Biological Macromolecules*, vol. 117, p. 601-609, oct. 2018, doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.184.
- [289] J. H. Sung *et al.*, « Gel characterisation and in vivo evaluation of minocycline-loaded wound dressing with enhanced wound healing using polyvinyl alcohol and chitosan », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 392, n° 1-2, p. 232-240, juin 2010, doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.03.024.
- [290] X. Huang, Y. Zhang, X. Zhang, L. Xu, X. Chen, et S. Wei, « Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing », *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, n° 8, p. 4816-4824, déc. 2013, doi: 10.1016/j.msec.2013.07.044.
- [291] M. Biondi, F. Ungaro, F. Quaglia, et P. A. Netti, « Controlled drug delivery in tissue engineering », *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 60, n° 2, p. 229-242, janv. 2008, doi: 10.1016/j.addr.2007.08.038.
- [292] J. L. Drury et D. J. Mooney, « Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications », *Biomaterials*, vol. 24, n° 24, p. 4337-4351, nov. 2003, doi: 10.1016/S0142-9612(03)00340-5.
- [293] A. Autissier, C. L. Visage, C. Pouzet, F. Chaubet, et D. Letourneur, « Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process », *Acta Biomaterialia*, vol. 6, n° 9, p. 3640-3648, sept. 2010, doi: 10.1016/j.actbio.2010.03.004.
- [294] C. Le Visage *et al.*, « Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection », *Tissue Eng Part A*, vol. 18, n° 1-2, p. 35-44, janv. 2012, doi: 10.1089/ten.TEA.2011.0053.
- [295] J. C. Fricain *et al.*, « A nano-hydroxyapatite – Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering », *Biomaterials*, vol. 34, n° 12, p. 2947-2959, avr. 2013, doi: 10.1016/j.biomaterials.2013.01.049.
- [296] A. Abed *et al.*, « Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 96A, n° 3, p. 535-542, mars 2011, doi: 10.1002/jbm.a.33007.
- [297] C. Chauvierre *et al.*, « Pharmaceutical Development and Safety Evaluation of a GMP-Grade Fucoidan for Molecular Diagnosis of Cardiovascular Diseases », *Marine Drugs*, vol. 17, n° 12, p. 699, déc. 2019, doi: 10.3390/md17120699.
- [298] Michel. DuBois, K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, et Fred. Smith, « Colorimetric Method for Determination of Sugars and Related Substances », *Analytical Chemistry*, vol. 28, n° 3, p. 350-356, mars 1956, doi: 10.1021/ac60111a017.
- [299] C. Le Visage et D. Letourneur, « Method for Preparing Porous Scaffold for Tissue Engineering, Cell Culture and Cell Delivery », WO/2009/047346, avr. 17, 2009.
- [300] S. Lack, V. Dulong, L. Picton, D. L. Cerf, et E. Condamine, « High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism », *Carbohydrate Research*, vol. 342, n° 7, p. 943-953, mai 2007, doi: 10.1016/j.carres.2007.01.011.
- [301] J. Zhu et R. E. Marchant, « Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds », *Expert Rev Med Devices*, vol. 8, n° 5, p. 607-626, sept. 2011, doi: 10.1586/erd.11.27.

- [302] B. Vogel, H. Siebert, U. Hofmann, et S. Frantz, « Determination of collagen content within picrosirius red stained paraffin-embedded tissue sections using fluorescence microscopy », *MethodsX*, vol. 2, p. 124-134, 2015, doi: 10.1016/j.mex.2015.02.007.
- [303] M.-C. Schanne-Klein et M. Strupler, « Génération de second harmonique optique par le collagène fibrillaire », *Images de la Physique*, p. 81, 2007.
- [304] K. Benson, S. Cramer, et H.-J. Galla, « Impedance-based cell monitoring: barrier properties and beyond », *Fluids and Barriers of the CNS*, vol. 10, n° 1, p. 5, janv. 2013, doi: 10.1186/2045-8118-10-5.
- [305] B. Srinivasan, A. R. Kolli, M. B. Esch, H. E. Abaci, M. L. Shuler, et J. J. Hickman, « TEER Measurement Techniques for In Vitro Barrier Model Systems », *J Lab Autom.*, vol. 20, n° 2, p. 107-126, avr. 2015, doi: 10.1177/2211068214561025.
- [306] J. Hou, « Chapter 3 - Paracellular Channel Recording », in *The Paracellular Channel*, J. Hou, Éd. Academic Press, 2019, p. 29-49.
- [307] D. J. Davies, J. R. Heylings, H. Gayes, T. J. McCarthy, et M. C. Mack, « Further development of an in vitro model for studying the penetration of chemicals through compromised skin », *Toxicology in Vitro*, vol. 38, p. 101-107, févr. 2017, doi: 10.1016/j.tiv.2016.10.004.
- [308] A. I. Stavrakis *et al.*, « Combination prophylactic therapy with rifampin increases efficacy against an experimental Staphylococcus epidermidis subcutaneous implant-related infection », *Antimicrob. Agents Chemother.*, vol. 58, n° 4, p. 2377-2386, 2014, doi: 10.1128/AAC.01943-13.
- [309] L. Dunn, H. C. G. Prosser, J. T. M. Tan, L. Z. Vanags, M. K. C. Ng, et C. A. Bursill, « Murine Model of Wound Healing », *JoVE*, n° 75, p. 50265, mai 2013, doi: 10.3791/50265.
- [310] A. Autissier, D. Letourneur, et C. Le Visage, « Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture », *J Biomed Mater Res A*, vol. 82, n° 2, p. 336-342, août 2007, doi: 10.1002/jbm.a.30998.
- [311] V. Dulong, R. Forbice, E. Condamine, D. Le Cerf, et L. Picton, « Pullulan–STMP hydrogels: a way to correlate crosslinking mechanism, structure and physicochemical properties », *Polym. Bull.*, vol. 67, n° 3, p. 455-466, juill. 2011, doi: 10.1007/s00289-010-0435-2.
- [312] V. Dulong, S. Lack, D. Le Cerf, L. Picton, J. P. Vannier, et G. Muller, « Hyaluronan-based hydrogels particles prepared by crosslinking with trisodium trimetaphosphate. Synthesis and characterization », *Carbohydrate Polymers*, vol. 57, n° 1, p. 1-6, août 2004, doi: 10.1016/j.carbpol.2003.12.006.
- [313] A. R. Khare et N. A. Peppas, « Swelling/deswelling of anionic copolymer gels », *Biomaterials*, vol. 16, n° 7, p. 559-567, mai 1995, doi: 10.1016/0142-9612(95)91130-q.
- [314] T. M. Freyman, I. V. Yannas, et L. J. Gibson, « Cellular materials as porous scaffolds for tissue engineering », *Progress in Materials Science*, vol. 46, n° 3, p. 273-282, janv. 2001, doi: 10.1016/S0079-6425(00)00018-9.
- [315] W. Wang, M. Chen, et G. Chen, « Issues in Freeze Drying of Aqueous Solutions », *Chinese Journal of Chemical Engineering*, vol. 20, n° 3, p. 551-559, juin 2012, doi: 10.1016/S1004-9541(11)60218-8.
- [316] J. Grenier, H. Duval, F. Barou, P. Lv, B. David, et D. Letourneur, « Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying », *Acta Biomater*, vol. 94, p. 195-203, 2019, doi: 10.1016/j.actbio.2019.05.070.
- [317] A. A. Shibkov, Yu. I. Golovin, M. A. Zheltov, A. A. Korolev, et A. A. Leonov, « Morphology diagram of nonequilibrium patterns of ice crystals growing in supercooled water », *Physica A: Statistical Mechanics and its Applications*, vol. 319, p. 65-79, mars 2003, doi: 10.1016/S0378-4371(02)01517-0.
- [318] D. Tadic, F. Beckmann, K. Schwarz, et M. Epple, « A novel method to produce hydroxyapatite objects with interconnecting porosity that avoids sintering », *Biomaterials*, vol. 25, n° 16, p. 3335-3340, juill. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.10.007.
- [319] J. Ma, H. Wang, B. He, et J. Chen, « A preliminary in vitro study on the fabrication and tissue engineering applications of a novel chitosan bilayer material as a scaffold of human neonatal

- dermal fibroblasts », *Biomaterials*, vol. 22, n° 4, p. 331-336, févr. 2001, doi: 10.1016/s0142-9612(00)00188-5.
- [320] A. H. Van Hove, B. D. Wilson, et D. S. W. Benoit, « Microwave-assisted Functionalization of Poly(ethylene glycol) and On-resin Peptides for Use in Chain Polymerizations and Hydrogel Formation », *JoVE*, n° 80, p. 50890, oct. 2013, doi: 10.3791/50890.
- [321] L. E. Nielsen, « Cross-Linking–Effect on Physical Properties of Polymers », *Journal of Macromolecular Science, Part C*, vol. 3, n° 1, p. 69-103, janv. 1969, doi: 10.1080/15583726908545897.
- [322] K. S. Anseth, C. N. Bowman, et L. Brannon-Peppas, « Mechanical properties of hydrogels and their experimental determination », *Biomaterials*, vol. 17, n° 17, p. 1647-1657, janv. 1996, doi: 10.1016/0142-9612(96)87644-7.
- [323] A. J. Kuijpers *et al.*, « Characterization of the Network Structure of Carbodiimide Cross-Linked Gelatin Gels », *Macromolecules*, vol. 32, n° 10, p. 3325-3333, mai 1999, doi: 10.1021/ma981929v.
- [324] M. J. Hopkins, H. N. Englyst, S. Macfarlane, E. Furrrie, G. T. Macfarlane, et A. J. McBain, « Degradation of Cross-Linked and Non-Cross-Linked Arabinoxylans by the Intestinal Microbiota in Children », *Appl. Environ. Microbiol.*, vol. 69, n° 11, p. 6354-6360, janv. 2003, doi: 10.1128/AEM.69.11.6354-6360.2003.
- [325] R. H. Staat, T. H. Gawronski, et C. F. Schachtele, « Detection and Preliminary Studies on Dextranase-Producing Microorganisms from Human Dental Plaque », *Infect Immun*, vol. 8, n° 6, p. 1009-1016, déc. 1973.
- [326] R. H. Staat et C. F. Schachtele, *Analysis of the dextranase activity produced by an oral strain of Bacteroides ochraceus*. 1976.
- [327] Farris Stefano, Unalan Ilke Uysal, Introzzi Laura, Fuentes-Alventosa José Maria, et Cozzolino Carlo A., « Pullulan-based films and coatings for food packaging: Present applications, emerging opportunities, and future challenges », *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 131, n° 13, avr. 2014, doi: 10.1002/app.40539.
- [328] D. Bruneel et E. Schacht, « Enzymatic Degradation of Pullulan and Pullulan Derivatives », *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, vol. 10, n° 4, p. 299-312, oct. 1995, doi: 10.1177/088391159501000402.
- [329] M. Norouzi, B. Nazari, et D. W. Miller, « Injectable hydrogel-based drug delivery systems for local cancer therapy », *Drug Discov. Today*, vol. 21, n° 11, p. 1835-1849, 2016, doi: 10.1016/j.drudis.2016.07.006.
- [330] S. Javanbakht et H. Namazi, « Doxorubicin loaded carboxymethyl cellulose/graphene quantum dot nanocomposite hydrogel films as a potential anticancer drug delivery system », *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, vol. 87, p. 50-59, juin 2018, doi: 10.1016/j.msec.2018.02.010.
- [331] X. Hu, H. Tan, et L. Hao, « Functional hydrogel contact lens for drug delivery in the application of ophthalmopathy therapy », *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 64, p. 43-52, 2016, doi: 10.1016/j.jmbbm.2016.07.005.
- [332] Y. Liu *et al.*, « A physically crosslinked polydopamine/nanocellulose hydrogel as potential versatile vehicles for drug delivery and wound healing », *Carbohydr Polym*, vol. 188, p. 27-36, mai 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.01.093.
- [333] R. Yegappan, V. Selvaprithviraj, S. Amirthalingam, et R. Jayakumar, « Carrageenan based hydrogels for drug delivery, tissue engineering and wound healing », *Carbohydr Polym*, vol. 198, p. 385-400, oct. 2018, doi: 10.1016/j.carbpol.2018.06.086.
- [334] A. Sosnik et K. Seremeta, « Polymeric Hydrogels as Technology Platform for Drug Delivery Applications », *Gels*, vol. 3, n° 3, p. 25, juill. 2017, doi: 10.3390/gels3030025.
- [335] A. N. de Belder et K. Granath, « Preparation and properties of fluorescein-labelled dextrans », *Carbohydrate Research*, vol. 30, n° 2, p. 375-378, oct. 1973, doi: 10.1016/S0008-6215(00)81824-8.

- [336] R. Schumann et D. Rentsch, « Staining particulate organic matter with DTAF--a fluorescence dye for carbohydrates and protein: a new approach and application of a 2D image analysis system », *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, vol. 171, p. 77-88, 1998, doi: 10.3354/meps171077.
- [337] G. T. Hermanson, « The Reactions of Bioconjugation », in *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, 2013, p. 229-258.
- [338] N. Marival *et al.*, « Identification of a Pro-Angiogenic Potential and Cellular Uptake Mechanism of a LMW Highly Sulfated Fraction of Fucoidan from *Ascophyllum nodosum* », *Marine Drugs*, vol. 14, n° 10, p. 185, oct. 2016, doi: 10.3390/md14100185.
- [339] F. Rouzet *et al.*, « Radiolabeled Fucoidan as a P-Selectin Targeting Agent for In Vivo Imaging of Platelet-Rich Thrombus and Endothelial Activation », *Journal of Nuclear Medicine*, vol. 52, n° 9, p. 1433-1440, sept. 2011, doi: 10.2967/jnumed.110.085852.
- [340] S. Khan et N. M. Ranjha, « Effect of degree of cross-linking on swelling and on drug release of low viscous chitosan/poly(vinyl alcohol) hydrogels », *Polym. Bull.*, vol. 71, n° 8, p. 2133-2158, août 2014, doi: 10.1007/s00289-014-1178-2.
- [341] N. Paradee, A. Sirivat, S. Niamlang, et W. Prissanaroon-Oujai, « Effects of crosslinking ratio, model drugs, and electric field strength on electrically controlled release for alginate-based hydrogel », *J Mater Sci: Mater Med*, vol. 23, n° 4, p. 999-1010, avr. 2012, doi: 10.1007/s10856-012-4571-0.
- [342] R. Zarzycki, Z. Modrzejewska, et K. Nawrotek, « Drug release from hydrogel matrices », *Ecological Chemistry and Engineering. S*, vol. Vol. 17, n° nr 2, p. 117-136, 2010.
- [343] R. W. Korsmeyer, R. Gurny, E. Doelker, P. Buri, et N. A. Peppas, « Mechanisms of solute release from porous hydrophilic polymers », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 15, n° 1, p. 25-35, mai 1983, doi: 10.1016/0378-5173(83)90064-9.
- [344] P. L. Ritger et N. A. Peppas, « A simple equation for description of solute release I. Fickian and non-fickian release from non-swelling devices in the form of slabs, spheres, cylinders or discs », *Journal of Controlled Release*, vol. 5, n° 1, p. 23-36, juin 1987, doi: 10.1016/0168-3659(87)90034-4.
- [345] P. Atkins et J. de Paula, *Physical Chemistry for the Life Sciences*, Second Edition. Oxford, New York: Oxford University Press, 2010.
- [346] S. Salgin, U. Salgin, et S. Bahadir, « Zeta Potentials and Isoelectric Points of Biomolecules: The Effects of Ion Types and Ionic Strengths », 2012, Consulté le: mai 13, 2020. [En ligne]. Disponible sur: <https://acikerisim.cumhuriyet.edu.tr/xmlui/handle/20.500.12418/8954>.
- [347] G. T. Hermanson, « Fluorescent Probes », in *Bioconjugate Techniques*, Elsevier, 2013, p. 395-463.
- [348] A. Bejenariu, M. Popa, V. Dulong, L. Picton, et D. Le Cerf, « Trisodium trimetaphosphate crosslinked xanthan networks: synthesis, swelling, loading and releasing behaviour », *Polym. Bull.*, vol. 62, n° 4, p. 525-538, avr. 2009, doi: 10.1007/s00289-008-0033-8.
- [349] V. Hlady et J. Buijs, « Protein adsorption on solid surfaces », *Current Opinion in Biotechnology*, vol. 7, n° 1, p. 72-77, févr. 1996, doi: 10.1016/S0958-1669(96)80098-X.
- [350] M. J. E. Fischer, « Amine Coupling Through EDC/NHS: A Practical Approach », in *Surface Plasmon Resonance*, vol. 627, N. J. Mol et M. J. E. Fischer, Éd. Totowa, NJ: Humana Press, 2010, p. 55-73.
- [351] P. A. Kavaklı, Z. Yılmaz, et M. Şen, « Investigation of Heavy Metal Ion Adsorption Characteristics of Poly(N,N Dimethylamino Ethylmethacrylate) Hydrogels », *Separation Science and Technology*, vol. 42, n° 6, p. 1245-1254, avr. 2007, doi: 10.1080/01496390601120490.
- [352] « Essai n° 428: Absorption cutanée: méthode in vitro ». https://www.oecd-ilibrary.org/fr/environment/essai-n-428-absorption-cutanee-methode-in-vitro_9789264071094-fr (consulté le mai 13, 2020).
- [353] « La règle des 3 R : réduire, raffiner, remplacer », *Inserm - La science pour la santé*. <https://www.inserm.fr/professionnels-recherche/recherche-pre-clinique/experimentation-animale/regle-3-r-reduire-raffiner-remplacer> (consulté le mai 13, 2020).

- [354] M. Kelleher *et al.*, « Skin barrier dysfunction measured by transepidermal water loss at 2 days and 2 months predates and predicts atopic dermatitis at 1 year », *J Allergy Clin Immunol*, vol. 135, n° 4, p. 930-935.e1, avr. 2015, doi: 10.1016/j.jaci.2014.12.013.
- [355] B. Godin *et al.*, « Dermal and Transdermal Delivery », in *Encyclopedia of Nanotechnology*, B. Bhushan, Éd. Dordrecht: Springer Netherlands, 2012, p. 517-526.
- [356] A. L. M. Ruela *et al.*, « Evaluation of skin absorption of drugs from topical and transdermal formulations », *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, vol. 52, n° 3, p. 527-544, sept. 2016, doi: 10.1590/s1984-82502016000300018.
- [357] L. N. Carpentieri-Rodrigues, J. M. Zanluchi, et I. H. Grebogi, « Percutaneous absorption enhancers: mechanisms and potential », *Braz. arch. biol. technol.*, vol. 50, n° 6, p. 949-961, nov. 2007, doi: 10.1590/S1516-89132007000700006.
- [358] K. W. Ng, « Penetration Enhancement of Topical Formulations », *Pharmaceutics*, vol. 10, n° 2, Art. n° 2, juin 2018, doi: 10.3390/pharmaceutics10020051.
- [359] M. M. Talukdar et R. Kinget, « Swelling and drug release behaviour of xanthan gum matrix tablets », *International Journal of Pharmaceutics*, vol. 120, n° 1, p. 63-72, juin 1995, doi: 10.1016/0378-5173(94)00410-7.
- [360] « ISO 10993-5:2009 », *ISO*. <https://www.iso.org/cms/render/live/fr/sites/isoorg/contents/data/standard/03/64/36406.html> (consulté le mai 13, 2020).
- [361] W. Li, J. Zhou, et Y. Xu, « Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices », *Biomedical Reports*, vol. 3, n° 5, p. 617-620, sept. 2015, doi: 10.3892/br.2015.481.
- [362] M. A. Mateos-Timoneda, O. Castano, J. A. Planell, et E. Engel, « Effect of structure, topography and chemistry on fibroblast adhesion and morphology », *J Mater Sci: Mater Med*, vol. 25, n° 7, p. 1781-1787, juill. 2014, doi: 10.1007/s10856-014-5199-z.
- [363] F. M. Busra, Y. Lokanathan, M. M. Nadzir, A. Saim, R. B. H. Idrus, et S. R. Chowdhury, « Attachment, Proliferation, and Morphological Properties of Human Dermal Fibroblasts on Ovine Tendon Collagen Scaffolds: A Comparative Study », *Malays J Med Sci*, vol. 24, n° 2, p. 33-43, mars 2017, doi: 10.21315/mjms2017.24.2.5.
- [364] J. Varani, S. E. Fligiel, D. R. Inman, T. F. Beals, et W. J. Hillegas, « Modulation of adhesive properties of DEAE-dextran with laminin », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 29, n° 8, p. 993-997, août 1995, doi: 10.1002/jbm.820290811.
- [365] J. H. Lee, H. W. Jung, I.-K. Kang, et H. B. Lee, « Cell behaviour on polymer surfaces with different functional groups », *Biomaterials*, vol. 15, n° 9, p. 705-711, janv. 1994, doi: 10.1016/0142-9612(94)90169-4.
- [366] K. Henriksen et M. A. Karsdal, « Type I Collagen », in *Biochemistry of Collagens, Laminins and Elastin*, Elsevier, 2016, p. 1-11.
- [367] A. K. Lynn, I. V. Yannas, et W. Bonfield, « Antigenicity and immunogenicity of collagen », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 71B, n° 2, p. 343-354, nov. 2004, doi: 10.1002/jbm.b.30096.
- [368] S. Zhu *et al.*, « Self-assembly of collagen-based biomaterials: preparation, characterizations and biomedical applications », *J. Mater. Chem. B*, vol. 6, n° 18, p. 2650-2676, mai 2018, doi: 10.1039/C7TB02999C.
- [369] K. E. Kadler, D. F. Holmes, J. A. Trotter, et J. A. Chapman, « Collagen fibril formation. », *Biochem J*, vol. 316, n° Pt 1, p. 1-11, mai 1996.
- [370] Y. Li et E. P. Douglas, « Effects of various salts on structural polymorphism of reconstituted type I collagen fibrils », *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 112, p. 42-50, déc. 2013, doi: 10.1016/j.colsurfb.2013.07.037.
- [371] E. L. Mertz et S. Leikin, « Interactions of Inorganic Phosphate and Sulfate Anions with Collagen », *Biochemistry*, vol. 43, n° 47, p. 14901-14912, nov. 2004, doi: 10.1021/bi048788b.
- [372] Y. Li, A. Asadi, M. R. Monroe, et E. P. Douglas, « pH effects on collagen fibrillogenesis in vitro: Electrostatic interactions and phosphate binding », *Materials Science and Engineering: C*, vol. 29, n° 5, p. 1643-1649, juin 2009, doi: 10.1016/j.msec.2009.01.001.

- [373] N. Dagalakakis, J. Flink, P. Stasikelis, J. F. Burke, et I. V. Yannas, « Design of an artificial skin. Part III. Control of pore structure », *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 14, n° 4, p. 511-528, 1980, doi: 10.1002/jbm.820140417.
- [374] K. A. Faraj, T. H. van Kuppevelt, et W. F. Daamen, « Construction of Collagen Scaffolds That Mimic the Three-Dimensional Architecture of Specific Tissues », *Tissue Engineering*, vol. 13, n° 10, p. 2387-2394, oct. 2007, doi: 10.1089/ten.2006.0320.
- [375] B. Eckes, R. Nischt, et T. Krieg, « Cell-matrix interactions in dermal repair and scarring », *Fibrogenesis & Tissue Repair*, vol. 3, n° 1, p. 4, mars 2010, doi: 10.1186/1755-1536-3-4.
- [376] L. C. Junqueira, G. Bignolas, et R. R. Brentani, « Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections », *Histochem. J.*, vol. 11, n° 4, p. 447-455, juill. 1979, doi: 10.1007/BF01002772.
- [377] F. Gobeaux *et al.*, « Fibrillogenesis in Dense Collagen Solutions: A Physicochemical Study », *Journal of Molecular Biology*, vol. 376, n° 5, p. 1509-1522, mars 2008, doi: 10.1016/j.jmb.2007.12.047.
- [378] J. Kim *et al.*, « Charged Nanomatrices as Efficient Platforms for Modulating Cell Adhesion and Shape », *Tissue Engineering Part C: Methods*, vol. 18, n° 12, p. 913-923, mai 2012, doi: 10.1089/ten.tec.2011.0731.
- [379] G. B. Schneider, A. English, M. Abraham, R. Zaharias, C. Stanford, et J. Keller, « The effect of hydrogel charge density on cell attachment », *Biomaterials*, vol. 25, n° 15, p. 3023-3028, juill. 2004, doi: 10.1016/j.biomaterials.2003.09.084.
- [380] Y. M. Chen *et al.*, « Tuning of cell proliferation on tough gels by critical charge effect », *J Biomed Mater Res A*, vol. 88, n° 1, p. 74-83, janv. 2009, doi: 10.1002/jbm.a.31869.
- [381] D. Icoz et J. Kokini, « Probing the boundaries of miscibility in model carbohydrates consisting of chemically derivatized dextrans using DSC and FTIR spectroscopy », *Carbohydrate Polymers*, vol. 68, n° 1, p. 68-76, mars 2007, doi: 10.1016/j.carbpol.2006.07.011.
- [382] A. Abbadessa, M. Landín, E. Oude Blenke, W. E. Hennink, et T. Vermonden, « Two-component thermosensitive hydrogels: Phase separation affecting rheological behavior », *European Polymer Journal*, vol. 92, p. 13-26, juill. 2017, doi: 10.1016/j.eurpolymj.2017.04.029.
- [383] Y. Arima et H. Iwata, « Effects of surface functional groups on protein adsorption and subsequent cell adhesion using self-assembled monolayers », *J. Mater. Chem.*, vol. 17, n° 38, p. 4079-4087, sept. 2007, doi: 10.1039/B708099A.
- [384] T. Hoshiba, C. Yoshikawa, et K. Sakakibara, « Characterization of Initial Cell Adhesion on Charged Polymer Substrates in Serum-Containing and Serum-Free Media », *Langmuir*, vol. 34, n° 13, p. 4043-4051, avr. 2018, doi: 10.1021/acs.langmuir.8b00233.
- [385] J.-H. Lin *et al.*, « Effect of Surface Potential on Extracellular Matrix Protein Adsorption », *Langmuir*, vol. 30, n° 34, p. 10328-10335, sept. 2014, doi: 10.1021/la5020362.
- [386] A. J. García, « Get a grip: integrins in cell-biomaterial interactions », *Biomaterials*, vol. 26, n° 36, p. 7525-7529, déc. 2005, doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.05.029.
- [387] « Integra® Dermal Regeneration Template Single Layer « Integra LifeSciences: Europe, Middle East and Africa ». <https://www.integralife.eu/products/plastic/integra-dermal-regeneration-template-single-layer-2/> (consulté le mai 07, 2020).
- [388] J. E. Greenwood, « Hybrid Biomaterials for Skin Tissue Engineering », in *Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Elsevier, 2016, p. 185-210.
- [389] M. A. Kosir, C. C. Quinn, W. Wang, et G. Tromp, « Matrix glycosaminoglycans in the growth phase of fibroblasts: more of the story in wound healing », *J. Surg. Res.*, vol. 92, n° 1, p. 45-52, juill. 2000, doi: 10.1006/jsre.2000.5840.
- [390] « Integra® Matrix Wound Dressing ». <https://www.integralife.com/integra-matrix-wound-dressing/product/wound-reconstruction-care-inpatient-acute-or-integra-matrix-wound-dressing> (consulté le mai 06, 2020).

- [391] T. Krieg et M. Aumailley, « The extracellular matrix of the dermis: flexible structures with dynamic functions », *Experimental Dermatology*, vol. 20, n° 8, p. 689-695, 2011, doi: 10.1111/j.1600-0625.2011.01313.x.
- [392] T. Heinze, T. Liebert, B. Heublein, et S. Hornig, « Functional Polymers Based on Dextran », in *Polysaccharides II*, vol. 205, D. Klemm, Éd. Springer Berlin Heidelberg, 2006, p. 199-291.
- [393] J. Varani, S. E. Fligiel, D. R. Inman, D. L. Helmreich, M. J. Bendelow, et W. Hillegas, « Substrate-dependent differences in production of extracellular matrix molecules by squamous carcinoma cells and diploid fibroblasts », *Biotechnol. Bioeng.*, vol. 33, n° 10, p. 1235-1241, avr. 1989, doi: 10.1002/bit.260331003.
- [394] K. A. Bush, P. F. Driscoll, E. R. Soto, C. R. Lambert, W. G. McGimpsey, et G. D. Pins, « Designing tailored biomaterial surfaces to direct keratinocyte morphology, attachment, and differentiation », *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 90A, n° 4, p. 999-1009, sept. 2009, doi: 10.1002/jbm.a.32168.
- [395] M. Xue et C. J. Jackson, « Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring », *Adv Wound Care (New Rochelle)*, vol. 4, n° 3, p. 119-136, mars 2015, doi: 10.1089/wound.2013.0485.
- [396] M. S. Tjin, A. W. C. Chua, D. R. Ma, S. T. Lee, et E. Fong, « Human Epidermal Keratinocyte Cell Response on Integrin-Specific Artificial Extracellular Matrix Proteins: Human Epidermal Keratinocyte Cell Response on ... », *Macromol. Biosci.*, vol. 14, n° 8, p. 1125-1134, août 2014, doi: 10.1002/mabi.201400015.
- [397] R. E. Horsch, M. Debus, G. Wagner, et G. B. Stark, « Cultured Human Keratinocytes on Type I Collagen Membranes to Reconstitute the Epidermis », *Tissue Engineering*, vol. 6, n° 1, p. 53-67, févr. 2000, doi: 10.1089/107632700320892.
- [398] N. O. Fortunel *et al.*, « Cellular adhesion on collagen: a simple method to select human basal keratinocytes which preserves their high growth capacity », *European Journal of Dermatology*, vol. 21, n° S1, p. 12-20, mai 2011, doi: 10.1684/ejd.2011.1268.
- [399] P. N. Sudha *et al.*, « 10 - In vivo biocompatibility studies: Perspectives on evaluation of biomedical polymer biocompatibility », in *Fundamental Biomaterials: Polymers*, S. Thomas, P. Balakrishnan, et M. S. Sreekala, Éd. Woodhead Publishing, 2018, p. 217-247.
- [400] X. Huang, Y. Zhang, X. Zhang, L. Xu, X. Chen, et S. Wei, « Influence of radiation crosslinked carboxymethyl-chitosan/gelatin hydrogel on cutaneous wound healing », *Materials Science and Engineering: C*, vol. 33, n° 8, p. 4816-4824, déc. 2013, doi: 10.1016/j.msec.2013.07.044.
- [401] M. Van Griensven et E. Rosado Balmayor, « Immunogenic Reaction of Implanted Biomaterials from Nature », in *Biomaterials from Nature for Advanced Devices and Therapies*, N. M. Neves et R. L. Reis, Éd. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, Inc., 2016, p. 429-443.
- [402] « Alcian blue stain ». https://fr.qwe.wiki/wiki/Alcian_blue_stain (consulté le mai 17, 2020).
- [403] M.-H. Cheng *et al.*, « Investigation of Dermis-derived hydrogels for wound healing applications », *Biomed J*, vol. 38, n° 1, p. 58, 2015, doi: 10.4103/2319-4170.132899.
- [404] J. E. Grey, S. Enoch, et K. G. Harding, « Wound assessment », *BMJ*, vol. 332, n° 7536, p. 285-288, févr. 2006.
- [405] S. O. Blacklow, J. Li, B. R. Freedman, M. Zeidi, C. Chen, et D. J. Mooney, « Bioinspired mechanically active adhesive dressings to accelerate wound closure », *Science Advances*, vol. 5, n° 7, p. eaaw3963, juill. 2019, doi: 10.1126/sciadv.aaw3963.
- [406] G. Sun *et al.*, « Dextran hydrogel scaffolds enhance angiogenic responses and promote complete skin regeneration during burn wound healing », *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 108, n° 52, p. 20976-20981, déc. 2011, doi: 10.1073/pnas.1115973108.
- [407] C. Carver, « Difference Between Scabs and Eschar », *WoundSource*, mars 17, 2016. <http://www.woundsource.com/blog/knowning-difference-between-scabs-and-eschar> (consulté le mai 21, 2020).
- [408] F. S. L. Gomes, C. de V. Spínola, H. A. Ribeiro, M. T. P. Lopes, G. D. Cassali, et C. E. Salas, « Wound-healing activity of a proteolytic fraction from *Carica candamarcensis* on

- experimentally induced burn », *Burns*, vol. 36, n° 2, p. 277-283, mars 2010, doi: 10.1016/j.burns.2009.04.007.
- [409] Y.-H. Lee, J.-J. Chang, M.-C. Yang, C.-T. Chien, et W.-F. Lai, « Acceleration of wound healing in diabetic rats by layered hydrogel dressing », *Carbohydrate Polymers*, vol. 88, n° 3, p. 809-819, avr. 2012, doi: 10.1016/j.carbpol.2011.12.045.
- [410] M. Kurita *et al.*, « In vivo reprogramming of wound-resident cells generates skin epithelial tissue », *Nature*, vol. 561, n° 7722, Art. n° 7722, sept. 2018, doi: 10.1038/s41586-018-0477-4.
- [411] « Integra® Bilayer Matrix Wound Dressing ». <https://www.integralife.com/integra-bilayer-matrix-wound-dressing/product/wound-reconstruction-care-inpatient-acute-or-integra-bilayer-matrix-wound-dressing> (consulté le mai 21, 2020).
- [412] H. Yoon *et al.*, « Effectiveness of wound healing using the novel collagen dermal substitute INSUREGRAF® », *RSC Adv.*, vol. 6, n° 64, p. 59692-59701, 2016, doi: 10.1039/C5RA27423K.
- [413] F. Dupasquier, « Hydrogels physiques de chitosane pour la régénération in vivo du tissu cutané après brûlures du troisième degré », These de doctorat, Lyon 1, 2011.

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Coupe schématique de la peau et ses annexes (adapté de « Servier Medical Art »).....	7
Figure 2 : Représentation schématique de l'épiderme [25]	8
Figure 3 : Schéma représentatif de la lame basale avec les protéines qui la composent : a & b : laminines 332 et 511/521 ; c : perlecan ; d, e, g et i : collagènes XVII, VII, IV et I/III ; f : nidogène ; h : syndecan (adapté de Rousselle <i>et al.</i> 2018) [30].	9
Figure 4 : Schéma de la structure tridimensionnelle complexe des macromolécules de la MEC (modifié de Zhu <i>et al.</i> , [33]).....	10
Figure 5 : Coupe histologique de la peau, coloration hématoxyline/éosine [39].....	11
Figure 6 : Chronologie des différentes phases de la cicatrisation [57].....	15
Figure 7 : Phase vasculaire (adapté de Sun <i>et al.</i> , [61] et Tracy <i>et al.</i> , [34]).....	16
Figure 8 : Phase inflammatoire (adapté de Sun <i>et al.</i> , [61] et Tracy <i>et al.</i> , [34]).....	17
Figure 9 : Phase de prolifération (adapté de Sun <i>et al.</i> , [61] et Tracy <i>et al.</i> , [34]).....	18
Figure 10 : Phase de remodelage (adapté de Sun <i>et al.</i> , [61] et Tracy <i>et al.</i> , [34])	21
Figure 11 : Prise en charge en fonction de la sévérité de la plaie (adapté de [96], [97])	23
Figure 12 : Domaines d'application médicaux des biomatériaux [105].....	26
Figure 13 : Microscopie électronique à balayage des architectures internes de matrices poreuses à base d'alginate (A) et de peau humaine décellularisée (B) [112].	27
Figure 14 : Organisation structurale du collagène de type I (adapté de Chattopadhyay 2014).....	32
Figure 15 : Structure de la soie (adapté de Jao <i>et al.</i> [166])	34
Figure 16 : Structure chimique de la cellulose.....	35
Figure 17 : Structure chimique du pullulane.....	36
Figure 18 : Structure chimique du dextrane	37
Figure 19 : Structure chimique du chitosane	37
Figure 20 : Exemple de structure chimique de l'alginate avec (G) acide glucuronique et (M) acide mannuronique	38
Figure 21 : Structure chimique de l'acide hyaluronique avec acide D Glucuronique à gauche et l'acide D-N acétylglucosamine à droite.....	39
Figure 22 : Exemples de structure chimiques des GAGs (Modifié de Zhang <i>et al.</i> 2010)	40
Figure 23 : Représentation schématique d'un hydrogel hydrophile réticulé (adapté de Zhu <i>et al.</i> [33])	41
Figure 24 : Représentation schématique de la lixiviation des particules (adapté de Turnbull <i>et al.</i> 2017)	45

Figure 25 : Représentation schématique de la lyophilisation.....	46
Figure 26 : Représentation schématique de la technique de fabrication de matrice poreuse par séparation de phases adapté de [233]	47
Figure 27 : Incorporation par liaisons covalentes (adapté de Li <i>et al.</i> [252])	50
Figure 28 : Incorporation par (a) interactions stériques, (b) interactions électrostatiques et (c) interactions hydrophobes (adapté de Li <i>et al.</i> [252])	50
Figure 29 : Modélisation utilisation d'application des biomatériaux en tant que substituts cutanés dans le cas d'un modèle de perte partielle (plaie stade I à II) (a) ou totale (plaie stade III à IV) (b) de peau [264].....	52
Figure 30 : Molécule de galactomannanes	62
Figure 31 : (a) Molécule de 5-DTAFet (b) molécule FITC	62
Figure 32 : Réaction chimique de réticulation des polysaccharides par le STMP.....	66
Figure 33 : Etapes de synthèse des matrices de pullulane/dextrane	66
Figure 34 : Exemple de cycle de lyophilisation	67
Figure 35 : Méthode d'incorporation « <i>in situ</i> »	69
Figure 36 : Méthode d'incorporation « diffusion inverse »	70
Figure 37 : Méthode d'incorporation « Imprégnation »	70
Figure 38 : Méthode d'incorporation de la méthode " <i>in situ</i> "	72
Figure 39 : Schéma de la méthode d'incorporation du collagène	72
Figure 40 : Schéma de la co-incorporation du système combiné 1.....	73
Figure 41 : Schéma de la co-incorporation du système combiné 2.....	73
Figure 42 : Schéma de la co-incorporation du système combiné 3.....	74
Figure 43 : Schéma de la co-incorporation du système combiné 4.....	74
Figure 44 : Schéma du montage pour mesure de la TEER	84
Figure 45 : Illustration d'un « dermaroller ».....	85
Figure 46 : Montage cellule de Franz.....	86
Figure 47 : Procédure expérimentale de plaie cutanée chez le rat	89
Figure 48 : Procédure expérimentale de plaie cutanée chez la souris	90
Figure 49 : Aspect macroscopique des matrices lyophilisées pullulane/dextrane 75:25 (PuD _(75:25)) synthétisées avec trois concentrations de STMP et deux agents porogènes.....	98
Figure 50 : Coupes sagittales des matrices de pullulane/dextrane observées au MEB (Joel Carryscope) préparées avec différentes concentrations de STMP et agents porogènes. Les formulations réalisées avec du NaCl représentent les images (a) à (c) et celles avec le Na ₂ CO ₃ les images (d) à (f). Les formulations les plus concentrées en STMP sont représentées par les figures de gauche et les moins	

concentrées sont à droite. Echelle de 500 μm applicable aux images (a) à (f) et échelle de 250 μm applicable aux agrandissements (a') à (f').	99
Figure 51 : (a) Quantification du phosphore dans les matrices par dosage colorimétrique. “* et **” indiquent une différence significative entre les formulations $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ et $\text{MPuD}_{(75:25)}$ et “##” entre les concentrations en STMP ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, $n=6$). (b) Rendement de phosphore retrouvé après synthèse par gramme de polysaccharides (gPS).	100
Figure 52 : Taux de gonflement des matrices hydratées dans (a) du PBS 1X et (b) de l’eau. La significativité est représentée par “* et #” avec $p < 0,05$ ($n=4$). Relation gonflement et phosphore greffé dans (c) du PBS 1X et (d) de l’eau.	101
Figure 53 : Images confocales des matrices de pullulane/dextrane préparées avec du dextrane FITC : plans (xy) et projections orthogonales en bas (xz) et à droite (yz) de chaque figure (Microscope confocal Zeiss LSM 780, objectif 10x (Logiciel Zen®)). Echelle de 250 μm applicable à toutes les images.	103
Figure 54 : (a) Fraction de porosité et (b) Circularité des pores calculées à partir des acquisitions de la Figure 53 grâce au logiciel ImageJ®. La significativité est indiquée par “* et #” ($p < 0,05$, $n=4$).	104
Figure 55 : (a) Balayage en fréquence des matrices $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$, (b) Balayage en fréquence des matrices $\text{MPuD}_{(75:25)}$, (c) tableaux des valeurs moyennes de G' et (d) Représentation des G' en fonction de la quantité de phosphore. Les différences significatives sont illustrées par # et ** ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, $n \geq 5$)	106
Figure 56 : Cinétique de dégradation enzymatique des (a) $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$ et (b) $\text{MPuD}_{(75:25)}$ avec les régressions linéaires. (c) Tableau des temps auxquels 50% de masse résiduelle est atteint ($T_{1/2}$) avec une significativité représentée par *,# $p > 0,05$ et **,## $p < 0,01$ ($n=4$).	109
Figure 57 : Caractérisation des molécules A et A-DTAF (orange). La figure (a) est une photographie de CCM révélée à l’UV (365nm) avec la flèche indiquant le sens de migration. La figure (b) représente les résultats du dosage de mannose dans les composés. Les figures (c) et (d) sont respectivement les chromatogrammes des molécules et leur masse moléculaire (M_n en nombre et M_w en poids) et les aires sous la courbe (AUC) sont obtenus par HPSEC après traitement avec le logiciel Astra®. La non significativité est signifiée par « ns » ($p > 0,05$, $n \geq 3$).	112
Figure 58 : Chromatogrammes des radioactivités du composé $\text{A-}^{99\text{m}}\text{Tc}$ et du technétium libre ($^{99\text{m}}\text{Tc}$) à T0 (respectivement (a) et (b)) et à T5h (respectivement (c) et (d)) mesurées à partir de CCM (raytest MiniGITA)	114
Figure 59 : Représentation schématique de l’ensemble des méthodes d’incorporation de la molécule A	115

Figure 60 : Rendement d'incorporation de la molécule A en $\mu\text{g}/\text{mg}$ de matrice sèche, histogramme par méthodes d'incorporation (a à c) et approximé par la quantité de phosphore retrouvé dans les matrices (a' à c'). "** et #" indiquent des différences significatives ($p < 0,05$, $n=3$) et "ns" la non significativité ($p > 0,05$).....	116
Figure 61 : Profils de libération de la molécule A des différentes formulations en fonction de la méthode d'incorporation utilisée et de leur porosité	119
Figure 62 : Concordance entre les modèles (a) de cinétique d'ordre zéro, (b) de cinétique e premier ordre, (c) d'Higushi et (d) de Korsmeyer (lignes pointillées noires) et les résultats expérimentaux (points bleus).	121
Figure 63 : Charge du composé B mesurée par le potentiel ζ en fonction du pH.	123
Figure 64 : (a) Tableau des taux d'amines primaires retrouvés dans les composés B et B-FITC avec le rendement du greffage. La significativité est représentée par * ($p < 0,05$, $n=3$). (b) Photographie CCM du FITC libre et du B-FITC révélée à l'UV (365nm) avec la flèche indiquant le sens de migration.	123
Figure 65 : Rendement d'incorporation de la molécule B dans les différentes formulations synthétisées par rapport à la méthode utilisée (a et b) et approximé par la quantité de phosphore greffés (a' et b'). "** et #" indiquent des différences significatives ($p < 0,05$) et « ns » indique une non significativité ($p > 0,05$, $n=3$).....	125
Figure 66 : Profils de libération de la molécule B des différentes formulations en fonction de la méthode d'incorporation et de la porosité	127
Figure 67 : Photographies des solutions de polysaccharides des formulations (a) $\mu\text{PuD}_{(75:25)}$, (b) $\mu\text{PuD}^+_{(75:25)}$ et (c) $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}$	129
Figure 68 : Photographies de matrices synthétisées sans et avec le Dextrane modifié (D+) à l'état hydraté (a à c) et à l'état lyophilisé (d à f).	129
Figure 69 : Images MEB des matrices synthétisées sans (a) et avec du dextrane modifié à 25% (b) et à 50% (c) en ratio de polysaccharides. Echelle 200 μm applicable à toutes les images.....	130
Figure 70 : Taux de gonflement des matrices fonctionnalisées ou non dans le PBS 1X. "** et ***" indiquent des différences significatives avec $p < 0,05$ et $0,01$ respectivement ($n=4$).....	130
Figure 71 : Incorporation de la molécule B dans les matrices fonctionnalisées par des charges positives (a). Profils de libération (b) et caractéristiques calculées par le modèle de Korsmeyer & Peppas (c). Les différences significatives sont indiquées par "** et ***" ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, $n \geq 3$).	131
Figure 72 : Coupes histologiques de peau de cochon (a) saine, (b) congelée/décongelée et (c) décongelée/microporée après coloration HES. Microporation représentée par la flèche noire. Echelle 50 μm applicable à toutes les images. (d) Valeurs de la résistance transépithéliale des peaux saines et compromises ($n=3$)	134

- Figure 73 : Quantité de molécule A retrouvée dans la peau (encadré orange) et dans la cellule de Franz après 15h. Les différences significatives sont indiquées par “* , ** et ****” ($p < 0,05$, $p < 0,01$ et $p < 0,001$ respectivement) et « ns » indique une absence de différence significative ($p > 0,05$) ($n \geq 6$)..... 136
- Figure 74 : Quantité de molécule B retrouvée dans la peau (encadré orangé) et dans la cellule de Franz après 15h. Les différences significatives sont indiquées par “** et ****” ($p < 0,01$ et $p < 0,001$) et “ns” indique une absence de différence significative ($p > 0,05$) ($n \geq 6$)..... 137
- Figure 75 : Suivi de la libération de la molécule A-99mTC dans des plaies réalisées par abrasion chimique (images a à c) et excision totale (a’ à c’) avec les acquisitions en TEMP (images à droite). L’échelle de couleur représente l’intensité de la radioactivité (faible en bleu et intense en rouge) et l’échelle en noir et blanc représente la densité des tissus (faible en noir et intense en blanc)..... 139
- Figure 76 : Etude de libération *in vivo* dans un modèle de plaie d’excision totale chez la souris. Coupes histologiques de tissus frais 2H après aposition des formulations et observation au microscope (Zeiss LSM 780). Les matrices sont représentées en rouge (images a à d), les composés actifs en vert (images a’ à d’). Ces images ont été superposées au signal PMT (images a’’ à d’’). Diffusion des molécules dans le lit de la plaie (flèches blanches). Echelle : $500\mu\text{m}$; applicable à toutes les images. 140
- Figure 77 : Etude de libération *in vivo* dans un modèle de plaie d’excision totale chez la souris. Coupes histologiques de tissus frais 4 jours après aposition des formulations et observation au microscope (Zeiss LSM 780). Les matrices sont représentées en rouges (images a à c), les composés actifs en vert (images a’ à c’). ces images ont été superposées au signal PMT (images a’’ à c’’).). Echelle $500\mu\text{m}$ applicable à toutes les images. Encarts de zooms des images c, c’ et c’’ avec, échelle de $50\mu\text{m}$ applicable aux trois images. 141
- Figure 78 : Etude de cytotoxicité par contact indirect de tapis cellulaire 2D et des formulations. Images (a à f’) acquisition des tapis cellulaires après marquage de vie cellulaire par de la calcéin (vert, images a à f) et de mort par du bromure d’éthidium (rouge, images a’ à f’), (Zeiss Axiocam 208). Echelle $500\mu\text{m}$ applicable à toutes les acquisitions (a à f’). Figures (g) et (f) représentent respectivement le taux de survie cellulaire par quantification vie/mort et le taux de lactate déshydrogénase libérée dans le milieu ($n \geq 3$). Les lignes pointillées représentent les limites minimale de viabilité (vert) et maximale de mortalité (rouge) qui déterminent la cytotoxicité des matériaux..... 142
- Figure 79 : (a à d’’) Projection Z en moyenne d’intensité (ImageJ®) des images des cellules après 4 jours de culture dans les matrices (LSM Zeiss 780). Les images (a à d) représentent le noyau marqué par du DAPI (bleu), les images (a’ à d’) le cytosquelette avec la phalloïdine (rouge). Les images (a’’ à d’’) sont la superposition des images (a à d’) avec les matrices marquées au FITC. Echelle $100\mu\text{m}$ applicable à toutes les images. (d) Activités métaboliques des cellules mesurées aux jours 4 et 8 après

ensemencement et normalisées par rapport au jour 1. Les différences statistiques sont indiquées par * et # ($p < 0,05$, $n \geq 3$). 144

Figure 80 : Représentation schématique des méthodes d'incorporation par le collagène..... 150

Figure 81 : Observation des surfaces (a à c) et des sections transversales (d à f) en microscopie électronique à balayage (Joel Carryscope, zoom 30x), échelle 500 μm applicable aux images (a à f). Agrandissements (c') et (f'), échelle 150 μm applicable aux deux images. Les flèches blanches indiquent la présence de collagène..... 151

Figure 82 : Observation en microscopie confocale (LSM Zeiss 780, objectif 10x) après coloration au rouge Sirius (en jaune) (a à c) et superposée au signal fluorescent des matrices FITC (en vert) (a' à c'). Echelle 200 μm applicable à toutes les images. 152

Figure 83 : Observation du signal SHG en microscopie biphotonique des matrices (Leica SP8, objectif 20x), (a) MPuD_(50:50) (b) MPuD_(50:50)COLLx1% et (c) MPuD_(50:50)COLLi1%. Echelles 100 μm 153

Figure 84 : Caractérisation des matériaux fonctionnalisés avec du collagène. (a) Capacité de gonflement des matériaux dans l'eau et le PBS et (b) cinétique de dégradation des hydrogels. (c) T1/2 et coefficient de corrélation (r^2) déterminés après régression linéaire. Les différences significatives ou non sont indiquées respectivement par "*" ou "ns" ($p < 0,05$ ou $p > 0,05$; $n = 4$). 155

Figure 85 : Propriétés mécaniques des matrices fonctionnalisées avec du collagène. (a) Balayage en fréquence des matrices MPuD_(50:50) avec et sans collagène. (b) Tableau des valeurs de G' et du domaine de déformation linéaire à 1Hz. La non significativité statistique des valeurs est représentée par "ns" ($p > 0,05$, $n \geq 4$)..... 155

Figure 86 : Projection Z en moyenne d'intensité de 380 μm d'épaisseur des matrices ensemencés avec des FHN. Les photos (a) à (c) représentent les cellules marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge), superposées au signal FITC de la matrice (vert). Les photos (a') à (c') représentent ces images superposées (LSM Zeiss 700). Les vues orthogonales des axes yz et zx sont représentés respectivement à droite et en bas de chacune des images. Echelle de 250 μm applicable à toutes les images. 156

Figure 87 : Images (a) à (c) des tapis cellulaires en contact avec les matériaux (a) MPuD_(50:50), (b) MPuD_(50:50)COLLx1% et (c) MPuD_(50:50)COLLi1% (Zeiss AxioCam 208). Echelle 500 μm applicable à toutes les images. (d) Quantification de la migration cellulaire avec significativité indiquée par "***" ($p < 0,01$) et non significativité "ns" ($p > 0,05$) ($n \geq 5$) 157

Figure 88 : Surface occupée par le signal fluorescent du collagène mesurée par ImageJ® à partir des acquisitions réalisées en microscopie confocale. Différences significatives indiquées par "*" et "***" ($p < 0,05$ et $p < 0,01$, $n = 3$)..... 159

Figure 89 : Projection Z en intensité maximale de 370 μm d'épaisseur pour les matrices (a) MPuD_(50:50)COLLi 1% (b) MPuD_(50:50)COLLi 0,5% et (c) MPuD_(50:50)COLLi 0,01% ensemencées avec des

FHN. Les cellules sont marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge). Echelle de 250 μm applicable à toutes les images. 159

Figure 90 : Schémas récapitulatifs de l'association des méthodes d'incorporation molécule A/collagène 160

Figure 91 : Projection Z en intensité moyenne de 380 μm d'épaisseur des matrices (a) MPuD_(50:50)AxCOLLi (b) MPuD_(50:50)AxCOLLx (c) MPuD_(50:50)AiCOLLi et (d) MPuD_(50:50)AiCOLLx. Les FHN sont marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge). Les vues orthogonales des axes yz et zx sont représentées respectivement à droite et en bas de chacune des images. Echelle de 500 μm applicable à toutes les images..... 161

Figure 92 : : Images (a) à (d) des tapis cellulaires en contact avec les extraits des matériaux (a) MPuD_(50:50), (b) MPuD_(50:50)Ai, (c) MPuD_(50:50)COLLi et (d) MPuD_(50:50)AiCOLLi (Zeiss Axiocam 208). Echelle 500 μm applicable à toutes les images. (e) Quantification de la migration cellulaire avec significativité indiquée par "***" ($p < 0,01$) et la valeur p " $p = 0,11$ " ($n \geq 4$) 162

Figure 93 : Etude en microscopie électronique à balayage des matériaux fonctionnalisés et non fonctionnalisés par des charges positives. (a) et (b) Observations en MEB (Joel Carryscope) des coupes transversales des matrices lyophilisées, synthétisées avec et sans dextrane modifié, échelle 500 μm . Images (c) et (d) Observations en surface en MEB (Philips XI30), après hydratation dans l'eau, échelle 300 μm . Images (a') à (d') correspondent aux agrandissements, échelle 100 μm 164

Figure 94 : Observation de plans des matrices préparées avec du dextrane FITC et hydratées avec du PBS 1X, avant (a et c) et après (b et d) lyophilisation. Les sections sont acquises à partir de 50 μm de profondeur. Echelles 150 μm applicables à toutes les images..... 165

Figure 95 : Caractérisation des matériaux fonctionnalisés avec dextrane modifié (a) Capacités d'absorption dans l'eau et le PBS et (b) cinétique de dégradation avec (c) leur t1/2 calculé après régression non linéaire. Les différences significatives ou non sont indiquées respectivement par "*" et #" ($p < 0,05$) et "ns" ($p > 0,05$), ($n = 4$). 166

Figure 96 : Propriétés mécaniques des matrices fonctionnalisées avec du DEAE (a) Balayage en fréquence des matrices $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ avec et sans dextrane modifié. (b) Tableau des valeurs de G' et du domaine de déformation linéaire à 1Hz. La significativité statistique des valeurs est représentée par "*" ($p < 0,05$, $n = 4$) 167

Figure 97 : Projection Z en intensité maximale de 200 μm d'épaisseur dans les matrices (a) $\mu\text{PuD}_{(50:50)}$ et (b) $\mu\text{PuD}^+_{(50:50)}$ ensemencées avec des FHN. Représentations des vues orthogonales à droite et en bas de chacune des projections. Les cellules sont marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge). Echelle de 200 μm applicable aux images (a) et (b) et projections orthogonales et échelle de 50 μm applicable aux agrandissements (a') et (b'). 168

Figure 98 : Etude de cytotoxicité par contact indirect. La figure (a) représente le taux de survie cellulaire par dénombrement des cellules vivantes (vert) et mortes (rouge) et la figure (b) le taux de lactate déshydrogénase libérée dans le milieu ($n \geq 3$). Les lignes pointillées représentent les limites minimale de viabilité (vert) et maximale de mortalité (rouge) qui déterminent la cytotoxicité des matériaux. 171

Figure 99 : Culture de fibroblastes ensemencés dans les matériaux. Acquisitions projetées en Z, en intensité maximale réalisées en microscopie confocale (Zeiss, LSM 750) et traitées par le logiciel ImageJ®. Observations après 4 jours des FHN par marquage du noyau (DAPI, Bleu) associé de gauche à droite à la morphologie des cellules par marquage de l'actine (phalloïdine, rouge) et à la synthèse de composants de la MEC : collagène III (vert), de la fibronectine (jaune) et de l'acide hyaluronique (blanc) avec échelle de 250 μm applicable aux images. Agrandissements des marquages spécifiques (haut à droite), échelle de 100 μm applicable à tous les encarts. 172

Figure 100 : Culture de fibroblastes ensemencés dans les matériaux pendant 8 jours. Acquisitions projetées en Z, en intensité maximale réalisées en microscopie confocale (Zeiss, LSM 750) et traitées par le logiciel ImageJ®. Observation après 8 jours des FHN par marquage du noyau (DAPI, Bleu) associé de gauche à droite à la morphologie des cellules par marquage de l'actine (phalloïdine, rouge) et à la synthèse de composant de la MEC : collagène III (vert), de la fibronectine (jaune) et de l'acide hyaluronique (blanc), échelle 250 μm applicable aux images. Agrandissements des marquages spécifiques (haut à droite), échelle de 100 μm applicable à tous les encarts. 174

Figure 101 : Projection Z en intensité maximale d'épaisseur de 200 μm des différentes conditions ensemencées avec des KHN. Représentations des vues orthogonales à droite (y ; z) et en bas (x ; z) de chacune des projections. Les cellules sont marquées au DAPI (bleu) et à la phalloïdine (rouge) après 4 jours (ligne du haut) et 8 jours (ligne du bas) de culture. Echelle de 250 μm applicable à toutes les images et leur projection orthogonale. Encarts zoomés des cellules en haut à droite de chaque image avec une échelle de 50 μm applicable à tous. 176

Figure 102 : Implantation sous-cutanée des différents matériaux. Colonne (a) aspect macroscopique des hydrogels implantés indiqué par une flèche noire, échelle 3mm applicable à toutes les images de la colonne (a). Colonne (b) les explants de peau avec les matériaux implantés après 8 semaines, échelle 500 μm applicable à toutes les images de la colonne (b). Colonne (c) grossissement d'une zone des matériaux implantés à 8 semaines, marqués au DAPI (noir et blanc, inversion des couleurs), échelle 50 μm applicable à toutes les images de la colonne (c). 178

Figure 103 : (a) Surfaces résiduelles d'hydrogel rapportées à l'aire occupée par l'implant en (%) mesurée à partir de la Figure 102b. (b) Nombre de noyaux présents dans la zone occupée par l'implant

par 2500 μm^2 mesurée à partir de la Figure 102c. La significativité est représentée par “ * ” avec $p < 0,05$ et la non significativité par “ ns ” ($n \geq 4$)..... 180

Figure 104 : (a) Aspect macroscopique des plaies immédiatement (T0), à 3 et 7 jours après excision. (b) Représentations schématiques des aires de la plaie (gris) et des implants (en pointillés). (c) Superposition des représentations des aires à T0 et J7. Echelle 2,5mm applicable à toutes les images. 182

Figure 105 : (a) Suivi de l’aire des plaies rapportée à l’aire initiale de chacune des conditions ($n \geq 5$ pour biomatériaux et $n=1$ pour contrôle négatif). (b) Suivi du diamètre des implants au cours du temps rapporté au jour 1 ($n=5$). 184

Figure 106 : Coupes histologiques coloration H/E de l’ensemble du tissu (a à f). N/A pour « non applicable » car dans le contrôle négatif il n’y a pas de matrice. Les berges de la plaie sont représentées par les zones avec l’annotation “b” sur les images (a à f). Le lit de la plaie est indiqué par l’annotation “p” et la matrice par l’annotation “m” sur les images (a à f) avec une échelle pointillée de 1mm applicable à toute la colonne. Les agrandissements des berges de la plaie sont représentés sur les images (a’ à f’) et des matériaux implantés (b” à f”) avec des échelles noires de 250 μm applicables aux images de leur colonne respective. La flèche noire représente une couche entre la matrice et le lit de la plaie, et la flèche blanche une langue épithéliale..... 186

Figure 107 : Tests de compression mécanique. Augmentation progressive de la force normale appliquée de 0,1 à 1N. A chaque étape, une déformation de 0,1% est appliquée à une fréquence de 1Hz ($n=3$). Les résultats ont permis de fixer la force axiale de travail à $0,3 \pm 0,1\text{N}$. Cette valeur est celle pour laquelle un plateau de G' est obtenu, signe de compression de l’échantillon et non plus de maintien et comprend les limites de sensibilité de l’appareil (0,1N). 235

Figure 108 : Test de déformation d’oscillation. Un balayage d’oscillations d’amplitudes croissantes, comprises entre 0,01 et 10%, appliquées à une fréquence constante de 1 Hz ($n=3$) ont permis de déterminer le domaine de déformation linéaire. Lorsque la valeur de G' décroît de plus de 10%, on considère que la valeur correspondante est la limite supérieure du domaine de linéarité. Les résultats ont permis de fixer la contrainte appliquée à 0,1% d’amplitude, valeur pour laquelle tous les échantillons sont dans le domaine de déformation linéaire. 235

Figure 109 : Schéma explicatif du principe de la filtration tangentielle 237

Figure 110 : Chromatogrammes des produits (a) référence, (b) filtrat et (c) retentât issus de l’ultrafiltration..... 238

Figure 111 : Chromatogrammes des produits (a) filtrat et (b) retentât issus de la nanofiltration..... 240

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Molécules constitutives de la MEC [34], [36], [37]	11
Tableau 2 : Types d'ulcères.....	13
Tableau 3 : Classification des plaies selon le stade d'après le NPUAP [52]	14
Tableau 4 : Composition des pansements et application selon leurs propriétés [90]	24
Tableau 5 : Exemples de formulation de biomatériaux à base de polymères naturels.....	48
Tableau 6 : Relation entre les propriétés attendues d'un substitut cutané idéal et des propriétés apportées par un biomatériau	52
Tableau 7 : Substituts cutanés commercialisés, compositions et applications	55
Tableau 8 : Composition des différentes formulations étudiées.....	68
Tableau 9 : Tableau récapitulatif des dénominations des formulations réalisées avec l'actif A.....	71
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des dénominations des formulations réalisées avec l'actif B.....	71
Tableau 11 : Tableau récapitulatif des compositions en molécule A et collagène des systèmes combinés	74
Tableau 12 : Tableaux des produits pour la préparation des milieux de culture	79
Tableau 13 : Liste des kits et réactifs pour réaliser les immunomarquages.....	80
Tableau 14 : Liste des médicaments utilisés.....	88
Tableau 15: Lise des colorants et produits de montage	92
Tableau 16 : Tableau récapitulatif des dénominations et composition des formulations étudiées	97
Tableau 17 : Valeurs de taille de mailles calculées à partir de G' grâce à l'équation décrite par Kujipers et al. “#” et “*” représentent des différences significatives (p<0,05, n=4).....	108
Tableau 18 : Tableau récapitulatif des formulations développées en (§1.1)	115
Tableau 19 : Tableau récapitulatif des formulations synthétisées avec la molécule A.....	116
Tableau 20 : Tableau récapitulatif des valeurs de molécule A incorporée dans les différentes formulations. Comparaisons entre les méthodes avec “*” indiquant une différence significative et “ns” une absence de significativité (n=3, p<0,05 et p>0,05 respectivement).	118
Tableau 21 : Paramètres des courbes de libération de la molécule A calculés après régression linéaire (<i>in situ</i>) ou non linéaire (diffusion inverse et imprégnation). Logiciel Graphpad Prism® (V7).	120
Tableau 22 : Corrélation (r ²) et paramètres « k » et « n » issus de la modélisation de Korsmeyer&Peppas.....	122
Tableau 23 : Tableau récapitulatif des formulations synthétisées avec la molécule B	124

Tableau 24 : Tableau récapitulatif des valeurs de molécule B incorporée dans les différentes formulations. Comparaisons entre les méthodes avec “*”, “**” indiquant une différence significative (n=3, p<0,05 et p<0,01 respectivement).	126
Tableau 25 : Paramètres des courbes de libération de la molécule B calculés après régression linéaire (<i>in situ</i>) ou non linéaire (diffusion inverse). Logiciel Graphpad Prism® (V7).	127
Tableau 26 : Valeurs de corrélation au modèle (r^2), et des paramètres « k » et « n » calculés à partir de l'équation de Korsmeyer.....	128
Tableau 27 : Dénominations et concentrations initiales en collagène des formulations imprégnées. L'intensité de la coloration au RS a été observée macroscopiquement puis en fluorescence par microscopie confocale (Zeiss LSM 780, objectif 10x). Echelle 200µm.	158
Tableau 28 : Dénominations des formulations issues de la combinaison des méthodes d'incorporation de la molécule A et du collagène.....	160
Tableau 29 : Bilan des matières des produits de référence, du filtrat et du retentât.....	238
Tableau 30 : Valeurs des poids moléculaire en nombre (Mn) et des aires sous la courbe (AUC) des fractions correspondantes calculés à partir des chromatogrammes	239
Tableau 31 : Bilan des matières des produits de référence, du filtrat et du retentât.....	239
Tableau 32 : Valeurs des poids moléculaire en nombre (Mn) et des aires sous la courbe (AUC) des fractions correspondantes calculés à partir des chromatogrammes	240

ANNEXES

Annexe 1 : Tests mécaniques complémentaires

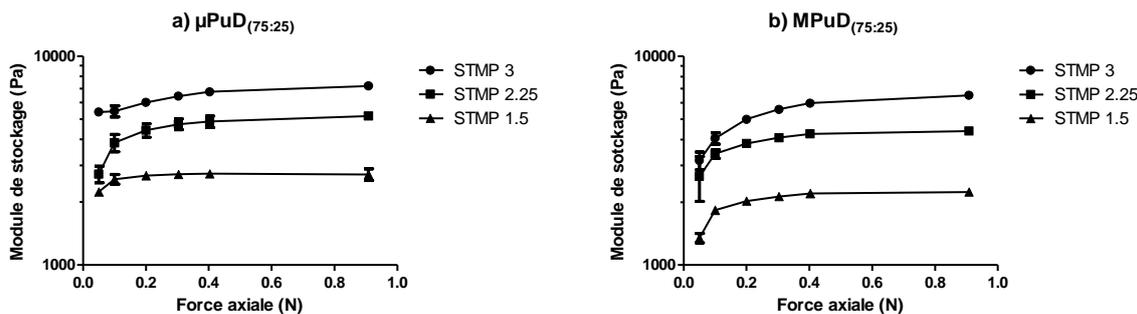


Figure 107 : Tests de compression mécanique. Augmentation progressive de la force normale appliquée de 0,1 à 1N. A chaque étape, une déformation de 0,1% est appliquée à une fréquence de 1Hz (n=3). Les résultats ont permis de fixer la force axiale de travail à $0,3 \pm 0,1\text{N}$. Cette valeur est celle pour laquelle un plateau de G' est obtenu, signe de compression de l'échantillon et non plus de maintien et comprend les limites de sensibilité de l'appareil (0,1N).

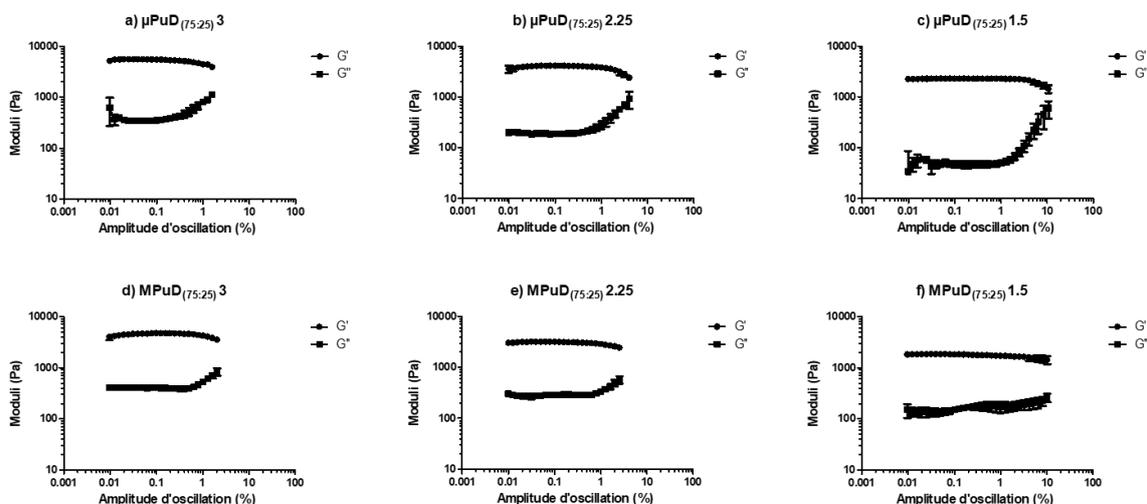


Figure 108 : Test de déformation d'oscillation. Un balayage d'oscillations d'amplitudes croissantes, comprises entre 0,01 et 10%, appliquées à une fréquence constante de 1 Hz (n=3) ont permis de déterminer le domaine de déformation linéaire. Lorsque la valeur de G' décroît de plus de 10%, on considère que la valeur correspondante est la limite supérieure du domaine de linéarité. Les résultats ont permis de fixer la contrainte appliquée à 0,1% d'amplitude, valeur pour laquelle tous les échantillons sont dans le domaine de déformation linéaire.

Annexe 2 : Etude de fractionnement de la molécule A

Méthode

La molécule A étant un produit très polydispersé ($I_{dp} > 2$), son fractionnement a été exploré par filtration tangentielle (Figure 109). La filtration tangentielle est un procédé de filtration destiné à séparer les particules d'un liquide par leur taille. Le flux du liquide est parallèle au filtre avec une pression appliquée perpendiculairement qui permet à la solution de traverser la membrane de filtration. Les particules plus petites que la taille de la membrane passent au travers tandis que les plus grandes continuent leur route avec le flux. Dans le cadre de cette étude, deux tailles de membranes ont été utilisées : 5kDa pour l'ultrafiltration et la 1 kDa pour la nanofiltration.

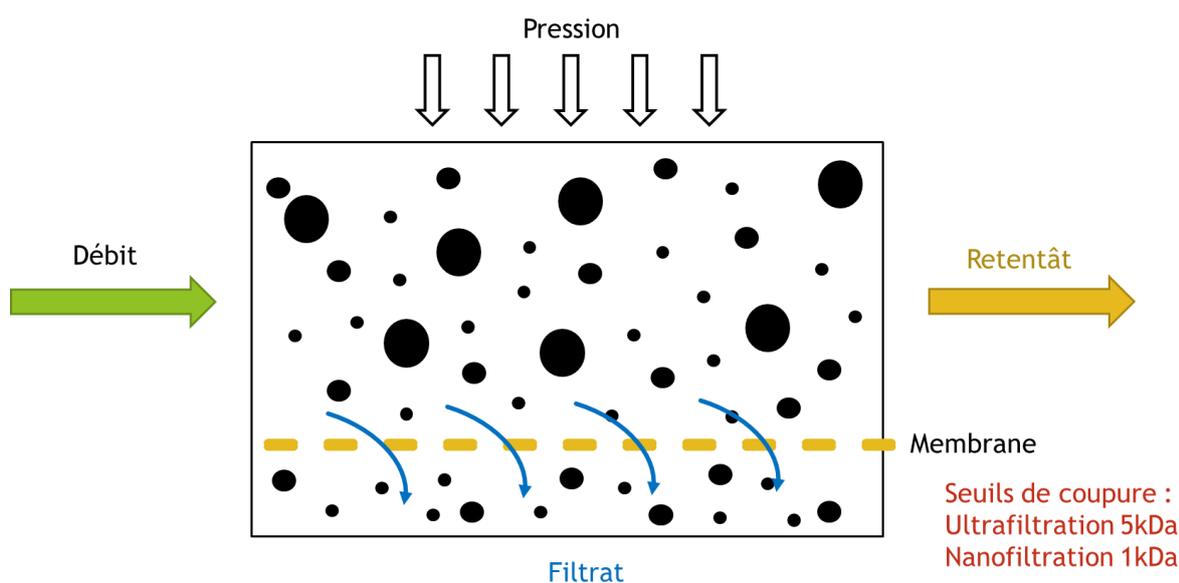


Figure 109 : Schéma explicatif du principe de la filtration tangentielle

Un rétentat et un filtrat sont obtenus. Les produits du fractionnement et le produit non fractionné ont été filtrés sur presse (FP, 101.H pour l'ultrafiltration et AF9 pour la nanofiltration) puis subit une filtration stérilisante (FS, 0,45 et 0,2 μ m) avant d'être lyophilisés. Les produits obtenus par les deux méthodes de filtration ont été caractérisés par un bilan de matière (Tableau 29 et Tableau 31) et par UPLC (Tableau 30, Figure 110 et Tableau 32, Figure 111).

Résultats : Ultrafiltration

Tableau 29 : Bilan des matières des produits de référence, du filtrat et du retentât.

	Référence	Filtrat	Retentât
Indice de réfraction (IR)	3,5	3	9
Matières sèches (MS)	35,6 g/L	22,9 g/L	92 g/L
Dosage sucres totaux	33,9 g/L	19,0 g/L	88,5 g/L
Pureté = $\frac{[\text{Sucres}]}{[\text{MS}]} \times 100$	95,2 %	83,0 %	96,2 %
Bilan matière			
Volume	1L	5,3 L	2 L
Quantité MS	35,6 g	115 g	184 g
Rendement	75,4 %	FS : 27 % FP/FS : 36 %	FS : 43,3 % FP/FS : 57,5 %

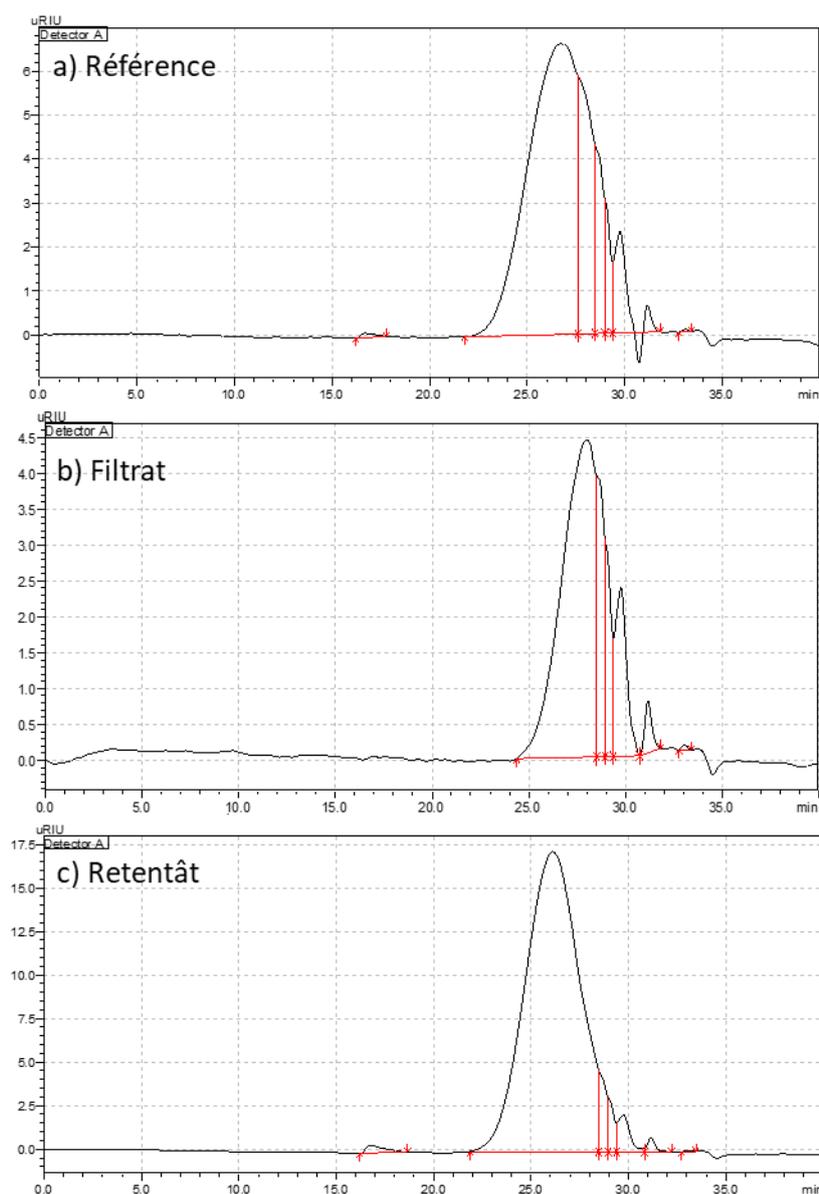


Figure 110 : Chromatogrammes des produits (a) référence, (b) filtrat et (c) retentât issus de l'ultrafiltration

Tableau 30 : Valeurs des poids moléculaire en nombre (Mn) et des aires sous la courbe (AUC) des fractions correspondantes calculés à partir des chromatogrammes

Temps de rétention	Référence		Filtrat		Retentât	
	Mn	AUC	Mn	AUC	Mn	AUC
16 min	19,6 kDa*	10x10 ³ *	-	-	18716 kDa*	58x10 ³ *
26 min	3,2 kDa	2231x10 ³	-	-	5,4 kDa	6603x10 ³
27 min	1,5 kDa	554x10 ³	1,1 kDa	1059x10 ³	-	-
>28 min	<0,7kDa	532x10 ³	<0,7 kDa	504x10 ³	<0,7 kDa	539x10 ³

*valeurs hors gamme de calibration

L'IR de la molécule A donne un indice sur sa concentration : IRx10 équivaut à la concentration en g/L avec une pureté en sucre >80% (Tableau 29).

Un pic de faible intensité à Tr = 16 min a été observé pour les échantillons (Figure 110 et Tableau 30): Référence et Retentât. Ce temps de rétention est hors gamme mais il correspond à un très haut poids moléculaire. Le profil du filtrat présente de plus petits sucres et plus dilué. Tandis que le profil du retentât présente de plus gros sucres plus concentrés. Les produits ont bien été séparés en deux gammes de taille par rapport à la référence.

Résultats : nanofiltration

Tableau 31 : Bilan des matières des produits de référence, du filtrat et du retentât.

	Référence	Filtrat	Retentât
Indice de réfraction (IR)	5,0	0,4	12,8
Matières sèches (MS)	47,2 g/L	1,8 g/L	117,7 g/L
Dosage sucres totaux (CQ)	41,4 g/L	2,7 ± 0,2 g/L	119 g/L ± 10 g/L
Bilan matière	Volume	4,5 L	5 L
	Quantité sucres	186,3 g	13,5 g
	Rendement	100 %	7,25 %

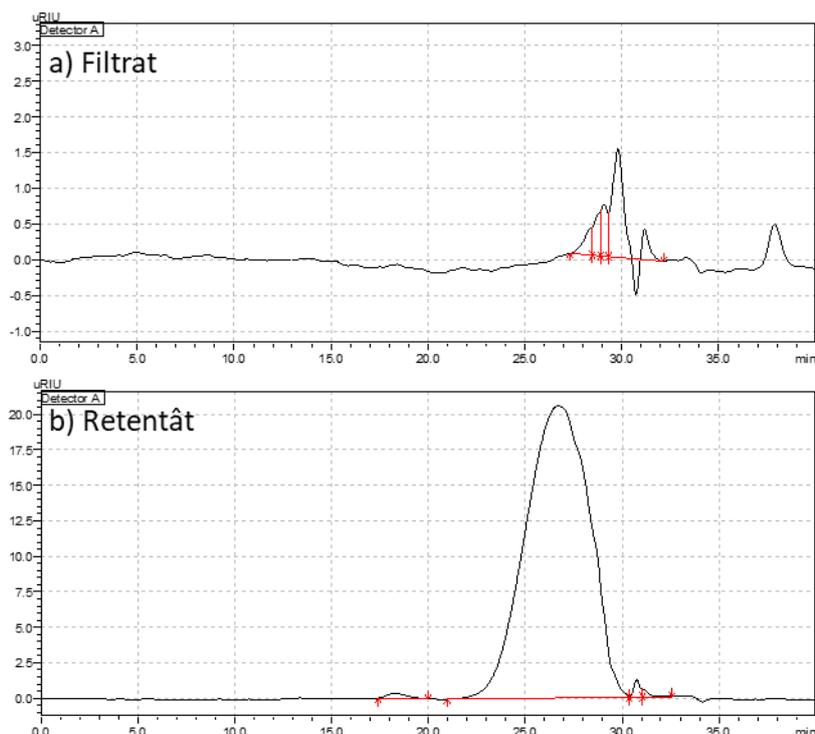


Figure 111 : Chromatogrammes des produits (a) filtrat et (b) retentât issus de la nanofiltration

Tableau 32 : Valeurs des poids moléculaire en nombre (Mn) et des aires sous la courbe (AUC) des fractions correspondantes calculés à partir des chromatogrammes

Temps de rétention	Filtrat		Retentât	
	Mn	AUC	Mn	AUC
18 min	-	-	5,3 kDa*	50x10 ³ *
26 min	-	-	3,7 kDa	9482x10 ³
28 min	0,8 kDa	24x10 ³	-	-
29 min	0,5 kDa	58x10 ³	-	-
30 min	0,3 kDa	126x10 ³	0,2 kDa	55x10 ³

*valeurs hors gamme de calibration

Le filtrat obtenu à un Mn inférieur à 1 kDa et est bien constitué de sucres comme démontré par le dosage des sucres totaux (Tableau 31). Les profils chromatographiques obtenus du retentât et du filtrat correspondent bien à une coupure à 1kDa étant celle du filtre utilisé (Figure 111 et Tableau 32).

Conclusion

Ces études de fractionnements ont permis d'obtenir plusieurs fractions de la molécule A de poids moléculaires moyens différents. La suite de ces études consisterait à réaliser des tests d'efficacité cellulaire de chacune des fractions isolées.

Annexe 3 : Publications scientifiques

Journal of Materials Science: Materials in Medicine (2018)29:77
<https://doi.org/10.1007/s10856-018-6085-x>

SPECIAL ISSUE: ESB 2017



Original Research

Effect of cross-linking on the physicochemical and *in vitro* properties of pullulan/dextran microbeads

Soraya Lanouar^{1,2,3} · Rachida Aid-Launais^{1,2,4} · Ana Oliveira^{1,2} · Laurent Bidault³ · Brigitte Closs^{3,5} · Marie-Noëlle Labour^{1,2} · Didier Letourneur^{1,2,5}

Received: 18 December 2017 / Accepted: 5 May 2018
 © Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2018

Abstract

Hydrogels are very promising for tissue engineering as they provide scaffolds and a suitable microenvironment to control cell behavior and tissue regeneration. We used a patented method to obtain beads of pullulan/dextran cross-linked with sodium trimetaphosphate (STMP), that were already described for *in vivo* bone repair. The aim of this study was to provide a comparative analysis of microbeads made of polysaccharides prepared using three different STMP feeding ratio of 1.5, 2.25 or 3 % w/w. The morphology, swelling and biodegradability of these structures were assessed. Mesenchymal stem cells were also seeded to evaluate the cell organization onto the beads. We found that the amount of phosphorus resulting from the cross-linking was proportional to the introduced STMP concentration. An increase of cross-linking decreased the *in vitro* enzymatic degradability, and also decreased the swelling in PBS or water. The microstructures observed by SEM and confocal microscopy indicated that homogeneous spherical microbeads were obtained, except for the lower cross-linking ratio where the shapes were altered. Beads hydrated in PBS exhibited a mean diameter ranging from 400 to 550 μm with the decrease of STMP ratio. Cells adhered to the surface of microbeads even in the absence of protein coating. Cell viability studies revealed an increase in cell numbers over two weeks for the highest cross-linked beads, whereas the two lowest STMP concentrations induced a decrease of cell viability. Overall, this study demonstrated that pullulan/dextran hydrogels can be designed as microbeads with adjustable physicochemical and biological properties to fulfill requirements for tissue engineering approaches.

1 Introduction

Tissue engineering is an interdisciplinary field that combines engineering and biological strategies to develop biological substitutes that restore, maintain or improve tissue function [1], [2]. It generally relies on three strategies that can interact with each other: cellular therapy, signaling substances and biomaterial engineering. The latest aims to design biocompatible and biodegradable tridimensional (3D) scaffolds tunable in terms of mechanical and chemical properties and that mimic the natural features of extracellular matrix (ECM). The goal is to provide an optimal microenvironment for tissue growth and regeneration [3, 4], providing a surface for cell adhesion with appropriate physical and mechanical properties and allowing diffusion of gases and nutrients [5–7]. Hydrogels are widely used in this field, thanks to their polymeric network, that act as a 3D scaffolds for tissue regeneration [8–10]. The main objectives in designing scaffolds are to afford appropriate

These authors contributed equally: Soraya Lanouar, Rachida Aid-Launais.

✉ Didier Letourneur
didier.letourneur@inserm.fr

¹ INSERM U 1148, Laboratory of Vascular Translational Science; X. Bichat Hospital, University Paris Diderot, 46 rue H. Huchard, 75018 Paris, France

² Institut Galilée, University Paris 13, 99 av JB Clément, 93430 Villetaneuse, France

³ SILAB SA, Zac de la Nau, 19240 Saint-Viance, France

⁴ FRIM, INSERM UMS 034, University Paris Diderot, X. Bichat Hospital, 75018 Paris, France

⁵ SILTISS SA, Zac de la Nau, 19240 Saint-Viance, France

Published online: 29 May 2018

Springer

physicochemical properties, biocompatibility and biodegradability that meet the needs for a specific tissue.

In this study, chemically cross-linked hydrogels were prepared with two natural clinically approved polysaccharides: pullulan and dextran. Natural polymers, like the hydrophilic naturally derived polysaccharides, are a choice material for designing hydrogels due to their biochemical similarity with the native extracellular matrix (ECM) and good biocompatibility [11]. Thereby, the combination of these polymers has already been used to design hydrogel with suitable properties for several biomedical engineering applications [12–14]. Dextran is a non-toxic polysaccharide that can be biodegraded by dextranase, an enzyme that is present in mammalian tissues, including humans. It is synthesized from sucrose by bacteria, and structurally acquires α -1,6-glycosidic linkages, with side chains α -1,2, α -1,3 or α -1,4-linked to the backbone [15, 16]. It is currently used as a volume expander for medicine [17] with anticoagulant and fibrinolytic activities [18]. Pullulan is a linear and neutral polysaccharide produced by starch fermentation with *Aureobasidium pullulan* fungus. It is already used as material for medical and food applications especially for 100% natural capsules [19, 20]. It is non-immunogenic and can be degraded enzymatically. Indeed, it has been reported that pullulan can be degraded by other glucosidases such as α 1.4-amylase (EC 3.2.1.1) which is present in saliva and pancreas, and can be also slowly degraded by in serum and liver homogenate [21]. Its glucose units are linked through α -1.6- and α -1.4-glycosidic bounds and it can be chemically modified [22, 23]. To obtain materials from these two water soluble polysaccharides, cross-linking strategies were used [12, 13]. Among several agents, Sodium TriMetaPhosphate (STMP) is a non-toxic cyclic triphosphate that can cross-link polysaccharides through ester linkages [6]. It has been used in numerous biomedical, pharmaceutical, and biotechnological applications, and is FDA approved for food grade starches [24]. Here, the shape of the resulting hydrogels is presented under the form of microbeads.

This study uses patented invention of cross-linked polysaccharides microbeads [25, 26] for biomedical applications. We investigated whether a polysaccharide hydrogel obtained with three cross-linking degrees could affect physicochemical properties of the material and cell response. The goal of modulating the amount of cross-linking was to propose different degradation rates, avoiding fibrosis, and offering hydrogel stiffness that can protect and support cell viability for the appropriate time. For this purpose, morphology, swelling and enzymatic degradation kinetics were assessed, as well as *in vitro* cell viability.

2 Materials and methods

2.1 Materials

Pullulan (MW 200 000) and dextran (MW 500 000) were obtained from Hayashibara Inc, Okayama, Japan and Pharmacosmos respectively. FITC-dextran (dextran labeled with fluorescein isothiocyanate, TdB consultancy®) was used to label the hydrogels. All other chemicals were obtained from Sigma-Aldrich®.

2.2 Synthesis of cross-linked polysaccharides

Three formulations were prepared with the same concentrations of polysaccharides. Hydrogels preparation is based on a patented method from the laboratory [25, 26]. Briefly, pullulan and dextran (75:25 w/w) were dissolved in water and the cross-linking of the polysaccharides was carried out using three concentrations of sodium trimetaphosphate (STMP): 1.5% (w/w), 2.25% (w/w) and 3% (w/w) (referenced as STMP_{1.5}, STMP_{2.25} and STMP₃, respectively) in 1 M sodium hydroxide. 1% FITC-dextran was added to the solution as a fluorescent tracer. To form the microbeads, the solution was dispersed in oil under mechanical stirring. Microbeads were collected using a sieve shaker (Retsch, AS 200 basic) with different sieve sizes. Microbeads with a size from 300 to 500 μ m diameter were selected owing to their injectability for defect filling applications [27]. The scaffolds were washed extensively with Phosphate Buffered Saline (PBS) and 0.025% NaCl solution before freeze-drying. The freeze-drying process relies on two controlled steps: a first freezing phase of the samples at -20 °C followed by a sublimation phase with an increase of temperature up to 30 °C.

2.3 Morphology

Structure and porosity of the dried microbeads were analyzed by scanning electron microscopy using a JOEL CarryScope in low vacuum mode. Samples were observed in secondary electron mode at an accelerating voltage of 20 kV. Scaffolds prepared with 1% FITC-dextran were also analyzed by confocal microscopy after hydration in PBS (Carl Zeiss® LSM 780, objective x10).

Microbeads size distribution was determined using the Mastersizer 3000 Laser (Malvern Instruments, Orsay, France) after hydration in PBS or water for 2 h. Six measurements were done for each sample.

2.4 Cross-linking degree assessment

Phosphorus content was investigated to evaluate the cross-linking ratio of the polysaccharide hydrogels according to a

previous study [28]. 20 mg of the freeze-dried materials were incubated in 10% HNO₃ at 105 °C until gel dissolution was complete. Ammonium metavanadate (NH₄VO₃) and ammonium heptamolybdate ((NH₄)₆Mo₇O₂₄) were then added to the dissolved hydrogel solution and optical density was determined at 405 nm by spectrophotometry (Infinite M200 Pro, TECAN®). The phosphorus content was determined by using a calibration range with a phosphoric acid (H₃PO₄) solution. At least three replicates were used for each formulation and results were expressed as mean values ± standard deviation (SD).

2.5 Swelling ratio

The solvent absorption capacity of the hydrogels was determined by swelling freeze-dried samples in PBS and in water. The freeze-dried scaffolds were weighted before immersion and after hydration for at least 24 h. The excess of liquid was carefully removed, and the samples were weighed to determine the swelling ratio using the following equation [29]:

$$S_w = \frac{W_s - W_i}{W_i}$$

Where S_w is the swelling ratio, W_s the swollen weight and W_i the dried weight. At least 3 replicates were analyzed for each condition.

2.6 In vitro degradation

Samples of 5 mg were hydrated in PBS. After complete hydration, samples were weighted and placed into a solution containing 10% (v/v) pullulanase and 5% (v/v) dextranase as previously reported [6]. The immersed samples were incubated at 37 °C and weighted every 10 minutes after removing the excess of solution until no relevant mass loss was observed. The polymer degradation was estimated from the mass loss at each time point, based on the following equation:

$$W_t = \frac{W_d}{W_0} \times 100$$

Where W_t is the % residual mass at each time point, W_0 is the initial weight of the hydrated sample and W_d is the gel weight at each time point. Degradation rate was calculated using the slope of the degradation curves. Four samples were analyzed for each condition.

2.7 Mesenchymal stem cell culture

Cell attachment and survival *in vitro* were assessed using porcine primary bone-marrow derived Mesenchymal Stem Cells (MSC) in Dulbecco's Modified Eagle Medium

supplemented with 20% fetal bovine serum and 1% Antibiotic-Antimycotic solution. Scaffolds were submitted to UV light for 15 minutes before use in cell culture experiments. A solution of 10 µL of growth medium containing 35 000 MSC was then added onto microbeads. The seeded hydrogels were incubated in growth medium in a humidified atmosphere with 5% CO₂ at 37 °C for 14 days. Cell viability and morphology were assessed at days 3, 7 and 14. Cell viability was assessed by a quantification of metabolic activity using a resazurin based reagent (In vitro Toxicology Assay Kit, Sigma Aldrich®) following the manufacturer's instructions. A standard curve was established with cells in suspension to evaluate cell number. Cell morphology and localization were assessed after staining with phalloidin-TRITC and DAPI (Diamidino-Phenyl-Indol). Cells were fixed in 4% paraformaldehyde, washed three times with PBS and permeabilized using 0,1% Triton X100 for 30 minutes at room temperature. After washing with PBS, the cells were incubated for 30 min in a solution containing 50 µg/mL of phalloidin-TRITC and 1 µg/mL DAPI. Cells were then washed and observed using a confocal fluorescence microscope (Carl Zeiss LSM 780 fitted with a 10× objective). Images were treated with ZEN software or Fiji® freeware. At least five replicates for each condition were analyzed.

2.8 Statistical analyses

All experiments were performed at least in triplicate. All results were presented as mean ± standard deviation (SD). GraphPad Prism® 5.0 software was used to perform statistical analysis using one-way ANOVA with Tukey post-test for size measurements, phosphorus content, swelling ratio and degradation rate and 2-way ANOVA with Bonferroni post-test for degradation kinetic and cell viability. Statistical significance was denoted as * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

3 Results

3.1 Structure analysis

To evaluate the morphological differences in the preparation of Pullulan/Dextran beads using different concentrations of the crosslinking agent, STMP (STMP₃, STMP_{2,25}, STMP_{1,5}), the size, shape and porosity were analyzed. All scaffolds were efficiently cross-linked and freeze-dried allowing longterm preservation. Upon hydration, microbeads were transparent with a smooth surface (Fig. 1), easy to handle and can be kept for several days in physiological solutions.

Pullulan/Dextran microspheres were successfully formed and their size can be selected by sieving. Microbeads sieved

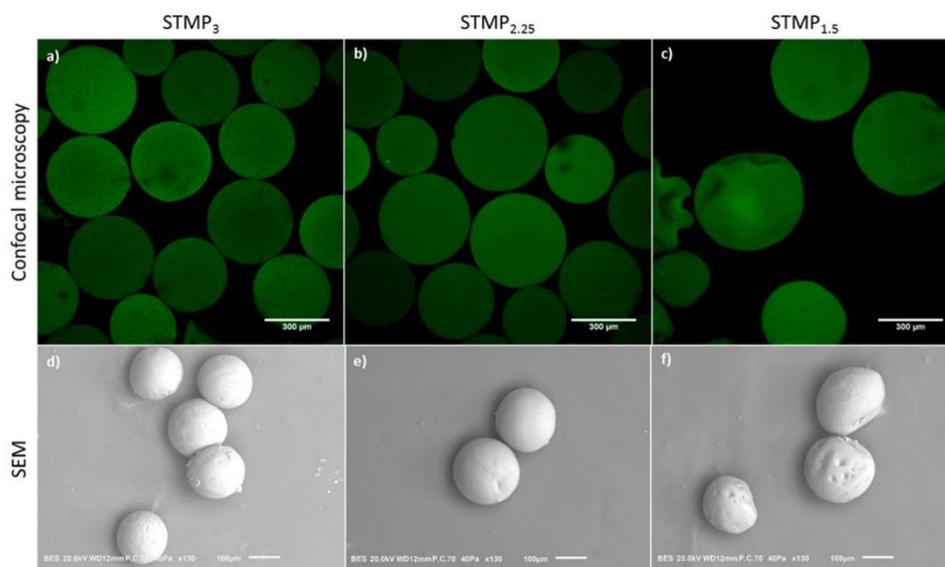


Fig. 1 Morphology of pullulan/dextran microbeads prepared using different concentrations (w/w) of the cross-linking agent, STMP (STMP₃, STMP_{2.25}, STMP_{1.5}). Images **a**, **b** and **c** were obtained on hydrated beads by fluorescence confocal laser microscopy (objective

x10). Beads were prepared using FITC-Dextran. Images **d**, **e** and **f** are views observed by SEM (x130) on dried pullulan/dextran beads. Scales are 300 µm and 100 µm for confocal and scanning electron microscopies, respectively

at 300–500 µm presented a spherical shape for all STMP concentrations, although some STMP_{1.5} microbeads presented an irregular surface (Fig. 1). Pores were almost not visible for all the microbeads. Size analysis revealed that 90% of the microbeads in PBS present diameters inferior to 595 ± 11.2 , 742 ± 6.87 , and 817 ± 15.6 µm for STMP₃, STMP_{2.25} and STMP_{1.5}, respectively (Table 1). The mean value of the particle size distribution (D50) was 414 ± 4.1 , 460 ± 2.4 , 553 ± 5.0 µm for STMP₃, STMP_{2.25} and STMP_{1.5}, respectively. The size of microbeads increased with a decrease of STMP concentration. We also observed significantly higher sizes for all formulations when the beads were hydrated in water (Table 1).

3.2 Physico-chemical characterizations

To study the influence of the cross-linking ratio, we investigated the swelling behavior and enzymatic degradability of the scaffolds. Firstly, to confirm the presence of covalent links between the polysaccharide chains due to STMP, we quantified the phosphorus content of the three formulations. As expected, the amount of phosphorus was increased with increasing STMP concentration (Table 2).

Swelling measurements were conducted in water and in PBS. By increasing the amount of introduced STMP, the swelling ratio was decreased (Fig. 2). Indeed, the swelling

ratio in PBS of STMP₃ beads ($Sw = 8.5 \pm 0.3$) was significantly lower than STMP_{2.25} and STMP_{1.5} (10.1 ± 0.1 for STMP_{2.25}; 11.4 ± 1.5 for STMP_{1.5}). The same trend ($p < 0.05$) was observed for STMP₃, STMP_{2.25}, STMP_{1.5} microbeads in water, with swelling ratio 4 times higher.

The *in vitro* degradability has been investigated using specific enzymes for the polymers that constituted the bead structure: pullulanase and dextranase (Fig. 3). The STMP₃ microbeads were degraded in 40 min whereas a complete degradation of the lower cross-linked microbeads (STMP_{1.5}) was reached after only 20 min. The degradation rates, calculated from these kinetics and reported in Table 2, show that degradation rates were increased with the increase of STMP concentration in microbeads.

3.3 Culture of MSCs

To determine the cell behavior on these tissue-engineering scaffolds, primary bone-marrow MSCs were seeded on microbeads and cultured up to 14 days. Cell morphology on FITC-dextran microbeads (Fig. 4) was evaluated after cell staining. On microbeads, which do not allow cell infiltration, cells adhered on the surface for all microbeads formulations at all time points. The cell density increased with time for STMP₃ (Fig. 4, Top row, right column). At Day 3, a higher number of living cells was witnessed on the

Table 1 Size distribution of pullulan/dextran microbeads prepared using different concentrations (w/w) of the cross-linking agent, STMP (STMP₃, STMP_{2.25}, STMP_{1.5})

Formulations	D ₁₀ (μm)		D ₅₀ (μm)		D ₉₀ (μm)	
	PBS	H ₂ O	PBS	H ₂ O	PBS	H ₂ O
STMP ₃	277 ± 1.2	407 ± 26.6	414 ± 4.1	680 ± 90.9	595 ± 11.2	975 ± 13.5
STMP _{2.25}	276 ± 1.0	447 ± 27.7	460 ± 2.4	781 ± 26.2	742 ± 6.9	1190 ± 10.8
STMP _{1.5}	368 ± 2.7	540 ± 16.9	553 ± 5.0	1250 ± 22.9	817 ± 15.6	2370 ± 19.2

Results after immersion of freeze-dried beads in PBS or water are mean values ± SD ($n = 6$) obtained using a laser dynamic scattering particle size-measuring instrument. The D₅₀ is the median value of the particle size distribution. D₉₀ describes the diameter where 90% of the distribution has a smaller particle size and ten percent has a larger particle size. The D₁₀ diameter has 10% smaller and 90% larger. *** indicates a significant difference with $p < 0.001$ between the formulations, and §§§ a significant difference with $p < 0.001$ between values in PBS and water

Table 2 Characterizations of pullulan/dextran microbeads prepared using different concentrations (w/w) of the cross-linking agent, STMP (STMP₃, STMP_{2.25}, STMP_{1.5})

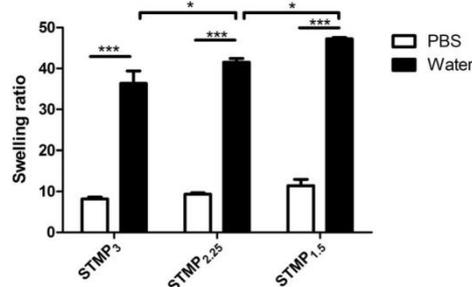
Formulations	Phosphorus content (μmol/g)	Degradation rates (mg/min)
STMP ₃	187.6 ± 7.1	0.86 ± 0.04
STMP _{2.25}	66.5 ± 18.8	1.47 ± 0.05
STMP _{1.5}	38.2 ± 8.0	3.34 ± 0.60

Phosphorus content and in vitro degradation rates of pullulan/dextran microbeads were calculated as indicated in the Materials and Methods. Results are presented as mean values ± SD ($n = 3$). ** and *** indicate a significant difference between the formulations with $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively

microbeads prepared with STMP_{1.5} and STMP_{2.25} than on the STMP₃ beads (Fig. 5). From Day 7 to 14, the cell number gradually decreased for two formulations of microbeads with low STMP concentrations, whereas an increase of cell number was noticed on STMP₃ microbeads (Fig. 5). All together, these results suggest that the bead geometry is suitable for cell adhesion and the most cross-linked matrices (STMP₃) induced MSC proliferation.

4 Discussion

The aim of this study was to investigate the biophysical properties of polysaccharide microbeads with different cross-linking ratio.

**Fig. 2** Swelling of pullulan/dextran microbeads prepared using different concentrations (w/w) of the cross-linking agent, STMP (STMP₃, STMP_{2.25}, STMP_{1.5}). The samples were hydrated in PBS or in water for 24 h. Results are presented as means values ± SD ($n = 3$) from dried state. * and *** indicate a significant difference between formulations with $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively

The cross-linking ratio is known to affect stiffness, swelling and degradation rate of a polymeric material [28, 29]. The maximum swelling capabilities was obtained in less cross-linked hydrogels (Fig. 2). Increasing the cross-linker content with STMP prevented solvent molecules from penetrating into the scaffolds. The swelling ability of the hydrogel was thus strongly influenced by the cross-linking, the phosphate anionic charges evidenced by Lack et al. on pullulan cross-linked with STMP [30] generate electrostatic repulsion between the neighboring chains of the polysaccharides. In water, hydrophilic polysaccharides such as pullulan and dextran exhibit a high-water absorption capacity due to a high number of hydroxyl groups therefore

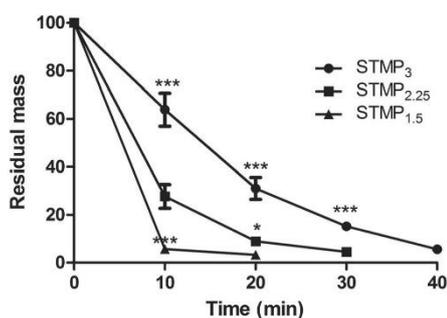


Fig. 3 *In vitro* enzymatic degradation kinetics of hydrated pullulan/dextran microbeads prepared using different concentrations (w/w) of the cross-linking agent, STMP (STMP₃, STMP_{2.25}, STMP_{1.5}). Residual mass of the samples after incubation with pullulanase/dextranase solution was weighted every 10 min. Four samples were analyzed for each time point. * and *** indicate a significant difference between the other formulations with $p < 0.05$ and $p < 0.001$, respectively

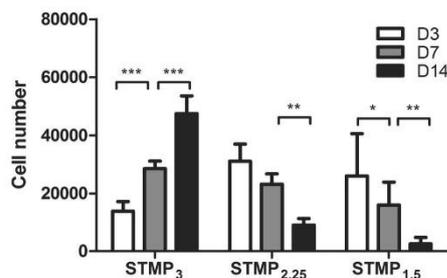


Fig. 5 Cell viability on pullulan/dextran microbeads with formulations of STMP₃, STMP_{2.25}, STMP_{1.5}. Viability of primary bone-marrow mesenchymal stem cells was assessed by quantification of metabolic activity using a resazurin-based reagent. A standard curve was established with cells in suspension to evaluate cell numbers. Values represent the calculated number of live cells (mean \pm SD; $n = 5$) on microbeads at Day 3 (white bars), Day 7 (grey bars) and Day 14 (black bars). *, ** and *** indicate a significant difference with $p < 0.05$, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively

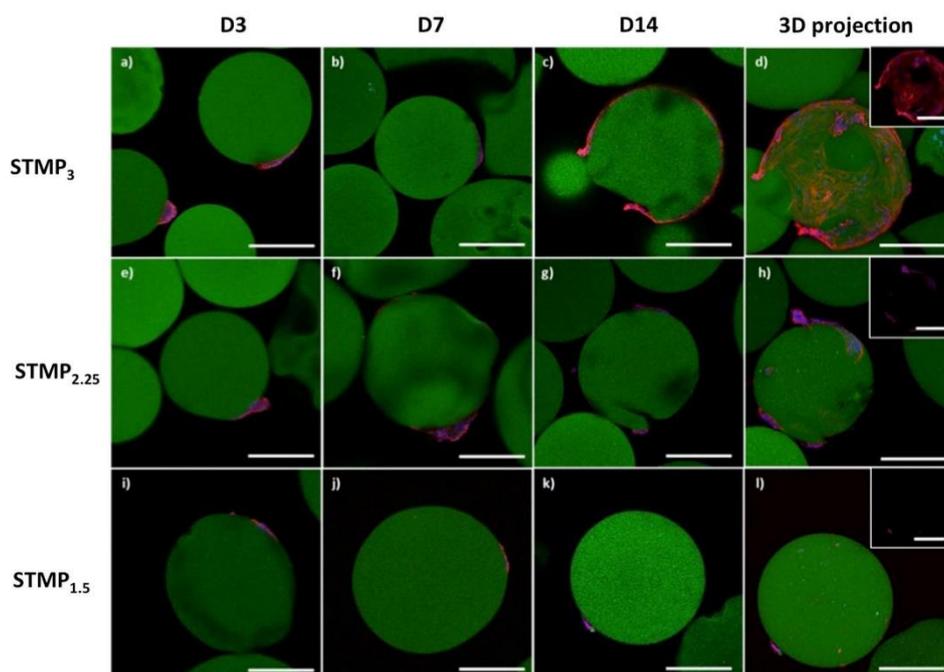


Fig. 4 Cellular analysis of primary bone-marrow mesenchymal stem cells seeded on FITC pullulan/dextran microbeads and stained with DAPI/phalloidin. Images at Day 3 (a, e, i), Day 7 (b, f, j) and Day 14 (c, g, k) showing cross-sections of beads with formulations using STMP₃ (a–c), STMP_{2.25} (e–g), STMP_{1.5} (i–k). Images d, h and l

represent 3D projections at Day 14 (right column) for the three formulations with or without FITC overlay (insert). Images were observed with Carl Zeiss LSM780 confocal fluorescence microscope and were treated with Zen software. All scale bars = 200 μ m

explaining the larger amount of water absorbed, with 4 times higher swelling rates as compared to saline solutions (Fig. 2). Swelling has been reported as a crucial feature for mass diffusion (nutrients, oxygen, and waste products) particularly during tissue regeneration that requires a high metabolic activity. The modulation of solvent absorption abilities and mass transport are thus interesting characteristics of these pullulan/dextran hydrogels for tissue engineering and drug delivery applications [14, 31–33].

The use of higher concentrations of STMP was found to slow enzymatic *in vitro* degradation rates of the microbeads. Indeed, the increase of phosphorous bounds in the network (Table 2) restricted access of the pullulanase and dextranase to their target sites, the glycosidic bounds [34]. This system is therefore of particular interest to adapt degradation rate to specific applications. The enzymes of this *in vitro* experiment are specific of the two polysaccharides of the bead structure. Indeed, the dextranase, cleaves the α -1,6 dextran bounds, and the pullulanase cleaves α -1,6 pullulan bounds. Dextranase is found in the colon, the spleen, kidneys, the lung [35] and in the mouth [36, 37]. Pullulanase does not exist in the organism but pullulan is expected to be biodegraded by hydrolysis of the glycosidic bounds through physiological process [38], notably by the α -1,4-amylase present in saliva and pancreas [21]. Our enzymatic degradation study does not completely mimic *in vivo* conditions, but allowed to study the influence of the cross-linking ratio on the biodegradability by glycosidic clivages of these microbeads.

The size of microbeads was the result of an emulsion synthesis method and a sieving process. We obtained homogeneous spherical beads. Only the lower STMP ratio evidenced some altered morphologies observed by SEM in dried state, or by confocal microscopy in hydrated state (Fig. 1). With the range of used sievers (300–500 μ m), the microbeads in PBS have a median size of 400 μ m for STMP₃ to 550 μ m for STMP_{1.5}. Again, STMP modulated this parameter, with a decrease of STMP feeding ratio that increased the size of microbeads. As expected, the size of microbeads was also larger in water than in saline solution (Table 1). We did not observed any macroporosity (>10 μ m) for the tested formulations. Increasing the amount of crosslinker creates more phosphorus bounds between polysaccharides chains that also interfere with ice-crystals formation during the freeze drying process of hydrogels [39, 40]. It is also important to note that the freeze-drying process modulated the macro and microporosities of the hydrogel structures [41, 42]. By controlling the freeze-drying parameters and the addition of porogens in the initial polysaccharide solution, we could modulated the formation of pores in the microbeads. For instance, our previous data demonstrated the obtention of larger pores for microbeads of >600 μ m diameter with these polysaccharide solutions

[27]. In the range of sizes obtained in this study (400–500 μ m), only few macropores accessible to cells were evidenced in the beads. A complete characterization of micro and macroporosities in relation to STMP concentration and bead sizes is still to be investigated. This will further allow to perform a complete physical characterization of the different beads (Young moduli, mesh size, number average molecular weight between cross-links ...).

The use of STMP as a cross-linking agent results on phosphate bridge formation between pullulan and dextran polymer chains [30]. The cross-linking creates covalent bridges which affect the macroscopic behavior of the hydrogel *in vivo* and the cell colonization [37, 43]. *In vitro* cell culture studies using primary bone-marrow mesenchymal stem cells have shown here that microbeads seemed to be suitable for cell attachment, even in the absence of a protein coating. 3 days after seeding, we observed a higher number of live cells for the less crosslinked formulations compared to the most crosslinked. This phenomenon can be related to the size distribution of the microbeads which is inversely related to the concentration of STMP used (Table 1). Indeed, the less crosslinked microbeads are bigger in size and offer a larger surface area. MSCs are of particular interest since they are able to differentiate in several tissue-specific cells and they could be easily obtained for autologous cell therapy [44]. We found that hydrogels weakly cross-linked did not support cell survival probably due to a poor material stiffness. In contrast, cellular *in vitro* studies revealed that the most cross-linked microbeads demonstrated a cell proliferation over the 2 weeks (Figs. 4, 5). These results are in line with other studies on MSC behavior that confirm the preference of these cells for hydrogels with higher mechanical strength [45] and stiffer surface [46]. Moreover, the correlation between material stiffness and MSC differentiation have already been highlighted. As a matter of fact, other studies have demonstrated that cells seeded on a softer hydrogel will lead to neurogenic differentiation, whereas cells seeded on a stiffer hydrogel lead to myogenic and osteogenic differentiation [47, 48]. Mesenchymal stem cell morphology was fibroblastic-like on microbeads similarly to what is observed in 2D systems. This is not surprising given that this system can be assimilated to 2.5 dimensions as the cells can adhere only to the surface of the large microbeads. The STMP₃ formulations could therefore be a more promising support for cell proliferation certainly due to more suitable mechanical properties [49, 50]. *In vitro* differentiation of human embryonic stem cells, adipose derived stromal cells and megakaryocyte cells have already been successfully conducted with this type of pullulan/dextran hydrogel under the shape of 3D porous discs [51–53]. The injectability of microbeads and their ability to fill up a defect with complex geometries is attractive for the pullulan/dextran microbeads

for instance in bone regeneration [27, 54–56]. Therefore, this study demonstrated the potential of these polysaccharide scaffolds to provide an implantable system with controlled architecture and physicochemical properties adapted to specific applications in tissue engineering.

5 Conclusion

In the present study, we have demonstrated that the cross-linking ratio of polysaccharide microbeads influenced material structure and subsequently cell adhesion and proliferation *in vitro*. Hydrogels cross-linked with sodium trimetaphosphate at different cross-linking degree present significant differences in terms of water absorption capabilities and enzymatic degradation. Mesenchymal stem cell adhesion and proliferation are highly dependent on these properties and can be tuned to control cell fate. With a simple preparation process and the modulation of physicochemical parameters, these scaffolds appear to offer a wide range of properties for promising tissue engineering applications.

Acknowledgements The works at INSERM U1148 were supported by Inserm, University Paris 13 and University Paris Diderot. The authors would like to express their gratitude to Samira Benadda from the Cellular and Tissue Imaging Platform (CRI, U1149) for technical assistance on confocal microscopy experiments. SILTISS SA is grateful to funding support from Bpifrance and Conseil Régional Nouvelle-Aquitaine. INSERM U1148 and SILAB are supported by ANR-16-CE18-0023 “Healskin”.

Compliance with ethical standards

Conflict of interest statement DL has shares in SILTISS company.

References

- Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML. Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng.* 2011;2(1):403–30.
- O'Brien JF. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater Today.* 2011;14(3):88–95.
- Deville S, Saiz E, Tomsia AP. Freeze casting of hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Biomaterials.* 2006;27(32):5480–9.
- Turco G, Marisch E, Bellomo F, Semeraro S, Donati I, Brun F, Grandolfo M, et al. Alginate/hydroxyapatite biocomposite for bone ingrowth: a trabecular structure with high and isotropic connectivity. *Biomacromolecules.* 2009;10(6):1575–83.
- Nehrer S, Breinan HA, Ramappa A, Young G, Shortkroff S, Louie LK, et al. Matrix collagen type and pore size influence behaviour of seeded canine chondrocytes. *Biomaterials.* 1997;18(11):769–76.
- Autissier A, Letourneur D, Le Visage C. Pullulan-based hydrogel for smooth muscle cell culture. *J Biomed Mater Res Part A.* 2007;82A(2):336–42. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30998>.
- Griffith LG, Naughton G. Tissue engineering - Current challenges and expanding opportunities. *Science.* 2002;295(5557):1009–14. <https://doi.org/10.1126/science.1069210>.
- El-Sherbiny IM, Yacoub MH. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013;3:316–42. <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.38>.
- Yahia L. History and applications of hydrogels. *J Biomed Sci.* 2015. <https://doi.org/10.4172/2254-609X.100013>.
- Geckil H, Xu F, Zhang X, Moon S, Demirci U. Engineering hydrogels as extracellular matrix mimics. *Nanomedicine.* 2010;5(3):469–84. <https://doi.org/10.2217/nmm.10.12>.
- Balakrishnan B, Jayakrishnan A. Self-cross-linking biopolymers as injectable in situ forming biodegradable scaffolds. *Biomaterials.* 2005;26(18):3941–51. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.10.005>.
- Frasca S, Norol F, Le Visage C, Collombet JM, Letourneur D, Holy X, et al. Calcium-phosphate ceramics and polysaccharide-based hydrogel scaffolds combined with mesenchymal stem cell differently support bone repair in rats. *J Mater Sci Mater Med.* 2017;28(2):35 <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5839-6>.
- Purnama A, Aid-Launais R, Haddad O, Maire M, Mantovani D, Letourneur D, et al. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv Transl Res.* 2015;5(2):187–97. <https://doi.org/10.1007/s13346-013-0177-4>.
- Autissier A, Visage CL, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater.* 2010;6(9):3640–8. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.03.004>.
- Sun G, Shen Y-I, Ho CC, Kusuma S, Gerecht S. Functional groups affect physical and biological properties of dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res A.* 2010;93(3):1080–90. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32604>.
- Larm O, Lindberg B, Svensson S. Studies on the length of the side chains of the dextran elaborated by leuconostoc mesenteroides NRRL B-512. *Carbohydr Res.* 1971;20(1):39–48.
- Svensén C, Rodhe P. Chapter 33—Intravascular volume replacement therapy. In: Hemmings HC, Egan TD, editors. *Pharmacology and physiology for anesthesia.* Philadelphia: W.B. Saunders; 2013. p. 574–92.
- Poliška JE, Habermann J. Anticoagulants, thrombocyte aggregation inhibitors, fibrinolytics and volume replacement agents. *Drugs During pregnancy and lactation.* Third Edn. San Diego: Academic Press; 2015. p. 225–49.
- Trinetta V, Cutter CN. Chapter 30—Pullulan: a suitable biopolymer for antimicrobial food packaging applications. In: Barros-Velázquez J, editor. *Antimicrobial food packaging.* San Diego: Academic Press; 2016. p. 385–97.
- Lacroix M, Le Tien C. Edible films and coatings from nonstarch polysaccharides. In: Han JH, editor. *Innovations in food packaging. food science and technology.* London: Academic Press; 2005. p. 338–61.
- Bruneel D, Schacht E. Enzymatic degradation of pullulan and pullulan derivatives. *J Bioact Comp Polym.* 1995;10:299–312. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(95\)90688-X](https://doi.org/10.1016/0032-3861(95)90688-X).
- Leathers TD. Biotechnological production and applications of pullulan. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;62(5-6):468–73. <https://doi.org/10.1007/s00253-003-1386-4>.
- Bruneel D, Schacht E. End group modification of pullulan. *Polymer.* 1995;36(1):169–72. [https://doi.org/10.1016/0032-3861\(95\)90688-X](https://doi.org/10.1016/0032-3861(95)90688-X).
- Gliko-Kabir I, Yagen B, Baluom M, Rubinstein A. Phosphated crosslinked guar for colon-specific drug delivery. II. In vitro and in vivo evaluation in the rat. *J Control Rel.* 2000;63(1-2):129–34.

25. Letourneur D, Le Visage C, Derkaoui SM. Crosslinked polysaccharide beads and their biomedical uses. Patent 2012. WO 2012028623 A1.
26. Letourneur D, Le Visage C. Inventors; Porous scaffold for tissue engineering, cell culture and cell delivery. Patent 2009. WO 2009047346 A1.
27. Schlaubitz S, Derkaoui SM, Marosa L, Miraux S, Renard M, Catros S, et al. Pullulan/dextran/nHA macroporous composite beads for bone repair in a femoral condyle defect in rats. *PLoS One*. 2014;9(10):e110251. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110251>.
28. Abed A, Assoul N, Ba M, Derkaoui SM, Portes P, Louedec L, et al. Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *J Biomed Mater Res*. 2011;96A(3):535–42. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.33007>.
29. Zhu J, Marchant RE. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev Med Devices*. 2011;8(5):607–26. <https://doi.org/10.1586/erd.11.27>.
30. Lack S, Dulong V, Picton L, Le Cerf D, Condamine E. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: a proposal for the reaction mechanism. *Carbohydr Res*. 2007;342(7):943–53. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2007.01.011>.
31. San Juan A, Bala M, Hlawaty H, Portes P, Vranckx R, Feldman LJ, et al. Development of a functionalized polymer for stent coating in the arterial delivery of small interfering RNA. *Biomacromolecules*. 2009;10(11):3074–80. <https://doi.org/10.1021/bm900740g>.
32. Silva AKA, Letourneur D, Chauvierre C. Polysaccharide nanosystems for future progress in cardiovascular pathologies. *Theranostics*. 2014;4(6):579–91.
33. Thébaud N-B, Pierron D, Bareille R, Visage CL, Letourneur D, Bordenave L. Human endothelial progenitor cell attachment to polysaccharide-based hydrogels: a pre-requisite for vascular tissue engineering. *J Mater Sci Mater Med*. 2007;18(2):339–45.
34. Hopkins MJ, Englyst HN, Macfarlane S, Furrer E, Macfarlane GT, McBain AJ. Degradation of cross-linked and non-cross-linked arabinoxylans by the intestinal microbiota in children. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69(11):6354–60. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.11.6354-6360.2003>.
35. Neves NM, Reis RL. *Biomaterials from nature for advanced devices and therapies*. John Wiley & Sons; Hoboken, New Jersey, USA; ISBN: 978-1-118-47805-9; 2016.
36. Staat RH, Gawronski TH, Schachtele CF. Detection and preliminary studies on dextranase-producing microorganisms from human dental plaque. *Infect Immun*. 1973;8:1009–16.
37. Staat RH, Schachtele CF. Analysis of the dextranase activity produced by an oral strain of bacteroides ohraceus. *J Dent Res*. 1976;55:1103–10.
38. Farris S, Unalan IU, Introzzi L, Fuentes-Alventosa JM, Cozzolino CA. Pullulan-based films and coatings for food packaging: Present applications, emerging opportunities, and future challenges. *J Appl Polym Sci*. 2014;131:40539. <https://doi.org/10.1002/app.40539>.
39. Tran RT, Naseri E, Kolasnikov A, Bai X, Yang J. A new generation of sodium chloride porogen for tissue engineering. *Biotech Appl Biochem*. 2011;58(5):335–44. <https://doi.org/10.1002/bab.44>.
40. Chevalier E, Chulia D, Pouget C, Viana M. Fabrication of porous substrates: A review of processes using pore forming agents in the biomaterial field. *J Pharm Sci*. 2008;97(3):1135–54. <https://doi.org/10.1002/jps.21059>.
41. Chavda HV, Patel CN. Effect of crosslinker concentration on characteristics of superporous hydrogel. *Int J Pharm Investig*. 2011;1(1):17–21. <https://doi.org/10.4103/2230-973X.76724>.
42. Gomez CG, Alvarez Igarzabal CI, Strumia MC. Effect of the crosslinking agent on porous networks formation of hema-based copolymers. *Polymer*. 2004;45(18):6189–94. <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2004.06.053>.
43. Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials*. 2006;27(32):5546–53. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.06.032>.
44. Le Visage C, Gourmay O, Benguirat N, Hamidi S, Chaussumier L, Mougnot N, et al. Mesenchymal stem cell delivery into rat infarcted myocardium using a porous polysaccharide-based scaffold: a quantitative comparison with endocardial injection. *Tissue Eng Part A*. 2012;18:35–44. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2011.0053>.
45. Yu H, Cauchois G, Louvet N, Chen Y, Rahouadj R, Huselstein C. Comparison of msc properties in two different hydrogels. Impact of mechanical properties. *Biomed Mater Eng*. 2017;28:S193–S200. <https://doi.org/10.3233/BME-171641>.
46. Tse JR, Engler AJ. Stiffness gradients mimicking in vivo tissue variation regulate mesenchymal stem cell fate. *PLoS One*. 2011;6:e15978. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015978>.
47. Pek YS, Wan ACA, Ying JY. The effect of matrix stiffness on mesenchymal stem cell differentiation in a 3D thixotropic gel. *Biomaterials*. 2010;31:385–91. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.09.057>.
48. Wang L-S, Boulaire J, Chan PPY, Chung JE, Kurisawa M. The role of stiffness of gelatin-hydroxyphenylpropionic acid hydrogels formed by enzyme-mediated crosslinking on the differentiation of human mesenchymal stem cell. *Biomaterials*. 2010;31:8608–16. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.07.075>.
49. Wells RG. The role of matrix stiffness in regulating cell behavior. *Hepatology*. 2008;47(4):1394–400. <https://doi.org/10.1002/hep.22193>.
50. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell*. 2006;126(4):677–89. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.06.044>.
51. Hamidi S, Letourneur D, Aid-Launais R, Di Stefano A, Vainchenker W, Norol F, et al. Fucoidan promotes early step of cardiac differentiation from human embryonic stem cells and long-term maintenance of beating areas. *Tissue Eng Part A*. 2014;20:1285–94. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2013.0149>.
52. Lalande C, Miraux S, Derkaoui SM, Mornet S, Bareille R, Fricain JC, et al. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Cells Mater*. 2011;21:341–54.
53. Pietrzyk-Nivau A, Poirault-Chassac S, Gandrille S, Derkaoui S-M, Kauskot A, Letourneur D, et al. Three-dimensional environment sustains hematopoietic stem cell differentiation into platelet-producing megakaryocytes. *PLoS One* 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0136652>.
54. Ribot EJ, Tournier C, Aid-Launais R, Koonjoo N, Oliveira H, Trotier AJ, et al. 3D anatomical and perfusion MRI for longitudinal evaluation of biomaterials for bone regeneration of femoral bone defect in rats. *Sci Rep*. 2017;7(1):6100. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06258-0>.
55. Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, et al. A nano-hydroxyapatite-pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials*. 2013;34:2947–59. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.01.049>.
56. Fricain JC, Aid R, Lanouar S, Maurel DB, Le Nihouanen D, Delmond S, et al. In-vitro and in-vivo design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. *Dent Mater*. 2018;17:31264. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>.

Available online at www.sciencedirect.com

ScienceDirect

journal homepage: www.intl.elsevierhealth.com/journals/dema

In-vitro and in-vivo design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation

J.C. Fricain^{a,b}, R. Aid^c, S. Lanouar^c, D.B. Maurel^a, D. Le Nihouannen^a, S. Delmond^d, D. Letourneur^{c,e,1}, J. Amedee Vilamitjana^{a,*,1}, S. Catros^{a,b,*,1}

^a Inserm U1026, University of Bordeaux, Tissue Bioengineering, U1026, F-33076 Bordeaux, France

^b CHU Bordeaux, Dentistry and Oral Health Department, F-33076 Bordeaux, France

^c Inserm U1148, LVTS, X. Bichat Hospital, University Paris Diderot F-75018 Paris & Institut Galilée, University Paris 13, 93430 Villeteuse, France

^d CIC 14.01 Inserm, University Hospital of Bordeaux, Bordeaux, France

^e SILTISS SA, Zac de la Nau, F-19240 Saint-Viance, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 23 November 2017

Received in revised form

12 March 2018

Accepted 24 March 2018

Available online xxx

Keywords:

Bone regeneration

Sinus floor augmentation

Injectable bone substitute

Sheep model

Polysaccharide composites

ABSTRACT

Objective. Polysaccharide-based composite matrices consisting of natural polysaccharides, pullulan and dextran supplemented with hydroxyapatite (Matrix-HA) have recently been developed. The principal objective of this study was to evaluate the capacities of this composite material to promote new bone formation in a sinus lift model in the sheep. Secondary objectives were to evaluate *in vitro* properties of the material regarding cell adhesion and proliferation.

Methods. In this report, once such composite matrix was prepared as injectable beads after dispersion in a physiological buffer, and evaluated using a large animal model (sheep) for a sinus lift procedure.

Results. *In vitro* studies revealed that these microbeads (250–550 μm in diameter) allow vascular cell adhesion and proliferation of Endothelial Cells (EC) after 1 and 7 days of culture. *In vivo* studies were performed in 12 adult sheep, and newly formed tissue was analyzed by Cone Beam Computed Tomography (CBCT scanning electron microscopy (SEM) and by histology 3 and 6 months post-implantation. CBCT analyses at the implantation time revealed the radiolucent properties of these matrices. Quantitative analysis showed an increase of a dense mineralized tissue in the Matrix-HA group up to 3 months of implantation. The mineralized volume over total volume after 6 months reached comparable values to those obtained for Bio-Oss[®] used as positive control. Histological examination confirmed that the Matrix-HA did not induce any long term inflammatory events, and promoted direct contact between the osteoid tissue and lamellar bone structures and beads. After 6 months, we observed a dense network of osteocytes surrounding both biomaterials as well as a newly vascularized formed tissue in close contact to the biomaterials.

* Corresponding authors at: Inserm U1026, University of Bordeaux, 146 rue Leo Saignat, 33076 Bordeaux Cedex, France.

E-mail addresses: joelle.amedee@inserm.fr (J. Amedee Vilamitjana), sylvain.catros@u-bordeaux.fr (S. Catros).

¹ Equally contributing authors.
<https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>

0109-5641/© 2018 The Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Please cite this article in press as: Fricain JC, et al. *In-vitro* and *in-vivo* design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. *Dent Mater* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>

Significance. In conclusion, the absence of animal components in Matrix-HA, the osteoconductive property of Matrix-HA in sheep, resulting in a dense bone and vascularized tissue, and the initial radiolucent property to follow graft integration offer great promises of this composite material for clinical use.

© 2018 The Academy of Dental Materials. Published by Elsevier Inc. All rights reserved.

Statement of significance

In this paper, we demonstrate the potential of a natural polysaccharide-based matrix, as an injectable biomaterial for craniofacial/dental applications. Therefore, it considers the evidence of the *in vitro* biocompatibility of these ready-to-use injectable polysaccharide-based microbeads, their osteoconductive properties demonstrated in a preclinical model in sheep and the initial radiolucent property of these matrices at the beginning of implantation. These properties are of particular interest from a clinical point of view, as bone formation inside the grafted material can be observed using a conventional X-ray analysis compared to conventional calcium phosphate-based materials. We also focus the manuscript on the versatility of these microbeads as a basis to underpin the development of a new generation of injectable matrices to address pressing clinical needs in dental surgery as well as for orthopaedic applications.

1. Introduction

The replacement of teeth using dental implants in the posterior maxilla is often difficult due to scarce and poor quality of bone [1,2]. The osseous ridge may need augmentation prior to implant placement. The principle of sinus floor augmentation [3] is to implant in the floor of the maxillary sinus a graft before or during dental implant placement. This graft can be composed of autologous bone, exogenous bone, or synthetic biomaterials and is inserted to favor bone regeneration and to obtain a sufficient bone volume to stabilize dental implants [4,5]. Autologous graft [6] is still considered as the gold standard in such surgical procedures. However, the inherent morbidity of autografts onto the intra-oral or extra-oral [7,8] donor sites and the limited amount of bone available in a single patient have motivated the development of other materials [3]. Xenografts and allografts are also used for grafting the sinus before implant placement, but their use is still controversial because of the potential persistence of infectious or antigenic elements.

However, materials used for filling such bone defects should have the ability to conform to any shape irrespective of the volume and the defect geometry. In this context, injectable biomaterials are of particular interest, as they are easier to handle and to insert than large particles, resulting in a reduced operating time and their efficacy was demonstrated for a sinus lift augmentation [9].

Another challenge is to develop an osteoconductive material that mimics the bone microenvironment [10] and offers osteoinductive properties for promoting differentiation of the host mesenchymal stem cells and then accelerates the bone

tissue regeneration [11]. Currently, most of bone substitutes are calcium phosphate-based materials, because of their well-established osteoconductive properties [12]. In this context, new classes of biomaterials for bone healing are the focus of much research. The versatility of polymer chemistry in opposite to pure calcium-phosphate based materials can offer numerous strategies for improving the cellular and tissue invasion, the degradability of the scaffold. They can be also formulated to be injectable, and implantable with minimal invasive procedures.

Our previous studies have shown that a macroporous cell-free and growth factor-free scaffold composed of natural hydrophilic polysaccharides (pullulan and dextran), supplemented with hydroxyapatite possessed osteoconductive properties in different surgical models performed in several different species [13,14]. In certain specific conditions, this composite material also displayed osteoinductive properties because they were able to retain *in situ* bone morphogenetic proteins (BMPs) and Vascular Endothelial Growth factor (VEGF), after subcutaneous or intramuscular implantations [13]. Different formulations of this composite material were produced, as macroporous 3D scaffolds with different sizes and shapes for cell-based strategies [15–19], or as injectable beads from 200 μm to 1 mm evaluated in bone defects in femoral condyles of rats [14].

The aim of this study was to evaluate *in vivo* the efficacy of 250–550 μm beads (suspended in a saline suspension) to support bone formation in a preclinical large animal model in the field of oral surgery. The model of lateral sinus lift in the sheep was used to evaluate this injectable biomaterial, as it consists in the filling of a bone cavity. Injectable beads of polysaccharide-hydroxyapatite were fabricated, characterized *in vitro*, and then implanted in a sinus lift model in 12 sheep for 3 or 6 months. The reference material consisted in xenograft particles of clinical use (Bio-Oss[®], Geistlich Biomaterials). Cone Beam Computed Tomography quantitative analysis, histological data, scanning electron microscopy were performed on all samples to evaluate the nature of the newly formed tissue.

2. Materials and methods

2.1. Preparation and characterization of composite beads

We have previously described how the porous polysaccharide-based scaffolds were prepared [20–22].

Here, polysaccharide-based beads (Matrix-HA) were prepared by dissolving pullulan and dextran in water at a final concentration of 30% w/v (Pullulan, Mw 200,000, Hayashibara,

Please cite this article in press as: Fricain JC, et al. *In-vitro* and *in-vivo* design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. Dent Mater (2018), <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>

Japan; Dextran, Mw 500,000, Pharmacosmos, Denmark) and they were chemically cross-linked with sodium trimetaphosphate (STMP, 2.5% (w/w), Sigma) under alkaline conditions. Sodium chloride (54% (w/w)) was also added as porogen agent. Nano-hydroxyapatite (HA) was obtained by wet chemical precipitation of a 0.6M solution of phosphoric acid in a 1M solution of calcium hydroxide as previously described [23]. Then the HA solution was added to the polysaccharide solution described before [14]. Spherical beads were obtained after freeze-drying. The size distribution of Matrix-HA beads was quantitatively obtained using a laser dynamic scattering particle size-measuring instrument (Mastersizer 3000, Malvern Instruments, Orsay, France). The most widely used method of describing particle size distributions are D values: The D10, D50 and D90 were used to represent the midpoint and range of the particle sizes of each sample.

Low hydrated beads were observed using environmental scanning electron microscopy (Philips XL 30 ESEM-FEGE).

For *in vivo* experiments, freeze-dried beads were packaged in 5 mL syringes, sterilized by gamma irradiation at a dose of 25–35 kGy (Gammacell 3000 Elan, MDS Nordion) and stored at room temperature. The beads were rehydrated inside the syringes just before implantation by suspension into a saline solution. The reference biomaterial used in this work was a bovine xenograft (Bio-Oss[®], large particles, Geistlich Biomaterials).

2.2. HA content in the beads of Matrix-HA

In order to evaluate precisely the HA content of polysaccharide-based beads with HA (Matrix-HA), the composite material was degraded *in vitro* with a mixture of pullulanase (from *Bacillus subtilis*, 44.4 U/mL; Sigma-Aldrich) and dextranase (from *Chaetomium erraticum*, 5.3 U/mL; Sigma-Aldrich). The enzymatic solution was added to the scaffolds for 1 h at 37 °C. The total *in vitro* degradation of these scaffolds resulted in the hydroxyapatite, which is not degradable by these enzymes. The remained hydroxyapatite was then rinsed in osmosed water and finally dried to determine the weight.

2.3. Phosphorus quantification in the polysaccharide-based beads

We have quantified the phosphorus content inside the scaffolds to confirm the establishment of phosphate groups in the Matrix-HA composite materials, due to crosslinking via SMTP addition. The cross-linking was obtained through phosphate bridges between polysaccharide chains. The phosphorus content of scaffolds was determined according to the colorimetric method. About 2 mg of each scaffold were incubated with 1 mL of 10% nitric acid at 105 °C for 2 h. Subsequently, 0.4 mL of 14.7 M nitric acid, 2 mL of 10 mM ammonium metavanadate, and 2 mL of 40 μM ammonium pentaphosphoric acid molybdate were added into each sample. Phosphorus content was then determined by spectroscopy at 405 nm wavelength. For the standard curve, phosphoric acid was used as the reference. Three samples were tested and the results were expressed as

μmol/g dried scaffold. Finally, the phosphorus content due to the presence of the hydroxyapatite was subtracted.

2.4. Cellular behavior to the beads of Matrix-HA

The behavior of cells seeded on the beads was assessed *in vitro* using Human Umbilical Vein Endothelial Cells (HUVEC) as representative cells of a vascularized tissue.

100 mg of FITC-labeled Matrix-HA beads were used for cell culture. They were previously submitted to UV light for 15 min. A solution of 500 μL of growth medium (Dubelco's modified Eagle medium with 10% (v/v) of fetal bovine serum) and 1% (v/v) of antibiotics containing 1.5×10^6 HUVEC cells was seeded on the beads. The seeded beads were incubated in growth medium in a humidified atmosphere of 5% CO₂ at 37 °C, up to 7 days and the medium was changed every other day. Cell morphology and localization were assessed at day 1 and 7 after staining with specific dyes for cytoskeleton and for nucleus, respectively phalloidin-TRITC and DAPI (Sigma). At the end of the experiment the cells were fixed in 4% (w/v) paraformaldehyde and cell membranes were permeabilized using 0.1% Triton X100. The cells were then stained with a 50 μg/mL of phalloidin and 1 μg/mL of DAPI solution for 1 h. The beads were then observed with a confocal fluorescence microscope (Carl Zeiss LSM 780 with plan objective 10x, Tale scan). The images were treated with Imaris software.

2.5. Experimental model and surgical procedure

Animal experiments were performed in accordance with the "Principles of Laboratory Animal Care" recommended by the National Society for Biomedical Research in France and the EU directive 2010/63/EU for animal experiments. Surgery was carried out in an accredited animal facility (NAMSA, Chasse sur Rhône, France, agreement number 3808710001), after obtaining a positive evaluation of the animal experiment Ethic Committee of the French Ministry of Research (N°97). Conventional instruments designed for oral surgery were used, as well as a surgical rotary handpiece and surgical burr. The bilateral sinus lift procedure was performed on twelve adult sheep (mean weight = 70 kg), aged 3 years old. They were operated under general anesthesia with endotracheal intubation. The protocol used for general anesthesia was the following: induction was done using an intravenous injection of Diazepam 0.3 mg/kg (VALIUM[®]), Butorphanol 0.2 mg/kg (TORPHASOL[®]) and Propofol 2–5 mg/kg (PROPOVET[®]).

After skin shaving and disinfection (povidone iodine), a skin incision was performed, then superficial muscles were dissected in order to access the lateral aspect of the maxillary sinus. Then, a "bone window" was performed in the maxilla using a burr mounted on a handpiece under saline irrigation (NaCl 0.9%). The sinus membrane was carefully lifted in the cranial direction with specific instruments. Matrix-HA and control (BioOss[®]) materials were allocated randomly, to be injected in one side of each animal. The 12 animals received bilateral sinus grafts, one filled with the test material and the other with the control material. The volume of the grafts implanted in the sinus was standardized for both materials (Matrix-HA and control i.e. BioOss[®]), both of them being rehydrated in saline buffered. Finally, the lateral window

Please cite this article in press as: Fricain JC, et al. *In-vitro* and *in-vivo* design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. Dent Mater (2018), <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>

was covered with a collagen membrane (Biogide[®], Geistlich Biomaterials) in both groups. Resorbable sutures (Vicryl 4.0, Ethicon[®]) were used to close the muscle layer and surgical staples were used to close the superficial skin layer. Post-operative follow-up was performed every day during 2 weeks by a veterinary to evaluate the aspects of the wounds and the general condition of the animals. Oxyterin[®] spray was applied on the wounds every other day during one week. The animals received intra muscular injections of buprenorphine during 3 days, starting after the surgery and were treated with antibiotics every other day during 8 days post-surgery.

Two healing periods were examined, i.e. 3 and 6 months, and we have finally obtained six samples for each condition (Matrix-HA and BioOss[®]) at each time point (3 and 6 months). Euthanasia was performed using a 1 mL/5 kg intravenous pentobarbital. A block resection of the sinus was done for all samples, which were fixed into 10% neutral buffered formalin during 3 days.

2.6. Cone Beam Computed Tomography (CBCT) analysis

To evaluate the mineralization of the samples, we have observed all samples by Cone Beam Computed Tomography (CBCT) (NewTom VGi QR SRL, Bologna). To evaluate the aspects of the materials at Day 0, the two biomaterials were placed in 1 mL eppendorf[®] tubes and processed for CBCT imaging using the same procedure. Data were retrieved in the DICOM format. Microview[®] software (GE Healthcare Inc., Princeton/NJ, USA) was used to evaluate the mineralized volume over total volume (MV/TV) of grafted volume for each sample. Each defect was hand-contoured to exclude the tooth and the sinus wall in the calculations. The threshold for newly formed bone was determined for each scan individually. All samples (n = 6) were evaluated for each condition at each time point. Results were expressed as means \pm standard deviation.

2.7. Histological analysis and quantitative analysis of newly bone tissue

To evaluate the type and amount of tissue formed in the samples, undecalcified histological sections were performed. Samples were dehydrated in successive ethanol solutions followed by isopropanol. The samples were subsequently processed for resin inclusion in serial changes of 5% (w/v) methyl benzoate (Sigma Aldrich), 35% (w/v) butyl methacrylate (Sigma Aldrich), and 60% (w/v) methyl methacrylate (VWR, Radnor/PA, USA) with increasing amounts of 4, N,N-trimethylaniline (Sigma Aldrich, St. Louis/MO, USA). After polymerization, sections of 7 μ m were obtained from each sample using a microtome (Polycut, Leica SM2500) and stained according to the Masson Goldner technique. Pictures were analyzed with an Eclipse 80i microscope light microscopy (Nikon, Japan) and captured using a DXM 1200C CCD camera (Nikon, Japan). Images were analyzed using the Nikon software (NIS-Elements AR) (Nikon, Japan). The whole surface, as well as the newly bone remodeled surface and the surface of the biomaterial were quantitated in mm² using the Polygon and Auto Detect functions of the Measure, Length tools in the

NIS-Elements AR software. Epifluorescence analysis of sections was performed using an up-right widefield microscope, Leica DM5000 (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany). Fluorescence excitation was done by a SOLA Light LED (Lumencor, Beaverton, USA). The pictures were taken using resolute cameras (CoolSnap HQ2, Photometrics, Tucson, USA and a cooled QICAM, QImaging, Surrey, Canada).

2.8. Scanning electron microscopy (SEM) after acid etching treatment of explants

To evaluate the connection between osteocytes and the biomaterials, a specific preparation was done on the resin blocks. The samples previously embedded in resin (n = 3/group) were polished using three different sand papers (600, 800 and 1200 Grit), with washings between each polishing step, as described before [24,25], with modifications. A final polish was realized using a 1 μ m Diamond polishing compound (Buehler, 406244). Thereafter, the acrylic blocks were incubated 30 s with 37% (v/v) phosphoric acid to remove the mineral on the surface. They were then dipped in 2.6% (v/v) sodium hypochlorite to remove mainly the collagen network. The samples were air-dried overnight and metallized with gold palladium the following day for 2 min at 20 mA using a table-top coater (Emscope SC500). The samples were subsequently imaged with a SEM (Hitachi, S-2500) at 20 kV.

2.9. Statistical analysis

Statistical significance was evaluated with a non-parametric "One-way Anova analysis of variance" followed by a Tukey's Multiple Comparison Test to compare all possible pairs of means independently, as provided by the GraphPad Prism Software (La Jolla/CA, USA). The significance level was set to alpha equal 0.05. Statistical significances are marked by stars with * indicating $p \leq 0.05$.

3. Results

Beads of Matrix-HA made of polysaccharides and hydroxyapatite were prepared as previously described [14] and they were first observed by both environmental scanning electron microscopy: the microbeads displayed a round shape and regular surface (Fig. 1A, B).

Laser dynamic scattering was used to evaluate the size distribution of the HA particles in the initial solution and of the Matrix-HA microbeads (Table 1). Particle size distributions have been traditionally calculated, based on sieve analysis results, creating an S-curve of cumulative mass retained against sieve mesh size, and calculating the intercepts for 10%, 50% and 90% mass. The median size (50%) of HA particles in the initial solution was around 18.7 μ m diameter (range: 4.86 μ m–51.2 μ m). The median size (50%) of the Matrix-HA microbeads was around 386 μ m diameter (range: 252 μ m–554 μ m). Beads of Matrix-HA contained 9.84 \pm 1% (w/w) of HA. The phosphorus content was 65.1 \pm 1.7 μ mol/g of dried Matrix-HA microbeads, because of the apparition of phosphate groups in the composite materials (Table 1).

Please cite this article in press as: Fricain JC, et al. *In-vitro* and *in-vivo* design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. *Dent Mater* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>

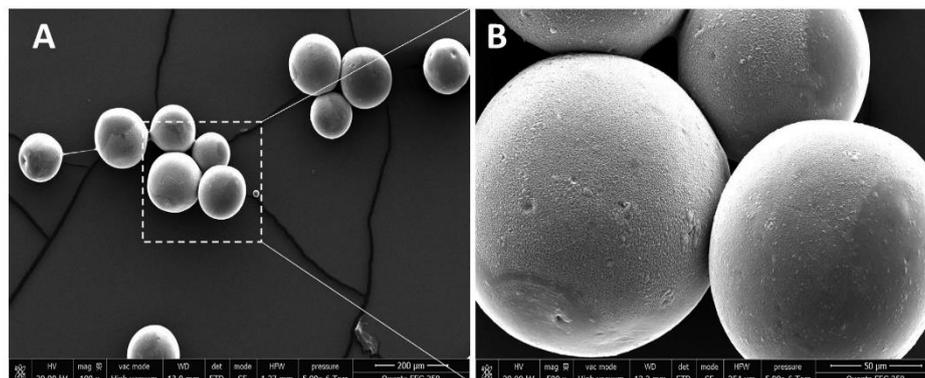


Fig. 1 – Environmental scanning electron microscopy.

Hydrated spherical beads of Matrix-HA were observed using environmental scanning electron microscopy (Philips XL 30 ESEM-FEGE) at two different magnifications (A, B). Scale bars are 200 and 50 µm respectively for panels A and B. The round shape and regular surface of the microbeads are confirmed in these pictures.

Table 1 – Characterization of the beads of Matrix-HA.

	Size distribution			HA content (%)	Phosphorus content (µmol/g dried sample)
	D ₁₀ (µm)	D ₅₀ (µm)	D ₉₀ (µm)		
HA	4.86 ± 0.05	18.7 ± 0.06	51.2 ± 2.1	–	31.5 ± 2.26
Matrix-HA	252 ± 1	386 ± 2.1	554 ± 6.7	9.84 ± 1	65.1 ± 1.7

The size distribution of the HA particles in the initial solution ranged between 4.86 µm and 51.2 µm. The size distribution of the Matrix-HA microbeads was comprised between 252 µm and 554 µm and the HA content of the microbeads was 9.84%. The phosphorus content of HA was 31.5 µmol/g and it increased around 65.1 µmol/g in the Matrix-HA microbeads, because the apparition of crosslinking phosphate groups in the composite material.

In vitro cell behavior was performed using HUVEC as primary cell cultures as representative of a vascularized tissue. Cytoskeleton and nuclei were imaged by confocal fluorescence microscope onto the microbeads after 1 day (Fig. 2A) and 7 days (Fig. 2B) of culture. A progressive colonization of these beads by HUVEC was observed (Fig. 2A, B).

Concerning the *in vivo* sinus lift surgery performed in the 12 sheep, the post-operative evolution was normal and no specific side effect was noticed. Macroscopic observations of the samples retrieved after 3 months (3M) or 6 months (6M) revealed the presence of the materials implanted in all samples inside the sinus cavity (Fig. 3). No adverse events like infection or granulation tissue formation were observed. A vascular network was also observed macroscopically in some samples in the mucosa surrounding the samples (Fig. 3, white arrows) after 3 months of implantation. Palpation of the Matrix-HA samples after 6 months revealed a dense and hard tissue, comparable to those observed for BioOss® samples that is already composed of dense mineral components during implantation. The implanted individual bovine particles of BioOss® were still observed through the sinus membrane in 3M and 6M groups.

CBCT was used to evaluate mineralized tissue formation in the samples at each time point (Fig. 4A). At time 0 (T0), Matrix-

HA was radiolucent and virtually invisible to X-ray analysis (Fig. 4A, left panel, T0), compared to granules of BioOss® used as reference material (Fig. 4A, right panel, T0). After 3 months of implantation, numerous spots of mineralized tissue were evident for Matrix-HA inside the sinus area (Fig. 4A, left panel 3M) and after 6 months of implantation, the sinus area was mostly filled by a mineralized tissue for Matrix-HA samples (Fig. 4A, left panel 6M). In the samples filled with BioOss®, the material was already radiologically radio-opaque during implantation (T0) and its density was not modified with time (from 3M to 6M). Quantitative analysis of these images confirmed these qualitative observations (Fig. 4B): the mineralization values (ratio of mineralized volume over total volume: MV/TV) of Matrix-HA started from zero and increased over time. The MV/TV for BioOss® group did not change significantly with time of implantation (3M and 6M). After 3 months of implantation, MV/TV values for Matrix-HA samples were significantly lower than control samples ($p < 0.05$) and the values were similar at 6 months for Matrix-HA samples and BioOss® samples (Fig. 4B).

Histological evaluation revealed a marked osteoid tissue after 3 months, mainly observed in Matrix-HA group (Fig. 5A, left panel, 3M) compared to the reference group where only few osteoid tissue was observed around the BioOss® particles

Please cite this article in press as: Fricain JC, et al. *In-vitro* and *in-vivo* design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. *Dent Mater* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>

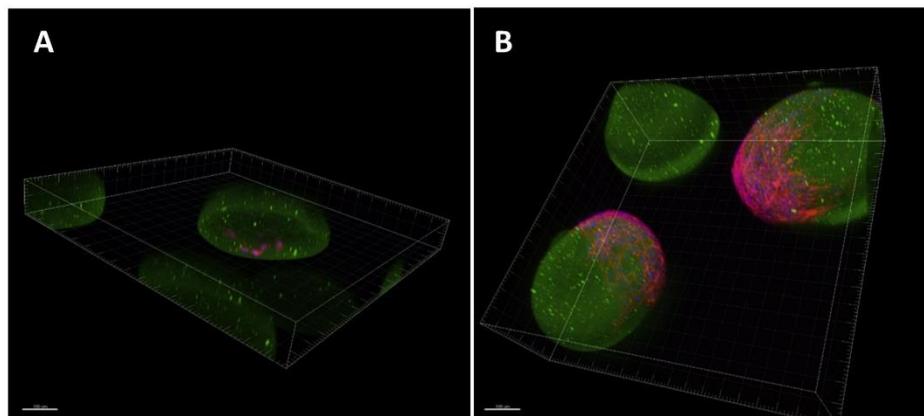


Fig. 2 – 3D reconstruction of FITC-labeled beads seeded with endothelial cells. Images (A) and (B), represented stacks of beads respectively at days 1 and 7 after seeding with human endothelial cells. The beads are presented in green (FITC), the cell cytoskeleton in red (phalloidin) and nuclei in blue (DAPI). These images were observed with Carl Zeiss LSM780 confocal fluorescence microscope and images treated with Imaris[®] software. Scale: 100 µm. Cell spreading on the surface of beads can be observed in Fig. 2B.

(Fig. 5A, right panel, 3M). After 6 months, newly formed bone was observed in direct contact with the composite material or control material surface in both groups (Matrix-HA samples and Bio-Oss[®]). Residual particles were observed for both biomaterials (Fig. 5A).

In the Matrix-HA group (Fig. 5B1, B2), the different stages of new bone formation can be observed up to 3 months of implantation in all specimens. The observation of these areas revealed osteoblasts, pre-osteoid tissues, osteoid formation or lamellar tissue in direct contact with beads and around them (Fig. 5B1, B2). Numerous vascular elements were also observed after 3 months of implantation in newly bone tissue of the Matrix-HA group (Fig. 5B2). Quantitative analysis of the newly formed bone (Fig. 5B3), demonstrated more regenerated new bone at 6 months than at 3 months for both groups (Matrix-HA and Bio-Oss[®]). The amount of bone formation in Matrix-HA samples was similar than in Bio-Oss[®] samples, as shown by the quantitative data, whatever the time of implantation (3M and 6M) (Fig. 5B3). Epifluorescence microscopy was used to observe lamellar bone structures within whole cross-sections of newly formed bone in both groups after 6 months and juxtaposed to optical microscopy (Fig. 5C). In the Matrix-HA group (Fig. 5C, left panel), we observed interfacing circumferential collagen fibers that are characteristic of lamellar bone ingrowth (Fig. 5C1, 5C3). Polarized light microscopy showed that these fibers were parallel to the surface of the beads, like an envelope, with a direct contact to the composite polysaccharide beads (Fig. 5C2, 5C4). At 6 months in the Bio-Oss[®] group (Fig. 5D, right panel), the orientation of collagen fibers was more heterogeneous around Bio-Oss[®] particles, not always in direct contact to the bovine bone granules (Fig. 5D1–D4).

Because of the lamellar bone formation observed in direct contact to the microbeads of Matrix-HA, and a possible bone remodeling of the newly formed tissue after 6 months of

implantation, acid-etching technique was coupled with scanning electron microscopy observations to analyze the osteocyte network formed around the microbeads of Matrix-HA. SEM images revealed a dense network of osteocytes in Matrix-HA group (Fig. 6A) with numerous zones of cells in direct contact with the microbeads, at 3 and 6 months (Fig. 6A2–A6). New regenerated bone in Matrix-HA group was organized around the blood vessels (Fig. 6A8, 6A9), and contacts were also observed between blood vessels and osteocytes (Fig. 6A9). We observed similar qualitative images in bone formed around Bio-Oss[®] material (Fig. 6B8, B9). These observations suggest an adequate integration in the bone matrix of both materials.

4. Discussion

We have shown that these injectable composite microbeads made of natural polymers (pullulan, dextran) and nano-hydroxyapatite offer *in vitro* a 3-dimensional environment suitable for cell attachment and colonization. The size distribution of these Matrix-HA microbeads was homogenous and the quantification of HA and phosphorous content performed on numerous samples confirmed the reproducibility of the fabrication method. *In vivo* studies showed that these microbeads can be used to regenerate bone in the sub-antral space of the maxillary sinus, and that it might be of particular interest for other indications of bone regeneration in oral and maxillofacial surgery. The sheep was chosen as a preclinical model to reproduce the sinus lift procedure, as the anatomical features of the sheep maxillary sinus exhibits similar sizes and shapes than humans [26].

Different biomaterials have been used to enhance the bone volume in the sub-antral space of the maxillary sinus prior to implant placement. Autologous bone is still the grafting

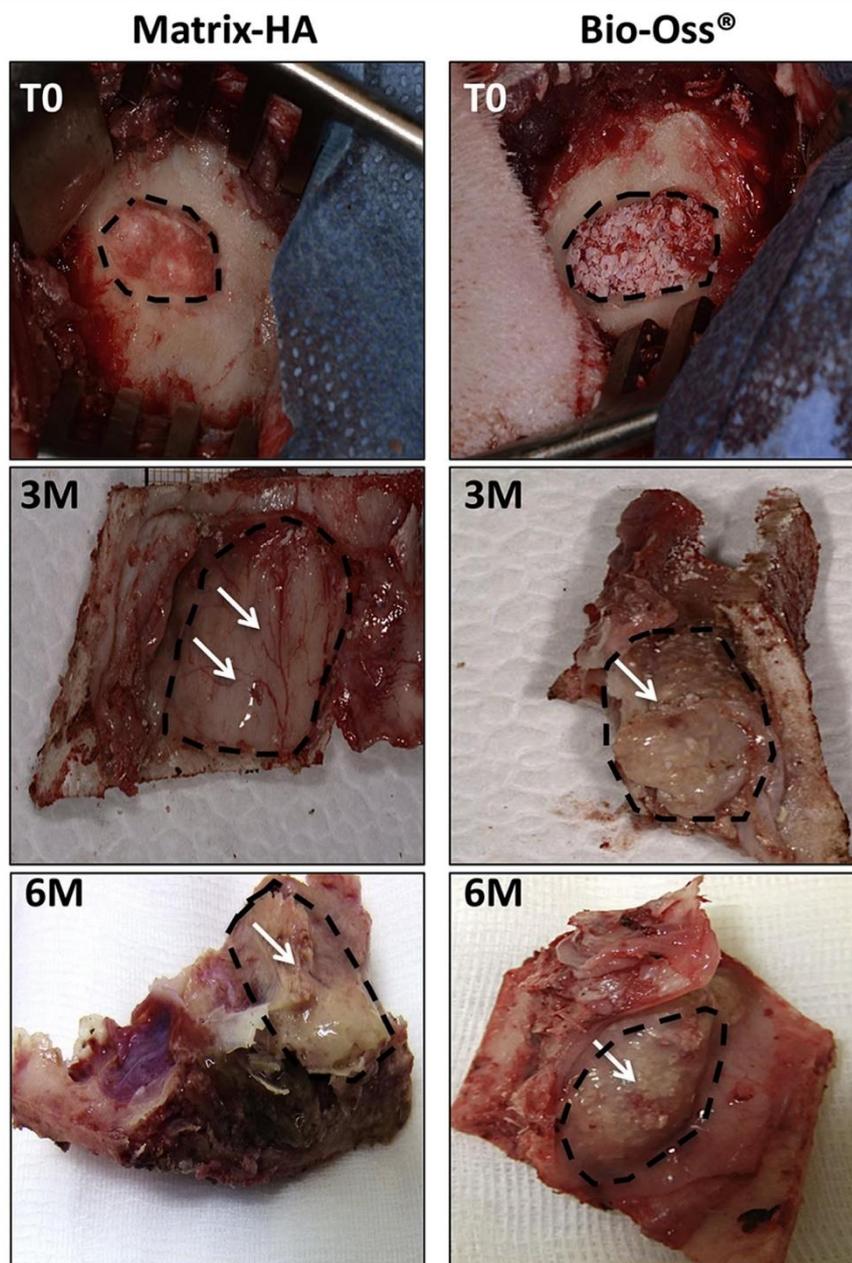


Fig. 3 – Macroscopic images of sinus lift surgery and explants. Matrix-HA and Bio-Oss® materials were implanted in the sinus lift model in sheep. T0: representative images obtained after sinus filling with both matrices after their implantation. 3M and 6M: macroscopic analysis of Matrix-HA and Bio-Oss® samples after 3 months (3M) and 6 months (6M) of implantation. The samples were surrounded by a discontinuous black line. White arrows indicate vasculature of the materials evidenced at 3M for both conditions.

Please cite this article in press as: Fricain JC, et al. *In-vitro* and *in-vivo* design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. *Dent Mater* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>

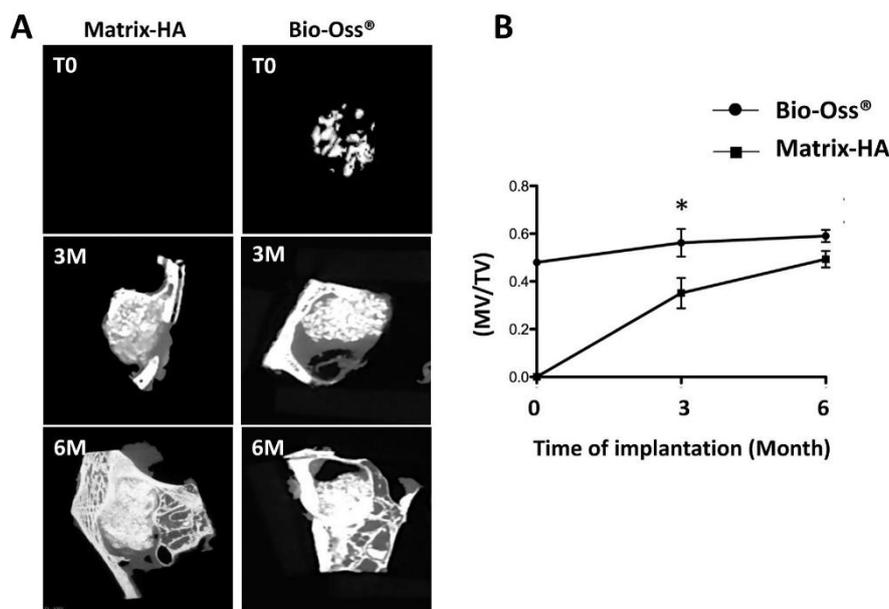


Fig. 4 – Cone Beam Computed Tomography (CBCT) analysis.

A: Representative scan images of samples before their implantation (T0), harvested after 3 months (3 M) and 6 months (6 M). Matrix-HA and Bio-Oss® materials were analyzed by Cone Beam Computed Tomography (CBCT) and revealed a dense content in both cases. **B:** The mineralized volume over total volume (MV/TV) was quantified in all samples. Six samples were evaluated for each group (Matrix-Ha and Bio-Oss®) at each time point (3 and 6 months). Results were expressed as means \pm standard deviation. Statistical significances are marked by stars with * indicating $p \leq 0.05$.

materials of reference in bone reconstructive surgery even if numerous limitations exist [27]. Allografts have been also processed in an injectable form in order to be molded around dental implants in the maxillary sinus [9], but they are mainly used as particles or blocs and their use is still controversial [28]. Tissue-engineered biomaterials composed of human bone marrow stromal cells embedded in platelet-rich plasma has been used for bone regeneration around dental implants protruding inside the maxillary sinus [29–31]. However, the use of autologous stem cells requires advanced procedures for cell culture, and hurdles related to regulatory issues make this approach not adapted when cell-free biomaterials can be used for similar clinical results.

The biomaterials commonly used for sinus lift procedure are usually in the shape of granules or powders in order to be adapted to the complex shape of the sinus floor. However, the handling of such powders or granules may be difficult when a large volume of material is implanted. Thus, there have been several attempts to use injectable materials for the filling of the sub-antral space, in order to reduce the time needed for the insertion of these materials. Fibrin glue from animal and human origin has been used to improve handling properties of a calcium-phosphate biomaterial and to make it injectable [26].

Here, Matrix-HA beads have been suspended in a saline solution to obtain an injectable material, which is simple and cheap. Surgeons may have also the opportunity to use other solutions, such as autologous blood, to prepare the injectable material. The use of such injectable material made of natural materials reduces the risks of infectious disease transmission and inflammatory responses, compared to bovine bone particles. Interestingly, all the parameters evaluated in this study were similar using this new composite material compared to the reference biomaterial.

The materials have been observed before implantation using CBCT, as a clinical method of investigation [32] and it revealed that Matrix-HA was radiolucent, while Bio-Oss® was radiopaque (Fig. 4A). Thus, in the samples implanted with Matrix-HA, the mineralization was followed visually with time, and after 6 months it was as dense as the reference material (Fig. 4A, B). These observations were confirmed histologically (Fig. 5A, C, D), by histomorphometry (Fig. 5B) and were consistent with our previous results using macroporous disks [13]. The differences observed between CBCT quantitative data obtained after 3 M and 6 M between the two groups, and histology can be explained by the fact that X-ray analysis allows the quantification of a mineralized tissue, knowing

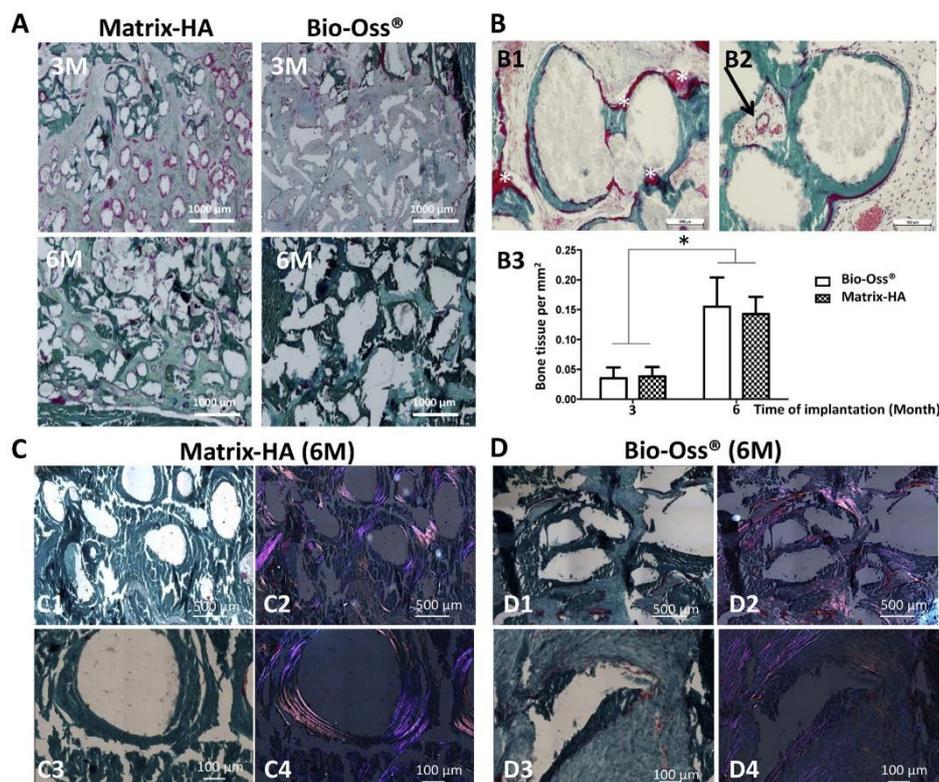


Fig. 5 – Histological analysis of Matrix-HA and Bio-Oss® explants.

A: Representative images of histological sections of Matrix-HA and Bio-Oss® explants after 3 months (3 M) and 6 months (6 M) of implantation. **B:** Representative images (B1, B2) of histological sections of Matrix-HA after 3 months (3 M) of implantation, showing the osteoid tissue (in red indicated by *), bone tissue (in green) formed around and between the micro-beads and vessels (B2) (indicated by a black arrow). **B3:** Histomorphometry analysis: the whole surface as well as the newly bone surface were quantitated in mm² using the polygon and auto detect functions of Nikon software. Stained slides from three to five samples per condition were processed for histological analysis, and two sections were fully imaged and analyzed per sample and per condition. Results are shown as means with standard deviation per condition, with time of implantation (in months 3 and 6). Statistical significances are marked by stars with * indicating $p \leq 0.05$. **C and D:** Epifluorescence analysis of sections of Matrix-HA (C) and Bio-Oss® (D) obtained after 6 months (6 M) of implantation, performed using the up-right widefield microscope for Matrix-HA (C2, C4) and Bio-Oss® samples (D2, D4). These images were juxtaposed to the optical microscopy of the same area (C1 and C3 for Matrix-HA; D1 and D3 for Bio-Oss®). (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

that Bio-Oss® is already mineralized from the beginning, while histology evaluates bone formation.

Our observations have several clinical implications: the radiological follow-up of the samples implanted with Matrix-HA can be used to observe with time the process of mineralization inside the grafted sites, which might be an indicator of the success of the graft. It would help the surgeon to choose the appropriate time for implant placement, as each patient can have a different bone mineralization kinetic. Secondly, we can state that the mineralized tissue observed in the

samples grafted with Matrix-HA was newly bone formed after implantation: Histological samples reveal that it is mainly mature bone tissue formed 6 months post-implantation, as showed by the lamellar structure of the tissues (Fig. 5C2, C4). This is not the case for the reference samples where a significant amount of the mineralized tissue observed radiologically is just residual material that was already opaque at the beginning of the study. Whilst CBCT observation did not allow to discriminate new bone and residual mineralized biomaterial (BioOss®), the histological analyses were used

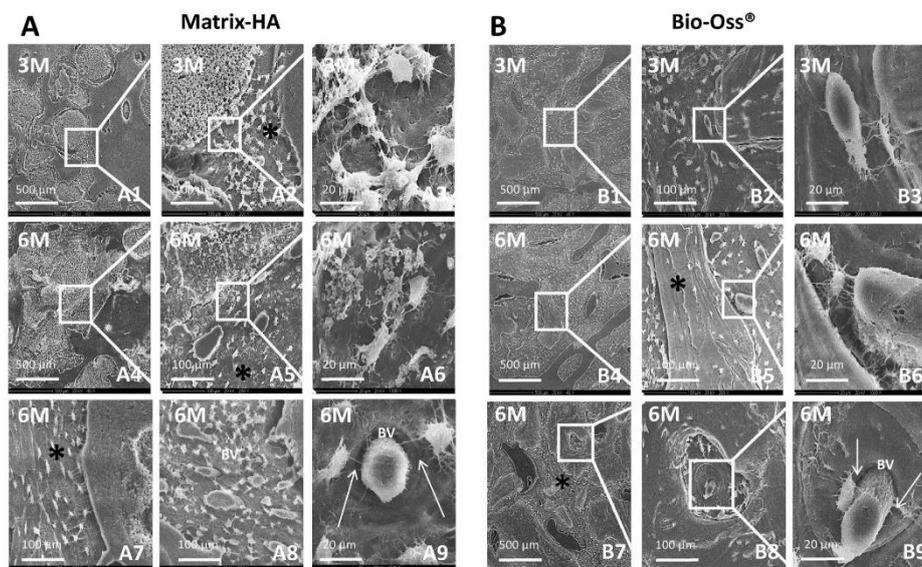


Fig. 6 – Scanning electron microscopy of Matrix-HA (A) and Bio-Oss® explants (B) after acid etching treatment. The samples obtained after 3 months (3M) and 6 months (6M) of implantation, embedded in acrylate, were polished before treatment with phosphoric acid and sodium hypochlorite. The samples were subsequently imaged with a scanning electron microscope at 20 kV, using the 40 \times , 200 \times , 1000 \times and 2000 \times magnifications. * indicates aligned osteocyte network. BV indicates blood vessels and white arrows indicate filipodia of osteocytes in contact with the blood vessels.

to selectively quantify new bone formed in all test and control samples: this revealed that after 6 months, the amount of newly bone formed was similar in both cases (Fig. 5 B3). Thus, the injectable Matrix-HA biomaterial could be of particular interest to control the integration of the graft in a clinical practice.

The osteoconduction and the integration of Matrix-HA beads in bone have also been observed. The nature and the structure of the newly formed around the beads or the particles were analyzed histologically. Both qualitative and quantitative analysis of the osteoid tissue produced after 3 and 6 months of implantation revealed a comparable efficacy on bone regeneration with Matrix-HA and Bio-Oss® (Fig. 5A, B1, B2, B3). A comparison of the orientation of collagen fibers in Matrix-HA and Bio-Oss® samples was analyzed by epifluorescence imaging for both materials after 6 months of implantation (Fig. 5C). Well-aligned and organized circumferential lamellae of collagen fibrils were observed in direct contact with the beads of Matrix-HA, suggesting a specific organization and tissue remodeling of the bone matrix formed. This was not the case in the samples grafted Bio-Oss® where few aligned lamellae structures have been observed (Fig. 5D2, D4).

The integration of Matrix-HA beads in bone has also been observed by scanning electron microscopy, following a resin cast etching treatment of both samples (Fig. 6). Beads of Matrix HA and particles of Bio-Oss® are surrounded by new

bone tissue. We were also able to visualize an interconnecting network of osteocytes in the vicinity of the biomaterials surfaces. The role of osteocytes is of great interest because they are known to be responsible via mechanotransduction of mechanical loading-based remodeling events of bone tissue [33]. SEM images revealed the osteocyte lacuno-canalicular network adjacent to Matrix-HA and Bio-Oss® materials after 3 and 6 months of implantation (Fig. 6A2, 6B2, 6A5, 6B5). The ultrastructural observations of multiple connections between osteocyte canaliculi and the surface of both materials (Fig. 6A3, 6B3) suggest that osteocytes could contribute toward the bone integration of these materials. In our work, the distance between the material surfaces and the nearest osteocytes often spanned 5–10 μ m. These data are consistent with those obtained on titanium implants with a sub-micron topography implanted in rats and the direct anchorage of osteocytes via dendritic processes to the titanium implant surface *in vivo* [34]. In some areas distal to the particles, the alignment of the osteocyte lacuno-canalicular network (Fig. 6A7) reflects the pattern of extracellular matrix formation, suggesting an intimate contact to the composite matrix surface. However, in mature bone, the osteocytes are arranged in an ordered fashion, as we can see for both groups of explants. Moreover, the new bone formation is often observed in the vicinity of blood vessels (Fig. 6A8, 6B8). Higher magnification (Fig. 6A9, 6B9) shows that osteocytes and their dendrites were directly connected with the blood vessels.

5. Conclusion

In conclusion, the *in vitro* compatibility and biodegradability of these ready-to-use sterile polysaccharide-based microbeads, the absence of animal components in Matrix-HA, their osteoconductive properties demonstrated in sheep, and the initial radiolucent property of these matrices to follow graft integration using a conventional x-ray analysis compared to the bovine calcium phosphates, offer several key advantages for a safe and efficient bone engineering clinical transfer in the field of oral and maxillofacial surgeries.

Acknowledgements

This study was funded by a grant from The National Research Agency (ANR EMMA 2010 MATRI+), and from the "International Team of Implantology" (ITI Research Grant No 997-2014). The authors would like to thank the institutions of Inserm (National Institute for Health and Medical Research), University of Bordeaux, Universities of Paris Diderot and Paris 13 for their financial support. The microscopy analysis was done in the Bordeaux Imaging Center, a service unit of the CNRS-INSERM and Bordeaux University, member of the national infrastructure France BioImaging, the help of Sebastien Marais is acknowledged. Thanks to J. Kalisky from Inserm U1026, Tissue Bioengineering, for producing the hydroxyapatite solution. Thanks to M. Durand (CIC 14.01 Inserm, CHU de Bordeaux France) for helping for the administrative aspects of the pre-clinical studies.

REFERENCES

- [1] Pramstraller M, Farina R, Franceschetti G, Pramstraller C, Trombelli L. Ridge dimensions of the edentulous posterior maxilla: a retrospective analysis of a cohort of 127 patients using computerized tomography data. *Clin Oral Implants Res* 2011;22:54–61.
- [2] Smiler DG, Johnson PW, Lozada JL, Misch C, Rosenlicht JL, Tatum OH, et al. Sinus lift grafts and endosseous implants. Treatment of the atrophic posterior maxilla. *Dent Clin North Am* 1992;36:151–86.
- [3] Friberg B. Bone augmentation for single tooth implants: a review of the literature. *Eur J Oral Implantol* 2016;9(Suppl. 1):S123–34.
- [4] Voss P, Sauerbier S, Wiedmann-Al-Ahmad M, Zizelmann C, Stricker A, Schmelzeisen R, et al. Bone regeneration in sinus lifts: comparing tissue-engineered bone and iliac bone. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2010;48:121–6.
- [5] Danesh-Sani SA, Wallace SS, Movahed A, El Chaar ES, Cho S-C, Khoully I, et al. Maxillary sinus grafting with biphasic bone ceramic or autogenous bone: clinical, histologic, and histomorphometric results from a randomized controlled clinical trial. *Implant Dent* 2016;25:588–93.
- [6] de Camargo Filho GP, Corrêa L, Costa C, Pannuti CM, Schmelzeisen R, de C. Luz JG. Comparative study of two autogenous graft techniques using piezosurgery for sinus lifting. *Acta Cir Bras* 2010;25:485–9.
- [7] Joshi A. An investigation of post-operative morbidity following chin graft surgery. *Br Dent J* 2004;196:215–8.
- [8] Joshi A, Kostakis GC. An investigation of post-operative morbidity following iliac crest graft harvesting. *Br Dent J* 2004;196:167–71.
- [9] Irinakis T. Efficacy of injectable demineralized bone matrix as graft material during sinus elevation surgery with simultaneous implant placement in the posterior maxilla: clinical evaluation of 49 sinuses. *J Oral Maxillofac Surg* 2011;69:134–41.
- [10] Chen G, Dong C, Yang L, Lv Y. 3D scaffolds with different stiffness but the same microstructure for bone tissue engineering. *ACS Appl Mater Interfaces* 2015;7:15790–802.
- [11] Barradas AMC, Yuan H, van Blitterswijk CA, Habibovic P. Osteoinductive biomaterials: current knowledge of properties, experimental models and biological mechanisms. *Eur Cell Mater* 2011;21:407–29.
- [12] Malhotra A, Habibovic P. Calcium phosphates and angiogenesis: implications and advances for bone regeneration. *Trends Biotechnol* 2016;34:983–92.
- [13] Fricain JC, Schlaubitz S, Le Visage C, Arnault I, Derkaoui SM, Siadous R, et al. A nano-hydroxyapatite-pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* 2013;34:2947–59.
- [14] Schlaubitz S, Derkaoui SM, Marosa L, Miraux S, Renard M, Catros S, et al. Pullulan/dextran/nHA macroporous composite beads for bone repair in a femoral condyle defect in rats. *PLoS One* 2014;9:e110251.
- [15] Lalande C, Miraux S, Derkaoui SM, Mornet S, Bareille R, Fricain JC, et al. Magnetic resonance imaging tracking of human adipose derived stromal cells within three-dimensional scaffolds for bone tissue engineering. *Eur Cell Mater* 2011;21:341–54.
- [16] Lavergne M, Derkaoui M, Delmau C, Letourneur D, Uzan G, Le Visage C. Porous polysaccharide-based scaffolds for human endothelial progenitor cells. *Macromol Biosci* 2012;12:901–10.
- [17] Guerrero J, Catros S, Derkaoui S-M, Lalande C, Siadous R, Bareille R, et al. Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater* 2013;9:8200–13.
- [18] Guerrero J, Oliveira H, Catros S, Siadous R, Derkaoui S-M, Bareille R, et al. The use of total human bone marrow fraction in a direct three-dimensional expansion approach for bone tissue engineering applications: focus on angiogenesis and osteogenesis. *Tissue Eng A* 2015;21:861–74.
- [19] Luciani N, Du V, Gazeau F, Richert A, Letourneur D, Le Visage C, et al. Successful chondrogenesis within scaffolds, using magnetic stem cell confinement and bioreactor maturation. *Acta Biomater* 2016;37:101–10.
- [20] Autissier A, Le Visage C, Pouzet C, Chaubet F, Letourneur D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater* 2010;6:3640–8.
- [21] Chaouat M, Le Visage C, Autissier A, Chaubet F, Letourneur D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials* 2006;27:5546–53.
- [22] Bonnard T, Serfaty J-M, Journé C, Ho Tin Noe B, Arnaud D, Louedec L, et al. Leukocyte mimetic polysaccharide microparticles tracked *in vivo* on activated endothelium and in abdominal aortic aneurysm. *Acta Biomater* 2014;10:3535–45.
- [23] Catros S, Guillemot F, Lebraud E, Chanseau C, Perez S, Bareille R, et al. Physico-chemical and biological properties of a nano-hydroxyapatite powder synthesized at room temperature. *IRBM* 2010;31:226–33.
- [24] Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jähn K, Kato S, et al. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res* 2012;27:1018–29.

Please cite this article in press as: Fricain JC, et al. *In-vitro* and *in-vivo* design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. *Dent Mater* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>

- [25] Feng JQ, Ward LM, Liu S, Lu Y, Xie Y, Yuan B, et al. Loss of DMP1 causes rickets and osteomalacia and identifies a role for osteocytes in mineral metabolism. *Nat Genet* 2006;38:1310–5.
- [26] Saffarzadeh A, Gauthier O, Bilban M, Bagot D'Arc M, Daculsi G. Comparison of two bone substitute biomaterials consisting of a mixture of fibrin sealant (Tisseel) and MBCP (TricOs) with an autograft in sinus lift surgery in sheep. *Clin Oral Implants Res* 2009;20:1133–9.
- [27] Danesh-Sani SA, Loomer PM, Wallace SS. A comprehensive clinical review of maxillary sinus floor elevation: anatomy, techniques, biomaterials and complications. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2016;54:724–30.
- [28] Ghanaati S, Barbeck M, Booms P, Lorenz J, Kirkpatrick CJ, Sader RA. Potential lack of standardized processing techniques for production of allogeneic and xenogeneic bone blocks for application in humans. *Acta Biomater* 2014;10:3557–62.
- [29] Yamada Y, Nakamura S, Ueda M, Ito K. Osteotome technique with injectable tissue-engineered bone and simultaneous implant placement by cell therapy. *Clin Oral Implants Res* 2013;24:468–74.
- [30] Ali S, Bakry SA, Abd-Elhakam H. Platelet-rich fibrin in maxillary sinus augmentation: a systematic review. *J Oral Implantol* 2015;41:746–53.
- [31] Lemos CA, Mello CC, dos Santos DM, Verri FR, Goiato MC, Pellizzer EP. Effects of platelet-rich plasma in association with bone grafts in maxillary sinus augmentation: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2016;45:517–25.
- [32] Hodez C, Griffaton-Taillandier C, Bensimon I. Cone-beam imaging: applications in ENT. *Eur Ann Otorhinolaryngol Head Neck Dis* 2011;128:65–78.
- [33] Murshid SA. The role of osteocytes during experimental orthodontic tooth movement: a review. *Arch Oral Biol* 2017;73:25–33.
- [34] Shah FA, Snis A, Matic A, Thomsen P, Palmquist A. 3D printed Ti6Al4V implant surface promotes bone maturation and retains a higher density of less aged osteocytes at the bone-implant interface. *Acta Biomater* 2016;30:357–67.

Please cite this article in press as: Fricain JC, et al. *In-vitro* and *in-vivo* design and validation of an injectable polysaccharide-hydroxyapatite composite material for sinus floor augmentation. *Dent Mater* (2018), <https://doi.org/10.1016/j.dental.2018.03.021>



Article

Development of 3D Hepatic Constructs Within Polysaccharide-Based Scaffolds with Tunable Properties

Marie-Noëlle Labour^{1,2,3}, Camille Le Guilcher^{1,2}, Rachida Aid-Launais^{1,4}, Nour El Samad^{1,2}, Soraya Lanouar^{1,2}, Teresa Simon-Yarza^{1,2} and Didier Letourneur^{1,2,*}

¹ INSERM U1148, LVTS, Université de Paris, X Bichat Hospital, 46 rue H Huchard, F-75018 Paris, France; marie-noelle.labour@enscm.fr (M.-N.L.); camille.le-guilcher@inserm.fr (C.L.G.); rachida.aid@inserm.fr (R.A.-L.); nourelsamad@hotmail.com (N.E.S.); soraya.lanouar@gmail.com (S.L.); teresa.simon-yarza@inserm.fr (T.S.-Y.)

² INSERM U1148, LVTS, Université Sorbonne Paris Nord, 99 av JB Clément, 93430 Villetaneuse, France

³ École Pratique des Hautes Études, Paris Sciences et Lettres (PSL) Research University, 4-14 rue Ferrus, 75014 Paris, France

⁴ INSERM UMS-34, FRIM Université de Paris, X Bichat School of Medicine, F-75018 Paris, France

* Correspondence: didier.letourneur@inserm.fr

Received: 19 April 2020; Accepted: 18 May 2020; Published: 21 May 2020



Abstract: Organoids production is a key tool for in vitro studies of physiopathological conditions, drug-induced toxicity assays, and for a potential use in regenerative medicine. Hence, it prompted studies on hepatic organoids and liver regeneration. Numerous attempts to produce hepatic constructs had often limited success due to a lack of viability or functionality. Moreover, most products could not be translated for clinical studies. The aim of this study was to develop functional and viable hepatic constructs using a 3D porous scaffold with an adjustable structure, devoid of any animal component, that could also be used as an in vivo implantable system. We used a combination of pharmaceutical grade pullulan and dextran with different porogen formulations to form crosslinked scaffolds with macroporosity ranging from 30 µm to several hundreds of microns. Polysaccharide scaffolds were easy to prepare and to handle, and allowed confocal observations thanks to their transparency. A simple seeding method allowed a rapid impregnation of the scaffolds with HepG2 cells and a homogeneous cell distribution within the scaffolds. Cells were viable over seven days and form spheroids of various geometries and sizes. Cells in 3D express hepatic markers albumin, HNF4α and CYP3A4, start to polarize and were sensitive to acetaminophen in a concentration-dependant manner. Therefore, this study depicts a proof of concept for organoid production in 3D scaffolds that could be prepared under GMP conditions for reliable drug-induced toxicity studies and for liver tissue engineering.

Keywords: 3D scaffold; tissue engineering; polysaccharide; organoid; liver; HepG2

1. Introduction

The liver is a vital organ with many crucial functions of detoxification, lipid and carbohydrate metabolism, homeostasis maintenance or blood protein synthesis. These functions can be impaired in many pathological conditions such hepatitis, cancer, genetic diseases or long term medication that induce liver fibrosis followed by cirrhosis which is irreversible and often leads to liver failure associated with poor prognosis. Cirrhosis and hepatocellular carcinoma are accountable for about 3.5% of deaths worldwide with an increasing prevalence [1]. Currently, allografts are the gold standard to treat end-stage liver diseases but, due to the lack of donors, tissue engineering strategies

represent a promising therapeutic route for liver diseases [2–5]. Moreover, with the aim to reduce drug toxicity testing on animal models, tissue engineering platforms can be used as an efficient tool to reproduce liver architecture. Indeed, three-dimensional (3D) models have been extensively developed as an alternative to two-dimensional (2D) cell culture models that do not mimic complex tissues structures, and the benefits of 3D culture have been broadly demonstrated for a variety of cell types. Organoid biotechnologies emerged from the idea to recapitulate organogenesis and morphogenesis in order to create *in vitro* “organ on a chip” systems [6,7]. This technology is based on cell self-assembly, differentiation and production of extracellular matrix to produce a system mimicking organ structures. This strategy represents a highly valuable tool in particular for disease modeling. As hepatocytes rapidly lose their phenotype and specific functions when cultured in 2D [8–10], this approach has been largely investigated to improve *in vitro* models for drug-toxicity and liver diseases [11] or for tissue engineering applications including extracorporeal [11–14] or implantable devices to sustain liver functions during acute phases of diseases [5,15].

In the last decade, a variety of techniques have been developed or improved to produce functional hepatic organoids from self-assembly in microwells and microfluidic devices to hydrogels and additive manufacturing technologies [9,16–20]. Initially, sandwiched cultures promoted survival of functional primary hepatocytes and have been widely used since then [21,22]. Later on, spheroids were produced using different simple techniques such as culture on non-adherent plates, stirred plates or bioreactors [23–26], that offered spheroid mass production. To improve reproducibility and produce organoids with a homogeneous size, hanging-drop and emulsion-based techniques [19], as well as microwells made of non-adherent materials, were developed [18,27–29]. Some of these systems have led to product commercialization, for instance microwells Gri3D™ that can be used for different applications or preformed liver organoids 3D InSight™ Liver Microtissues. Importantly, hepatic organoid technology combined with microfluidic devices enabled high throughput screening for drug toxicity studies and improved *in vitro* models of liver fibrosis or tumor microenvironments [19,30,31]. Besides, Takebe et al. successfully implanted vascularized liver buds in mice of that sustain major liver functions [4]. However, drawbacks of these systems are the large diameter of the microtissues generated that could induce cell necrosis, the lack of functionality and most often the difficulty to manipulate these systems. To overcome these limitations, 3D scaffolds have been considered for hepatic organoid production. These scaffolds are frequently hydrogels made of natural materials as they exhibit soft mechanical properties similar to healthy liver [7,16,32–34]. The main constraint of 3D matrices for organoid studies are porosity and pore interconnectivity to allow cell infiltration and generation of organoids but also nutrients diffusion [9,19,26]. Matrigel, a protein mixture secreted by Engelbreth-Holm-Swarm mouse sarcoma cells, has been extensively used as support material for 3D cell culture, but it exhibits a low porosity and a high variability in terms of cell response, and cannot be clinically approved [10,35–37]. To favor cell–cell contacts and hence organoid formation, materials that do not present cell adhesion motifs are often used, in particular alginate-based matrices that promote hepatocyte spheroid formation by enhancing cell–cell interactions as well as hepatocellular activity such as albumin and urea production or detoxification functions [33,36,38]. All these systems are promising for the production of functional organoids but there is still a need to produce 3D scaffolds, easy to manipulate with a process that can be translated to the clinic with industrial processes. In addition, the 3D platforms should allow an easy loading of a high number of cells, have open and interconnected pores within the 3D structure for cell self-assembly, cell–cell contacts and matrix production while maintaining high cell viability.

The aim of our study was to produce 3D porous scaffolds with adjustable properties for viable and functional organoid development, allowing easy handling and observations. The challenges were to obtain highly porous structures that allow efficient cell loading and self-assembly into viable and functional organoids. In this context, we took the benefit of pullulan-dextran 3D porous matrices already used for *in vitro* and *in vivo* tissue engineering studies [39–42]. The main advantages of pullulan and dextran, two natural water-soluble polysaccharides already used in the food and

pharmaceutical industry, are their biocompatibility and biodegradability. While dextran provides stability thanks to its high molecular weight, pullulan provides flexibility to the scaffold thanks to its branched polymeric structure. This combination produced a scaffold with soft and elastic mechanical properties easy to manipulate. These scaffolds have been used for a wide variety of applications such as vascular or bone tissue engineering [39,43–45] and their biodegradability is dependent on crosslinking ratio [46]. Moreover, they can be produced under GMP-conditions at large-scale and have been successfully implanted without major inflammatory reaction in mice, rats and goats [39,43,47]. The process for hydrogel formation relies on the addition of porogens during crosslinking using sodium trimetaphosphate (STMP) and freeze drying, a simple method to produce scaffolds easily at low cost and without any organic solvent. In this study, we describe for the first time the self-assembly of hepatic constructs in pullulan-dextran porous matrices. By varying porogen type and amounts, we have prepared several types of matrices and used HepG2 cell line as a model to investigate the effect of the formulation, and more particularly, the effect of porosity on cell clusters size and shape, cell viability and liver-specific functions.

2. Results

2.1. Scaffold Preparation and Characterization

The first objective of this study was to produce scaffolds to study the effect of different porosities on the viability and functionality of hepatic constructs. We used a patented method to create pullulan-dextran hydrogels based on the addition of porogens and a freeze-drying process [41,42]. A ratio 75:25 of high molecular weight Pullulan:Dextran has already been optimized to obtain easy-to-handle scaffolds [39–42]. In the present study, we investigated the effects of different amounts of two porogens, namely sodium chloride (NaCl) and sodium carbonate (Na_2CO_3) to obtain porous scaffolds that maximize cell loading and the diffusion of nutrients, oxygen and waste products. The limiting factor to increase porogen concentration is that polysaccharide solutions are very viscous. In the case of NaCl, a maximum of 17% (*w/w*) of porogen could be added in the polysaccharide solution (Table 1). For Na_2CO_3 , a maximum was reached at 15% *w/w*. At 18% Na_2CO_3 , although the solution appeared homogeneous, the procedure for scaffold molding was hindered by the too high viscosity (Table 1), and these scaffolds could not be obtained. Combined formulations with both NaCl and Na_2CO_3 were also prepared. With the combined formulations (ratio NaCl: Na_2CO_3 1:1), scaffolds with a total weight of 15% and 20% (*w/w*) could be obtained, and were named Combined-15 and Combined-20, respectively.

Physicochemical properties of the scaffolds were then analyzed. We studied phosphorous content that appraises crosslinking degree, swelling ratio and enzymatic degradation. Phosphorous content analysis revealed a significantly higher phosphorous content in NaCl scaffolds than in all other scaffolds suggesting a higher crosslinking ratio (Table 1). Swelling ratio was different for the five formulations, with Combined-20 scaffold being the highest. This observation implies that swelling does not depend primarily on phosphorous content since the latter was minimal for Na_2CO_3 -15, maximal for NaCl, and an intermediate value for Combined-20 scaffolds. Enzymatic degradation analysis revealed that scaffold degradation time is the longest in NaCl scaffolds which present the highest phosphorous content. For other formulations, where phosphorous content is similar, degradation $t_{1/2}$ decreases with an increasing amount of porogen (Table 1).

The macro- and micro-structures of the scaffolds after freeze-drying were analyzed by SEM to observe the internal porosity in dry state. Macroscopically, the structure of scaffolds formed with NaCl appears dense compared to all other formulations, where pores were even visible with the naked eye (Figure 1). The Combined-20 scaffold presents a distinctive cotton-like structure. SEM observations demonstrate that all dry scaffolds possess an open structure with interconnected pores. NaCl scaffolds present a homogeneous pore size distribution of approximately 200 μm and a circular shape. In contrast, Na_2CO_3 -10 scaffolds present two types of porosity: (i) small pores similar in shape to the ones obtained

with NaCl alone and (ii) more elongated pores (width $\approx 200 \mu\text{m}$, length $\approx 1 \text{ mm}$), likely created by CO_2 release in the washing acidic step. In Na_2CO_3 -15 scaffolds, we mainly observed very large pores of about $500 \mu\text{m}$ with irregular sizes. Thus, a mix of large elongated and small pores was obtained for combined scaffolds with the sizes increasing as the porogen concentration increases (Figure 1).

Table 1. Effect of polysaccharide formulations (porogen type and weight amounts) on scaffold production, phosphorous content ($n = 3$), swelling ratio ($n > 6$) and in vitro enzymatic degradation ($t_{1/2}$, time to degrade 50% of the scaffold weight). Statistical analysis using student t -test. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ denote statistical significance against NaCl scaffold. ## $p < 0.01$, ### $p < 0.001$ denote statistical significance against all other scaffolds.

Porogen	Total Porogen %	Solution Viscosity	Scaffold Name	Phosphorous Content $\mu\text{M/g}$	Swelling Ratio	Degradation $t_{1/2}$ min
NaCl	17.0	+	NaCl	234.6 ± 0.3	12.6 ± 0.7	27.2 ± 6.2
	23.0	insoluble	-	-	-	-
Na_2CO_3	10.7	++	Na_2CO_3 -10	208.1 ± 3.2 ***	11.4 ± 1.1	18.5 ± 4.8
	15.0	+++	Na_2CO_3 -15	203 ± 2.5 ***	13.4 ± 1.1	14.6 ± 0.7
	18.8	++++	-	-	-	-
	25.3	insoluble	-	-	-	-
NaCl: Na_2CO_3 :1	15.0	++	Combined-15	207.1 ± 7.2 **	12.3 ± 1.3	16.9 ± 2.5
	20.6	+++	Combined-20	208.7 ± 2.5 ***	21 ± 0.6 (##)	6.6 ± 2.3 (##)
	25.3	insoluble	-	-	-	-

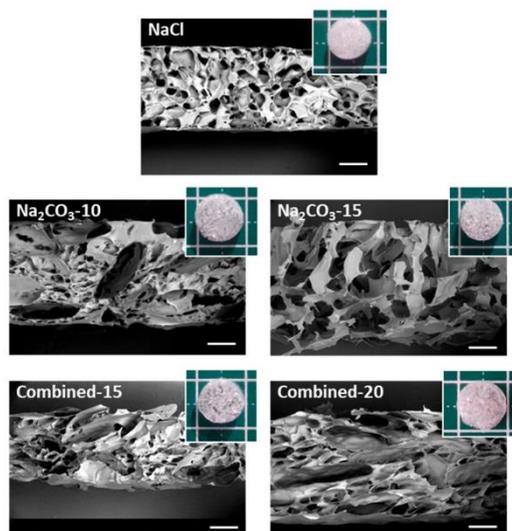


Figure 1. Macroscopic and microscopic (SEM) analysis of scaffold structures in dry state. Scaffolds for the five selected formulations were cut vertically to observe by SEM the inner structure under low vacuum mode (40 Pa) at a 20-kV acceleration voltage. Scale bars on SEM pictures are $500 \mu\text{m}$. Five representative dry scaffolds placed on a $1 \times 1 \text{ cm}$ mat are shown in inserts.

The microscopic structures of hydrated scaffolds were analyzed using 1% FITC-dextran included in the initial formulations. Upon scaffold hydration in PBS, polysaccharide scaffolds immediately retracted due to hygroscopic properties of polysaccharides and then swelled within less than a minute, and produced transparent hydrogels. All scaffolds were easy to handle, soft and cohesive. Upon hydration, all pore sizes appear slightly smaller than the dry scaffolds but present a similar shape (Figure 2a). Scaffolds prepared with NaCl exhibited ovoid pores of about 200 μm in length and about 30 μm in width, whereas scaffolds with Na_2CO_3 presented more elongated pores between 0.5–1 mm length and widths ranging from 30 and 150 μm . In hydrated Na_2CO_3 scaffolds, we did not notice the smaller pores as observed in NaCl scaffolds. Regarding combined scaffolds, both types of porosity were observed: (i) small and ovoid; (ii) thin and elongated pores. Elongated pores in combined scaffolds were less present than in Na_2CO_3 scaffolds and had widths (30–60 μm) lower than in Na_2CO_3 scaffolds. Smaller pores appeared similar to NaCl scaffolds although they presented a larger distribution in terms of size and geometry. No obvious difference was noted when increasing porogen concentrations. The percentage of porosity in volume was analyzed quantitatively in 3D stacks. For NaCl scaffolds, total porosity was about 30% whereas for all other conditions, porosity was about 40–50% (Figure 2b). All porous scaffolds presented a high interconnectivity of pores within the entire 3D structures.

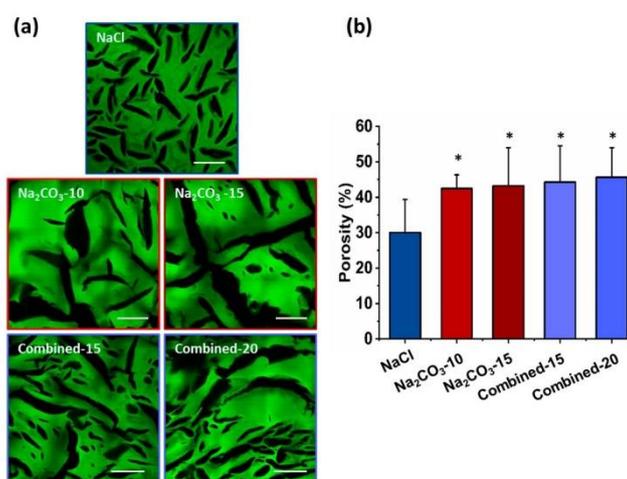


Figure 2. Hydrogels' porosity after hydration. (a) Representative confocal microscopy images of the different scaffolds containing Dextran-FITC. Scale bar 200 μm . (b) Scaffolds' porosity calculated from confocal stacks images in A. Statistics were performed using student *t*-test. Only NaCl scaffold porosity was significantly different than every other one. * $p < 0.05$, $n = 6$.

2.2. Cell Cluster Size and Geometry

Next, we investigated whether a change of porosity would modify geometry and size of cell clusters, and hence influence cell self-assembly, viability and functionality [17,26,29]. Indeed, to form viable and functional organoids in a 3D scaffold, one main factor is cell cluster size to allow nutrients and oxygen diffusion to the cells in the center of the construct, a critical feature for hepatic cells that requires high concentrations in glucose. Therefore, HepG2 cells were observed in the different scaffolds after seven days, stained for phalloidin and DAPI and imaged by confocal microscopy to observe cell clusters. We could see that cells were successfully loaded in all the scaffolds with a homogeneous distribution throughout the entire hydrogel. In NaCl scaffolds, where pores were small and ovoid, cell clusters appear small and circular, and they did not colonize the entire volume of the pores (Figure 3a top panel). Size analysis revealed a majority of small cell clusters with a median volume of 72.1 μm^3 ,

i.e., about 52 μm in diameter if considered as spherical (Figure 3a,b). In NaCl scaffolds, only 4.4% of cell clusters presented a diameter above 100 μm , a threshold considered as the maximum size for hepatic organoids [26,29]. On the contrary, in Na_2CO_3 scaffolds, cells filled up the pores generating thin and elongated cell clusters (Figure 3a middle panel) with a broader range of sizes due to the presence of both large and thin pores generated by CO_2 release. Median volumes for Na_2CO_3 -10 and Na_2CO_3 -15 scaffolds were, respectively, 114.9 and 114.6 μm^3 (Figure 3b). In the combined scaffolds, distribution profiles of cell cluster volumes were similar to the distribution observed within NaCl scaffolds although volume distributions were slightly more heterogeneous (Figure 3a–c), likely due to the presence of a small number of large and thin pores generated by CO_2 release. Cell cluster median volumes were 55 μm^3 for Combined-15 scaffolds, and 56.1 μm^3 for Combined-20 scaffolds (about 47 μm diameter if considered spherical), but appear less spherical in the gel depth (z-direction) (Figure 3c). We noticed that the cells organized in spherical aggregates in combined scaffolds did not fill completely the volume of pores while they filled up the large elongated pores in Na_2CO_3 scaffolds (Figure 3a).

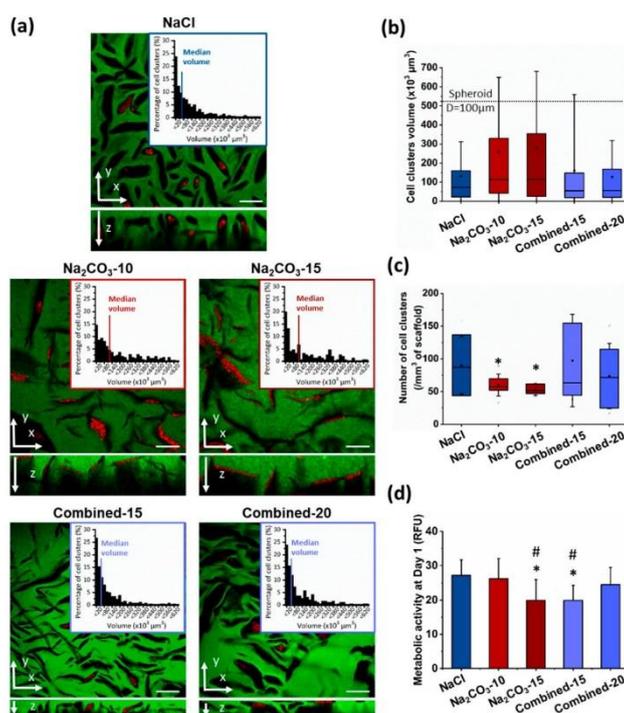


Figure 3. HepG2 cell clusters size and conformation in 3D scaffolds after seven days of culture. (a) Confocal image of the interior of scaffolds formed using NaCl (top panel), Na_2CO_3 (middle panel) or a combination of both porogens (bottom panel). Scaffolds were observed here in green due to 1% Dextran-FITC in the formulations. Cell clusters are shown using phalloidin-TRITC staining. Volume distribution of cell clusters (top right panels) formed within the scaffolds were determined using a 3D semi-automatic analysis using Imaris software. Scale bar: 200 μm . (b,c) Distribution of cell clusters volumes (b) and number of cell clusters per mm^3 of scaffold (c) represented as box plot using median and 25–75 percentile. Mean volume is represented as a diamond-shape dot, error bars represent standard deviation. (d) Metabolic activity analysed at day one after seeding. Statistical analysis was performed using student *t*-test. * represent statistical difference towards NaCl scaffolds. # represent statistical difference ($p < 0.05$) towards Na_2CO_3 -10 scaffolds. All other differences were not significant.

The number of clusters per mm^3 was also evaluated and correlated with cell cluster volume (Figure 3b) as an index of loading efficiency and cell distribution within the scaffolds. As expected, the number of cell clusters per field of view was inversely proportional to cell cluster volume: a high number of cell clusters was detected within NaCl and Combined scaffolds, while the number was lower in Na_2CO_3 scaffolds (Figure 3c). To identify the scaffolds presenting the higher loading efficiency, the metabolic activity of cells in 3D was assessed 24 h after seeding (Figure 3d). This analysis demonstrated a slightly lower metabolic activity in Na_2CO_3 -15 and Combined-15 than with other formulations, most likely due to, respectively, the presence of too large pores that do not retain cells and too small non-interconnected pores. Taken together, these results showed that two different types of scaffolds were formed, the first one formed with NaCl (or combined formulations) presented small and ovoid pores generating numerous small and spherical cell clusters, and the second type of scaffold with Na_2CO_3 exhibited thin and elongated pores producing cell clusters with similar elongated geometries. We therefore chose to compare for the following experiments cell viability and functionality in NaCl and Na_2CO_3 -10 scaffolds that exhibited the two highest loading efficiencies and a clear difference in terms of cell cluster sizes and shapes.

2.3. Cell Viability

To assess the viability and proliferation capacity of HepG2 cells organized in small and spherical (NaCl scaffolds) versus large and thin clusters (Na_2CO_3 -10), we analyzed overtime cell metabolic activity using a resazurin-based assay, and viability using a live–dead assay. To be noted, storage modulus measured by Dynamic Mechanical Analysis at 1Hz in the viscoelastic linear domains were similar on NaCl and Na_2CO_3 -10 scaffolds, respectively 5010 ± 720 Pa and 4390 ± 210 Pa, implying that cell behavior could not be attributed to a difference in the mechanical rigidity of the scaffolds.

Metabolic activity was similar at day one for NaCl and Na_2CO_3 -10 scaffolds (Figure 4a). In NaCl scaffolds, metabolic activity increased significantly from day one to day four and seven reaching a plateau, i.e., HepG2 cells stopped proliferating but remain viable. In Na_2CO_3 -10 scaffolds, metabolic activity increased slightly but continuously over seven days. Therefore, cell proliferation was limited within both types of scaffolds but cells remain alive for at least seven days. After seven days of culture, no statistical difference was noted between these two scaffold formulations (Figure 4a). We analysed the cell viability using live–dead assay, especially in the gels depth where diffusion could be limited, and within clusters. The overall viability within the 3D hydrogels at day seven was $86.8 \pm 6.3\%$ for NaCl scaffold and $90.5 \pm 5.9\%$ in Na_2CO_3 -10 scaffolds. Confocal images demonstrated that the live–dead ratio remained constant in the scaffold depth up to the maximum possible analysis at $300 \mu\text{m}$ by confocal microscopy (Figure 4b) for both scaffolds. The homogeneous distribution of the cell clusters was evidenced within both scaffolds (Figure 4c). When zooming in on cell clusters, it appears that the visible dead cells were not located in the center of clusters, but they were often individualized isolated cells (Figure 4c, inserts). We hypothesized that individual cells did not survive because they cannot adhere to the scaffolds whereas they can live when forming a cell cluster. Hence, the viability was similar between small and spherical cell clusters (NaCl scaffold) and in elongated and large clusters (Na_2CO_3 scaffold), implying a sufficient diffusion of nutrients and oxygen.

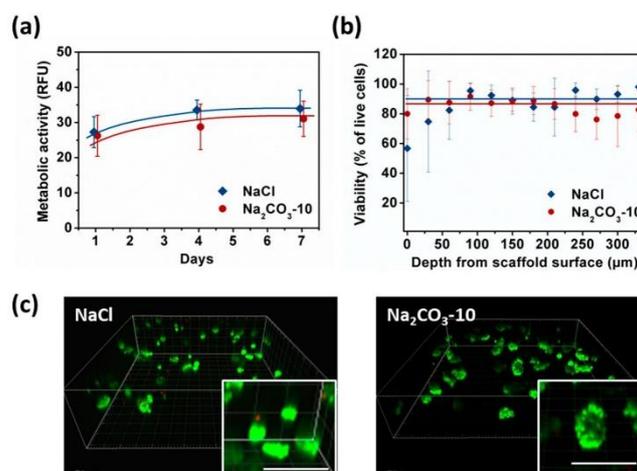


Figure 4. Analysis of HepG2 viability and metabolic activity over seven days within NaCl and Na₂CO₃-10 scaffolds. (a) Cell metabolic activity of HepG2 within NaCl (blue) and Na₂CO₃-10 (red) scaffolds at day one, four and seven. (b) Percentage of viable cell within NaCl and Na₂CO₃-10 scaffolds as function of distance from the scaffold surface at day seven. Statistics were performed using ANOVA with Tukey's post-test. No significant difference was observed. (c) Representative 3D images of live-dead analysis of NaCl (top panel) and Na₂CO₃ (bottom panel) scaffolds at day seven. Live cells were stained with Calcein AM (green) and dead cells are detected with Ethidium homodimer (red). Scale bar: 200 μm.

2.4. Cell Functionality in Porous Scaffolds

Apart from viability, size and geometry of cell clusters are known to modulate cell differentiation and hence organoid functionality [26,29]. Therefore, albumin secretion, CYP3A4 activity and expression of Albumin and HNF-4 α were analyzed as typical hepatic function markers. We quantified albumin secretion in cell culture supernatants after one, four and seven days. At day one, no statistical difference was observed between the two types of scaffolds, although the albumin quantity was slightly higher in Na₂CO₃-10 scaffold than NaCl scaffold (respectively 1.24 ± 0.02 and 0.74 ± 0.38 $\mu\text{g}/\text{mL}/10^6$ cells). Albumin production increased overtime in both scaffolds to reach similar values at 1.80 ± 0.28 $\mu\text{g}/\text{mL}/10^6$ cells in Na₂CO₃-10 scaffolds and 1.81 ± 0.6 $\mu\text{g}/\text{mL}/10^6$ cells in NaCl scaffolds at day seven (Figure 5a). These albumin concentrations are in agreement with several others studies using HepG2 cells [48–50]. CYP3A4 activity (Figure 5b) exhibited a profile inversely proportional to albumin secretion, also in agreement with the literature [51–53]. In line with these data, we also observed cytoplasmic expression of albumin in HepG2 cells within both types of scaffolds, and nuclear expression of HNF-4 α in most cells at day seven (Figure 5c). Moreover, phalloidin staining revealed actin aggregates bounded by HepG2 cells (Figure 5d), a phenomenon coinciding with the development of bile canaliculi [54–57]. To further confirm that these cell clusters were functional, we performed a dose–response analysis of acetaminophen toxicity in the 3D constructs (Figure 5e). In both NaCl and Na₂CO₃-10 scaffolds, HepG2 cells were sensitive to increasing concentrations of acetaminophen with EC₅₀ of 67.70 and 67.75 mM, respectively. As acetaminophen is catalyzed by CYP3A4 to a toxic intermediate, this suggests that 3D constructs in both scaffolds have an active and functional CYP3A4 and were able to detect liver toxic compounds. Overall, these data demonstrate that cell clusters formed in 3D scaffolds present the main characteristics required for hepatic constructs.

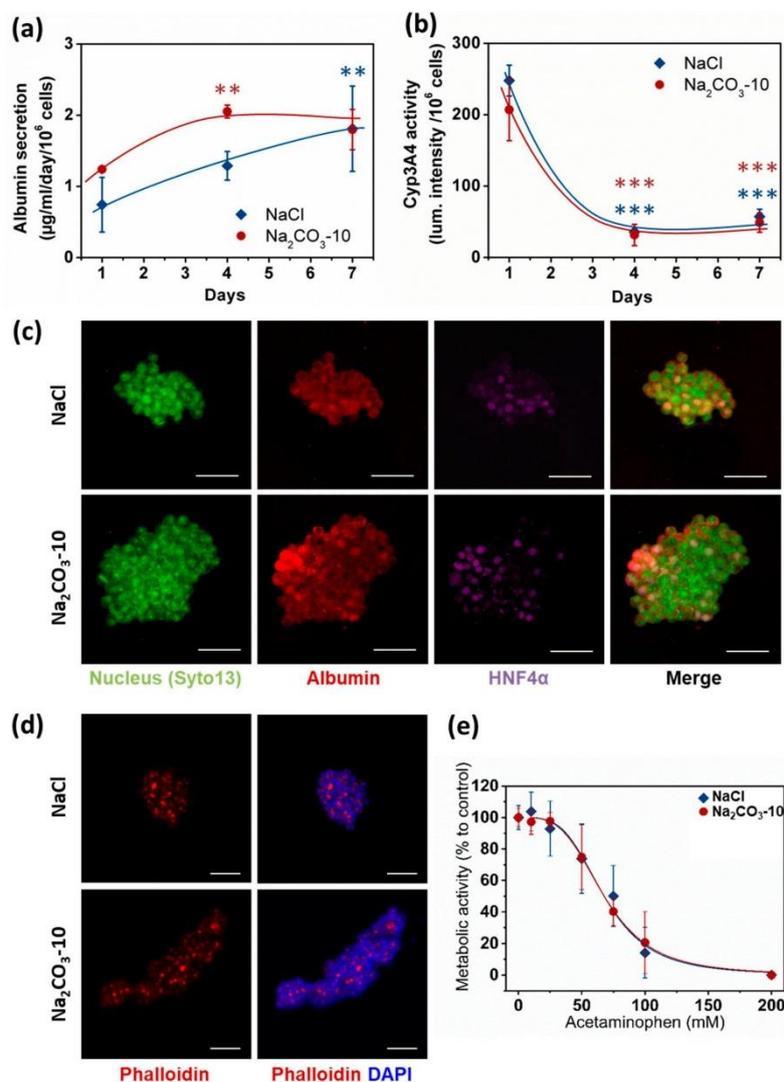


Figure 5. HepG2 cell functionality in 3D within NaCl and Na₂CO₃-10 scaffolds. (a) Quantification of albumin secretion in the medium for 24 h after one, four and seven days using ELISA. (b) Quantification of P450 cytochrome CYP3A4 activity overtime. (c) Confocal images (Maximum intensity projection) of typical cell clusters showing the expression of Albumin (red) in the cytoplasm and HNF4α (purple) localized in the nucleus for scaffolds prepared with NaCl (top panel, 30µm total thickness) and Na₂CO₃-10 (bottom panel, 80µm total thickness) at day seven. (d) Confocal images at day seven (Maximum intensity projection) of typical cell clusters showing the aggregation of Actin (red) in between cells for scaffolds prepared with NaCl (top panel, 49 µm total thickness) and Na₂CO₃-10 (bottom panel, 94 µm total thickness). (e) Acetaminophen-induced toxicity at day seven on HepG2 cells after 24 h treatment in NaCl and Na₂CO₃-10 scaffolds. Scale bars: 50 µm. Statistical analysis was performed using ANOVA with Tukey's post-test. ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

3. Discussion

The main goal of this study was to analyze the effect of sizes and geometries of hepatic constructs on cell functionality using porous scaffolds. Scaffolds were prepared by cross-linking of polysaccharides in the presence of different porogen agents (NaCl or Na₂CO₃) to obtain various microstructures of different sizes and geometries. These scaffolds made of polysaccharides are easy to produce and to handle. They are transparent, allowing direct microscopic observation, and they can be stored at room temperature long term before use. We used a patented technique based on the combination of porogen addition and freeze drying process [41,42]. Concentrated solutions of high molecular weight polysaccharide solutions being very viscous; a maximum of 20% (*w/w*) of porogen could be added to the polysaccharide solution (Table 1). Scaffolds formed with NaCl presented small and ovoid pores originating from ice crystal formation during the freeze drying process [58,59]. In both Na₂CO₃ and Combined scaffolds (NaCl+Na₂CO₃), two types of porosity were observed: large and very thin pores coming from the release of CO₂ after crosslinking [60,61] and smaller pores arising from the freeze-drying step. The small pores displayed in Na₂CO₃ were not visible after hydration, most likely due to polymer swelling in water. Indeed, these scaffolds absorb more than 10 times their weight in water (Table 1), but their total volume decrease by a factor of about 2.8 times. This suggests a high swelling of polysaccharide chains thereby concealing the small pores. In Combined-20 scaffolds compared to Na₂CO₃-10 scaffolds, which both contain the same amount of Na₂CO₃, we observed a higher number of small pores and a lower number of thin elongated pores. Hence, the presence of NaCl in the initial solution affect pore formation in Na₂CO₃ scaffolds.

The percentage of porosity between 30% and 50% and pore geometry of all scaffolds appear adapted for cell loading and infiltration. Besides, recent results also suggest that there is also nanoporosity that will allow nutrients and oxygen diffusion [59] which is not observable by confocal microscopy because of its technical limitations. The increase in porogen amount increases slightly but not significantly the total porosity of scaffolds. Upon immersion in PBS, the polysaccharide chains swelling in the center of the scaffolds fill in the pores. Therefore, the increase in pore size due to the increase in porogen amount is partially masked by the swelling of polymer chains. Phosphorous content analysis showed that phosphorous amount was higher in NaCl scaffolds than in all other formulations. Even though phosphorous is not strictly instructive on the effective bounds between two polysaccharide chains, i.e., crosslinking density, previous studies have shown that the mesh size calculated from phosphorous amount correlate with rheological behavior [46,59] and therefore can be used to appraise crosslink ratio. Although STMP crosslinking reaction is still not fully understood in such a complex system, we know that the STMP-mediated formation of phosphorous bound between hydroxyl groups in alkaline solution brings into play different mechanisms. Polysaccharides diluted in alkaline solution result in immediate alcoholate formation that can attack and open STMP resulting in polysaccharide-bound sodium tripolyphosphate. Next, another alcoholate can attack polysaccharide-bound sodium tripolyphosphate creating a phosphoester bond between two saccharide units. However, alcoholate attacks on phosphorous links are in competition with NaOH, suggesting that crosslinking reaction is very sensitive to pH [62,63]. We hypothesized that the presence of Na₂CO₃ in the starting polysaccharide solution, modulates osmotic pressure and therefore affects crosslinking reactions. This would explain the significantly higher phosphorous content observed for NaCl scaffolds compared to all other formulations. Swelling ratio and degradation time was increased when increasing porogen amount, especially for Combined-20 scaffolds. The biphasic *in vitro* degradation pattern of these scaffolds demonstrates that different factors govern enzymatic degradation rates. Firstly, the scaffold porosity is a major factor determining degradation rate because of enzyme diffusion and provided surface area. The lower porosity of NaCl scaffolds can explain the slow degradation compared to all others scaffolds. However, Na₂CO₃ and Combined scaffolds present a similar porosity but different degradation times. Although the surface area was not quantified in this study, the presence of small pores in Combined scaffolds compared to Na₂CO₃ scaffolds likely increases surface area and therefore degradation rate. A second parameter is the availability of

enzyme-binding motifs in the polysaccharide chains, influenced particularly by ionic interactions such as phosphate groups. Consequently, the less porous and more crosslinked scaffolds (NaCl) present a slower degradation rate, whereas the more porous scaffolds, presenting a large surface area, are degraded faster.

When HepG2 cells were seeded, we observed that cells were viable within all formulations of polysaccharide scaffolds forming various cell clusters geometries. The biophysical characteristics of 3D scaffolds highly influence cell behavior in terms of adhesion, viability, proliferation and functionality [64,65]. In the particular case of organoids in hydrogels that do not promote cell adhesion, cells spontaneously self-organize and therefore porosity—which controls the number of cells in a confined space—is an essential characteristic that dictates cell behavior [38,66]. Cell loading/infiltration is also the crucial initial step that will influence the performance of a 3D scaffold to support organoid development. In this study, dry scaffolds could be easily impregnated with a cell suspension, thanks to the hygroscopic properties of polysaccharides and pore interconnectivity. Moreover, cells were uniformly distributed, which is essential for future applications in tissue engineering. A higher cell loading was observed in NaCl scaffolds which correlated with small pores and a high swelling ratio. Besides, the large pores and more open surfaces observed in Na₂CO₃ or Combined scaffolds can explain the lower cell retention in the scaffolds and the variability of cell clusters sizes. HepG2 cells remain viable equally in all scaffolds for more than a week. Considering a doubling time of 48 h for this cell line on usual 2D substrates, proliferation is moderate in the 3D scaffolds, probably owing to an efficient cell loading and lack of available space but also because cells do not adhere to the scaffold surface. Moreover, formation of cell spheroids might reduce proliferation, since cells engage mostly in matrix production [66]. Therefore, the limited proliferation is not detrimental when considering the application of these scaffolds for organoid production with different cell types such as primary hepatocytes or differentiated hepatocytes from iPS which do not proliferate.

After seven days in culture, we demonstrated that cell clusters sizes match pore size and shape. We observed a noticeable difference of cell clusters size between the scaffolds produced using Na₂CO₃ where cell clusters are large compared to the other formulations displaying a majority of smaller clusters. This observation correlates with the presence of small pores in combined scaffolds. In contrast, increasing porogen amount did not result in a significant change of scaffold porosity nor cell clusters sizes. In organoids, cells usually experience mass transfer limitations because of the absence of a vascular network [6,11,20]. It was previously demonstrated that primary hepatocytes viability exponentially decreased at the center of spheroids of about 100–150 μm to the spheroid surface due to a decrease in oxygen [26,67–69]. In our study, more than 80% of hepatic constructs present a size lower than 100 μm in diameter if considering a spherical shape. Moreover, since the largest constructs present ovoid shapes, the volume is not a limitation to cell viability, as the maximum distance of cells located in the center of organoids are only a few cells away from the medium. Interestingly, viability was not impaired when HepG2 cells fill up pores completely. This possibly relates to the appropriate diffusion of oxygen and nutrients within the polysaccharide network. Indeed, diffusion coefficients of oxygen in hydrogels are dependent on the polymer concentration/density but remain in the same order of magnitude than diffusion in water about 10⁻⁹ m²/s [70–72]. Larger molecules such as glucose or albumin exhibit lower diffusivity with coefficients expected to be about 10⁻¹⁰ to 10⁻¹¹ m²/s if we consider that cell consumption is negligible [70]. Therefore, all types of scaffolds seem adapted for the development of viable small 3D cell constructs. Moreover, dynamic mechanical analysis revealed that scaffold elasticity is in the order of magnitude of elasticity of physiologic livers (4 kPa) [73–76].

HepG2 constructs in NaCl and Na₂CO₃ scaffolds differentiate and show specific functions of hepatocytes, such as expression of HNF4α, production of albumin and CYP3A4 activity. Hepatic constructs from both scaffolds demonstrate a profile of albumin secretion inversely proportional to CYP3A4, in agreement with data from the literature [51,52]. We found a low CYP3A4 activity of HepG2 constructs in our scaffolds similar to the limited activity observed for small size cell spheroids of less than 200 μm [66]. For larger HepG2 spheroids, hypoxic areas in HepG2 3D constructs

increases in the core and subsequently increases CYP3A4 activity [53]. In our study, no hypoxia or cell death was observed in 3D constructs which could explain the reduced activity of CYP3A4 overtime. Moreover, an acetaminophen-induced cytotoxicity assay demonstrated that HepG2 cells are sensitive in a concentration-dependent fashion. CYP3A4 activities are responsible of 30% to 50% metabolism of medications by the P450 system in humans [77], including acetaminophen, the most common used analgesic antipyretic agent and the major cause of toxic liver injury in Western countries. In addition, the presence of actin condensation between HepG2 cells suggest that the cells polarize to form bile canaliculi [54–57]. Although some of the structures observed appear as vacuoles, some canaliculi are connected therefore indicating cell clusters organization and early signs of polarization.

Therefore, our data suggest that hepatic constructs formed in both NaCl and Na₂CO₃ scaffolds are viable and functional. As polysaccharide hydrogels are easily adjustable in terms of microstructures and surface properties [40,46,47], these scaffolds are very promising for drug-toxicity studies but also for liver regenerative medicine as they can be GMP produced. Moreover, this platform can be adapted for other types of organoids with single or multiple cell types. This study is a first proof a concept for the use of these scaffolds in cell-self-assembly. Future works will be needed with more suitable cell types and to confirm these results in vitro and in vivo for hepatic organoid production and long-term viability and functionality.

4. Materials and Methods

4.1. Preparation of Scaffolds

Polysaccharide-based scaffolds were prepared as described in [41,42]. Briefly, a mixture of pullulan (Hayashibara Co., Ltd., Okayama Japan; Mw 200 kDa) and dextran (Pharmacosmos, Holbaek, Denmark; Mw 500 kDa) with a ratio 75:25 was prepared in water. Sodium chloride (NaCl) and/or sodium carbonate (Na₂CO₃) were added to the polysaccharide solution (Table 1). The polysaccharide blend was crosslinked under alkaline conditions (1 M sodium hydroxide) using 3% (*w/v*) STMP (Sigma) and casted between two glass plates before incubation at 50 °C for 20 min. The resulting gels were punched in wet state to obtain 5mm diameter and 1mm thick scaffolds that were equilibrated to neutral pH using 10× PBS and washed extensively with distilled water for at least 24 h to remove the porogen agent and the excess of salts. When Na₂CO₃ was used, scaffolds were firstly transferred into 20% acetic acid to allow CO₂ gas release before neutralization and rinsing. All scaffolds were freeze-dried in water or NaCl 0.025% (*w/v*) for the scaffolds with NaCl and stored at room temperature until use. The solubility and scaffold formation was evaluated with increasing quantities of porogens. For porosity analysis, 1% fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran 500 kDa (TdB Consultancy, Uppsala, Sweden) was added to the polymer solution before crosslinking.

4.2. Characterization of Biophysical Properties of Scaffolds

4.2.1. Phosphorous Content Analysis

About 20 mg of each scaffold were degraded with 1 mL of 10% nitric acid and incubated at 105 °C for 3 h. Subsequently, 0.4 mL of 14.7 M nitric acid, 2 mL of 10 mM ammonium metavanadate, and 2 mL of 40 μM ammonium molybdate tetrahydrate were added into each sample. Phosphorous ions concentration was then determined by spectrophotometry at 405 nm using a phosphoric acid standard curve. Samples were run in triplicates and results were expressed as mean values ± SD.

4.2.2. Swelling Behavior of the Scaffolds

Scaffolds were weighed before (w_i) and after (w_f) impregnation in 1X PBS for three days. Swelling ratio was determined by the following equation: $Sw = (w_f - w_i)/w_i$

4.2.3. In Vitro Enzymatic Degradation

Having determined scaffolds initial weight in 1× PBS, scaffolds were incubated at 37 °C in a solution of pullulanase (Sigma, E2412) and dextranase (Sigma, D0443) diluted, respectively, 1.5/10 and 0.75/10 in 1× PBS. Every 5 min scaffolds were retrieved and weighed after removing the excess of liquid using filter papers. Scaffolds degradation was followed overtime until 100% mass loss. Samples were run in triplicate and results were expressed as mean values ± SD.

4.2.4. Dynamic Mechanical Testing

Hydrogels of 25 mm in diameter and 1 cm height were prepared and hydrated in PBS for two weeks before analysis on Discovery HR2 (TA Instruments, Guyancourt, France) rheometer. Shear stress measurements were performed in PBS under oscillation mode using 25 mm aluminum plate geometries fitted with sandpaper, grit size 600, to avoid sample slippage during measurement. Viscoelastic linear domains were determined by an amplitude sweep between 0.01% to 10% strain with a constant frequency of 1 Hz at 25 °C. To ensure minimal compression, normal force was kept constant at 0.3 ± 0.1 N. Samples were run in triplicate and results expressed as mean values ± SD.

4.3. Characterization of Scaffolds Microstructure

The microstructure of the freeze-dried scaffolds was analyzed using Scanning Electron Microscopy (SEM). Scaffolds were cut vertically using a razor blade and glued to sample holders to observe the inner structure in a SEM JSM-IT100 InTouchScope™ (Jeol, Croissy, France) under low vacuum mode (40 Pa) at a 20-kV acceleration voltage.

For porosity analysis in wet state, scaffolds containing FITC-Dextran were hydrated in 1× PBS and analyzed using 2-photon Leica SP8 microscope fitted with a HCX IRAPO L 25X objective (CRI—U1149 Imaging facility). Confocal slices (3 µm deep) were imaged over about 150–200 µm in the scaffold depth with biphoton excitation at 750 nm. A macro was written specifically to determine polymer and pore volumes in 3D Stacks using FIJI freeware. Briefly, the images intensities were normalized in the gel depth before applying an intensity threshold to obtain a binary image. The plugging 3D object counter [78] was used to detect objects corresponding to the pores in the scaffolds and the total volume and pores volumes were calculated and compiled. Total volume analyzed per scaffold was at least 0.15 mm³, with at least six scaffolds analyzed for each condition.

4.4. Cell Culture and Loading into 3D Scaffolds

HepG2 cells (Human hepatocellular carcinoma) were obtained from ATCC® (HB8065™) and cultured in Dulbecco's modified Eagle's Medium DMEM 4.5 g/L glucose supplemented with 10% Fetal Bovine Serum and 1% antibiotic-antimycotic (Sigma, France). The scaffolds were sterilized under UV light for 30 min before cell culture. Cell loading into scaffolds was performed using syringe-induced vacuum, adapted from [79]. Briefly, all scaffolds were introduced in a syringe along with a cell suspension; the plunger was introduced and the syringe tip was closed using a 3-way valve. Vacuum was induced by moving the plunger of about 3 cm up and down until the scaffold were fully impregnated, i.e., when they become transparent. Maximum cell loading efficiency was determined beforehand and a seeding density of approximately 100,000 cells per scaffold, i.e., 1428 cells/µL, was chosen. Scaffolds were placed in 24-well plates with 1 mL DMEM.

4.5. Cell Clusters Size and Shape Analysis

Cellularized scaffolds were fixed with paraformaldehyde 4% for 1 h at room temperature, rinsed three times with 1× PBS, permeabilized with 0.1% Triton X100 for 1h followed by incubation in a solution of Phalloidin (Phalloidin-TRITC 1/200, Sigma) and DAPI (Sigma, 1 µg/mL) for 1 h at room temperature. 3D stacks were obtained using an inverted Zeiss LSM 780 confocal microscope fitted with a 10× objective (CRI—U1149 Imaging facility) over up to 400 µm in the scaffold depth to analyze cell

clusters size and shape. Images were reconstructed in 3D using Imaris software and a semi-automatic analysis allowed the detection of objects corresponding to the cell clusters. A background intensity threshold and minimal exclusion size of about one cell were set manually, individual items too close to be separated automatically were split manually and filters were applied to remove objects not entirely in the field of view. The volumes of cell clusters were then evaluated automatically for at least three samples per condition and a total of more than 150 cell clusters were analyzed.

4.6. Cell Viability Assay

4.6.1. Live–Dead Analysis

Live–dead analysis was performed at day one, four and seven to analyze the viability in the depth of the scaffolds. Calcein AM (Invitrogen, Les Ulis France) and Ethidium homodimer (Molecular Probes™), were diluted in culture medium at 1/500 and 1/200 ratios, respectively, and incubated with the cellularized scaffolds for 1 h. After rinsing twice with 1× PBS, imaging was performed using Zeiss LSM 780 confocal microscope (CRI—U1149 Imaging facility) over about 300 µm in the depth of the scaffold. The percentage of live and dead cells was determined in the gel depth. Briefly, cells were counted manually on 3 µm deep confocal slices every 30 µm on at least five different samples for each condition.

4.6.2. Resazurin Assay

Metabolic activity quantification was performed at day one, four and seven using the In Vitro Toxicology Assay Kit (MTT based, Sigma-Aldrich France). Seeded scaffolds were transferred to a 48-well plate and incubated with 0.5 mL of resazurin for 2.5 h at 37 °C. Fluorescence of the resulting solution was measured Using Infinite M200 Pro, TECAN® plate reader (560Ex/590Em). All samples were run in triplicate in triplicate in three different experiments.

4.7. Cell Functionality Analysis

4.7.1. Albumin Secretion

Albumin secretion in cell culture medium was determined overtime by an ELISA assay (Thermo Scientific™) according to the manufacturer's recommendations. Standards and samples were incubated in the Anti-Human Albumin Precoated 96-well Strip Plate for 2.5 h at room temperature and washed four times before the addition of a biotinylated antibody. After rinsing, the streptavidin–HRP reagent was incubated. Finally, TMB substrate was added and the absorbance was measured at 450 and 550 nm using the Infinite M200 Pro, TECAN® plate reader (Tecan, Männedorf, Switzerland). All samples were run in triplicate.

4.7.2. CYP3A4 Activity

Cytochrome P450 3A4 (CYP3A4) activity was analyzed using P450-Glo™ CYP3A4 Assay (Promega). Briefly, a pro-luciferin substrate was added to the cell culture medium and incubated for 1 h at 37 °C. Aliquots of supernatants were collected and incubated with the luminogenic detection reagent before luminescence reading using TECAN® plate reader. All samples were run in triplicate.

4.7.3. Cell Number Assessment

To normalize cell activity to number of cells, total protein content was determined using Micro BCA™ Protein Assay Kit (Thermo Scientific™). Hydrogels were digested using pullulanase and dextranase diluted in 1X PBS (respectively 1/10 and 1/20) for about 40 min at 37 °C. Cells were rinsed twice with 1X PBS and lysed in 350 µl of cold TRIS-EDTA lysis buffer (Invitrogen™ T11493) and homogenized using 25-G needles. Cell numbers were calculated thanks to a standard curve of known cells concentrations and used to normalize albumin production and CYP3A4 activity.

4.7.4. Albumin and HNF4 α Staining

Scaffolds containing HepG2 cell clusters were fixed after seven days in paraformaldehyde 4% and rinsed before blocking and permeabilization in 1% BSA 0,1% Triton for 3 h at room temperature. Anti-albumin primary antibody (Tebu-bio Cedarlane, 007CL2513A, 1/200) was incubated for 24 h at 4 °C in blocking solution, followed by extensive rinsing. Anti-HNF4 α antibody (Ozyme Atlas, HPA004712, 1/150) was then incubated for 3 h at room temperature and finally after rinsing the secondary antibodies, AlexaFluor 555 anti-mouse Alexa Fluor 647 anti-rabbit (Invitrogen™, 1/200) were applied for 1.5 h at room temperature. Samples were observed using Zeiss LSM 780 confocal microscope fitted with a 10 \times objective (CRI—U1149 Imaging facility).

4.8. Acetaminophen Dose-Toxicity Analysis

Acetaminophen dose response was analyzed in the 3D scaffolds at day seven. HepG2 cells were treated for 24 h with increasing concentrations of acetaminophen (Sigma). As acetaminophen is not fully solubilized above 100 mM, 200 mM acetaminophen solutions were prepared separately for each well for reproducibility purposes. Cell viability was quantified using resazurin-based metabolic activity (2 h incubation at 37 °C). Fluorescence was measured using Infinite M200 Pro, TECAN® plate reader (560Ex/590Em). Data were expressed as a percentage of unstimulated cells viability. Fits of cell viability concatenated data were drawn using Origin software to determine EC₅₀ (half maximal effective concentration). Experiments were done in triplicate with 8–16 samples per experiment.

4.9. Statistical Analysis

All experiments were carried out at least in triplicate and statistical analysis was performed using Student's *t*-test for all analysis except for viability and functionality analysis overtime where ANOVA with Tukey's post-test was used. Statistical significance was indicated as * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

5. Conclusions

The aim of this project was to produce viable and functional hepatic constructs within polysaccharide-based scaffolds with different structures, and to determine whether these structures could affect cell morphology, viability and functionality. Pullulan-dextran hydrogels devoid of any components of human or animal origin were prepared easily in the absence of organic solvent using pharmaceutical-grade polysaccharides and a process that can be translated in industry to produce GMP scaffolds. Our results showed that different porosities can be created depending on the porogen. Cell loading efficiency was inversely proportional to porosity and hepatocytes formed constructs that match with pore size and geometry. In small spherical pores, cells mostly condensed to form spherical cell clusters, whereas in large elongated pores, cells formed long and thin cell constructs. In all types of scaffolds, HepG2 cells were highly viable, proliferate for seven days and present characteristics of functional organoids such as albumin production, CYP3A4 activity and sensitivity to acetaminophen. Therefore, hepatic organoids in such a 3D microenvironment with adjustable properties can be adapted for in vitro drug screening, in vivo implantations and extracorporeal devices.

Author Contributions: Conceptualization, M.-N.L. and D.L.; validation, M.-N.L., C.L.G., R.A.-L., N.E.S., S.L., and T.S.-Y.; formal analysis, M.-N.L.; investigation, M.-N.L., C.L.G., R.A.-L., N.E.S., S.L.; resources, D.L.; writing—original draft preparation, M.-N.L.; writing—review and editing, M.-N.L., D.L., C.L.G., T.S.-Y., R.A.-L., S.L.; visualization, M.-N.L.; project administration, D.L.; funding acquisition, D.L. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by “Recherche Hospitalo-universitaire” Innovations for Liver Tissue Engineering (RHU iLite), grant number ANR-16-RHUS-0005. Works from the Laboratory U1148 are supported by Inserm, Université Sorbonne Paris Nord, and Université de Paris.

Acknowledgments: We acknowledge Samira Bennada of the CRI U1149 Imaging facility for technical support, Anne Dubart-Kupperschmitt and Antonietta Messina for fruitful discussions.

Conflicts of Interest: D.L. has shares in SILTISS company that acquired from INSERM four patents related to the production of polysaccharide scaffolds for tissue regeneration.

Abbreviations

NaCl	Sodium Chloride
Na ₂ CO ₃	Sodium carbonate
PBS	Phosphate Buffer Saline
SEM	Scanning Electron Microscopy
STMP	Sodium Trimetaphosphate
CYP3A4	Cytochrome P450 3A4
EC ₅₀	Half Maximal Effective Concentration

References

- Asrani, S.K.; Devarbhavi, H.; Eaton, J.; Kamath, P.S. Burden of liver diseases in the world. *J. Hepatol.* **2019**, *70*, 151–171. [[CrossRef](#)]
- Ananthanarayanan, A.; Narmada, B.C.; Mo, X.; McMillian, M.; Yu, H. Purpose-driven biomaterials research in liver-tissue engineering. *Trends Biotechnol.* **2011**, *29*, 110–118. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Takebe, T.; Sekine, K.; Enomura, M.; Koike, H.; Kimura, M.; Ogaeri, T.; Zhang, R.-R.; Ueno, Y.; Zheng, Y.-W.; Koike, N.; et al. Vascularized and functional human liver from an iPSC-derived organ bud transplant. *Nature* **2013**, *499*, 481–484. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Takebe, T.; Sekine, K.; Kimura, M.; Yoshizawa, E.; Ayano, S.; Koido, M.; Funayama, S.; Nakanishi, N.; Hisai, T.; Kobayashi, T.; et al. Massive and Reproducible Production of Liver Buds Entirely from Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* **2017**, *21*, 2661–2670. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Legallais, C.; Kim, D.; Mihaila, S.M.; Mihajlovic, M.; Figliuzzi, M.; Bonandrini, B.; Salerno, S.; Yousef Yengej, F.A.; Rookmaaker, M.B.; Sanchez Romero, N.; et al. Bioengineering Organs for Blood Detoxification. *Adv. Healthc. Mater.* **2018**, *7*, e1800430. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Shah, S.B.; Singh, A. Cellular self-assembly and biomaterials-based organoid models of development and diseases. *Acta Biomater.* **2017**, *53*, 29–45. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Huh, D.; Hamilton, G.A.; Ingber, D.E. From 3D cell culture to organs-on-chips. *Trends Cell Biol.* **2011**, *21*, 745–754. [[CrossRef](#)]
- Astashkina, A.; Grainger, D.W. Critical analysis of 3-D organoid in vitro cell culture models for high-throughput drug candidate toxicity assessments. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2014**, *69*, 1–18. [[CrossRef](#)]
- Vasanthan, K.S.; Subramanian, A.; Krishnan, U.M.; Sethuraman, S. Role of biomaterials, therapeutic molecules and cells for hepatic tissue engineering. *Biotechnol. Adv.* **2012**, *30*, 742–752. [[CrossRef](#)]
- Wang, B.; Jakus, A.E.; Baptista, P.M.; Soker, S.; Soto-Gutierrez, A.; Abecassis, M.M.; Shah, R.N.; Wertheim, J.A. Functional Maturation of Induced Pluripotent Stem Cell Hepatocytes in Extracellular Matrix-A Comparative Analysis of Bioartificial Liver Microenvironments. *STEM CELLS Transl. Med.* **2016**, *5*, 1257–1267. [[CrossRef](#)]
- Van Grunsven, L.A. 3D in vitro models of liver fibrosis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2017**, *121*, 133–146. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Selden, C.; Bundy, J.; Erro, E.; Puschmann, E.; Miller, M.; Kahn, D.; Hodgson, H.; Fuller, B.; Gonzalez-Molina, J.; Le Lay, A.; et al. A clinical-scale BioArtificial Liver, developed for GMP, improved clinical parameters of liver function in porcine liver failure. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 14518. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Stevens, K.R.; Scull, M.A.; Ramanan, V.; Fortin, C.L.; Chaturvedi, R.R.; Knouse, K.A.; Xiao, J.W.; Fung, C.; Mirabella, T.; Chen, A.X.; et al. In situ expansion of engineered human liver tissue in a mouse model of chronic liver disease. *Sci. Transl. Med.* **2017**, *9*, eaah5505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Coward, S.M.; Legallais, C.; David, B.; Thomas, M.; Foo, Y.; Mavri-Damelin, D.; Hodgson, H.J.; Selden, C. Alginate-encapsulated HepG2 Cells in a Fluidized Bed Bioreactor Maintain Function in Human Liver Failure Plasma. *Artif. Organs* **2009**, *33*, 1117–1126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Willemsse, J.; Lieshout, R.; van der Laan, L.J.W.; Versteegen, M.M.A. From organoids to organs: Bioengineering liver grafts from hepatic stem cells and matrix. *Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol.* **2017**, *31*, 151–159. [[CrossRef](#)]

16. Lee, H.; Han, W.; Kim, H.; Ha, D.-H.; Jang, J.; Kim, B.S.; Cho, D.-W. Development of Liver Decellularized Extracellular Matrix Bioink for Three-Dimensional Cell Printing-Based Liver Tissue Engineering. *Biomacromolecules* **2017**, *18*, 1229–1237. [[CrossRef](#)]
17. Lewis, P.L.; Green, R.M.; Shah, R.N. 3D-printed gelatin scaffolds of differing pore geometry modulate hepatocyte function and gene expression. *Acta Biomater.* **2018**, *69*, 63–70. [[CrossRef](#)]
18. Mehta, G.; Hsiao, A.Y.; Ingram, M.; Luker, G.D.; Takayama, S. Opportunities and challenges for use of tumor spheroids as models to test drug delivery and efficacy. *J. Control. Release* **2012**, *164*, 192–204. [[CrossRef](#)]
19. Moshksayan, K.; Kashaninejad, N.; Warkiani, M.E.; Lock, J.G.; Moghadas, H.; Firoozabadi, B.; Saidi, M.S.; Nguyen, N.-T. Spheroids-on-a-chip: Recent advances and design considerations in microfluidic platforms for spheroid formation and culture. *Sens. Actuators B Chem.* **2018**, *263*, 151–176. [[CrossRef](#)]
20. Underhill, G.H.; Khetani, S.R. Bioengineered Liver Models for Drug Testing and Cell Differentiation Studies. *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* **2018**, *5*, 426–439.e421. [[CrossRef](#)]
21. Dunn, J.C.Y.; Yarmush, M.L.; Koebe, H.G.; Tompkins, R.G. Hepatocyte Function and Extracellular-Matrix Geometry—Long-Term Culture in a Sandwich Configuration. *FASEB J.* **1989**, *3*, 174–177. [[CrossRef](#)]
22. Lu, Y.; Zhang, G.; Shen, C.; Uygun, K.; Yarmush, M.L.; Meng, Q. A novel 3D liver organoid system for elucidation of hepatic glucose metabolism. *Biotechnol. Bioeng.* **2012**, *109*, 595–604. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Leite, S.B.; Roosens, T.; El Taghdouini, A.; Mannaerts, I.; Smout, A.J.; Najimi, M.; Sokal, E.; Noor, F.; Chesne, C.; van Grunsven, L.A. Novel human hepatic organoid model enables testing of drug-induced liver fibrosis in vitro. *Biomaterials* **2016**, *78*, 1–10. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Sendi, H.; Mead, I.; Wan, M.; Mehrab-Mohseni, M.; Koch, K.; Atala, A.; Bonkovsky, H.L.; Bishop, C.E. miR-122 inhibition in a human liver organoid model leads to liver inflammation, necrosis, steatofibrosis and dysregulated insulin signaling. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0200847. [[CrossRef](#)]
25. Manley, P.; Lelkes, P.I. A novel real-time system to monitor cell aggregation and trajectories in rotating wall vessel bioreactors. *J. Biotechnol.* **2006**, *125*, 416–424. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Glicklis, R.; Merchuk, J.C.; Cohen, S. Modeling mass transfer in hepatocyte spheroids via cell viability, spheroid size, and hepatocellular functions. *Biotechnol. Bioeng.* **2004**, *86*, 672–680. [[CrossRef](#)]
27. Miyamoto, Y.; Ikeuchi, M.; Noguchi, H.; Yagi, T.; Hayashi, S. Spheroid Formation and Evaluation of Hepatic Cells in a Three-Dimensional Culture Device. *Cell Med.* **2015**, *8*, 47–56. [[CrossRef](#)]
28. Wong, S.F.; No, D.Y.; Choi, Y.Y.; Kim, D.S.; Chung, B.G.; Lee, S.-H. Concave microwell based size-controllable hepatosphere as a three-dimensional liver tissue model. *Biomaterials* **2011**, *32*, 8087–8096. [[CrossRef](#)]
29. Gevaert, E.; Billiet, T.; Declercq, H.; Dubrue, P.; Cornelissen, R. Galactose-Functionalized Gelatin Hydrogels Improve the Functionality of Encapsulated Hepg2 Cells. *Macromol. Biosci.* **2014**, *14*, 419–427. [[CrossRef](#)]
30. Au, S.H.; Chamberlain, M.D.; Mahesh, S.; Sefton, M.V.; Wheeler, A.R. Hepatic organoids for microfluidic drug screening. *Lab Chip* **2014**, *14*, 3290–3299. [[CrossRef](#)]
31. Lim, W.; Park, S. A Microfluidic Spheroid Culture Device with a Concentration Gradient Generator for High-Throughput Screening of Drug Efficacy. *Molecules* **2018**, *23*, 3355. [[CrossRef](#)]
32. Mattei, G.; Ahluwalia, A. Sample, testing and analysis variables affecting liver mechanical properties: A review. *Acta Biomater.* **2016**, *45*, 60–71. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Dvir-Ginzberg, M.; Gamlieli-Bonshtein, I.; Agbaria, R.; Cohen, S. Liver tissue engineering within alginate scaffolds: Effects of cell-seeding density on hepatocyte viability, morphology, and function. *Tissue Eng.* **2003**, *9*, 757–766. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tripathi, A.; Melo, J.S. Preparation of a sponge-like biocomposite agarose–chitosan scaffold with primary hepatocytes for establishing an in vitro 3D liver tissue model. *RSC Adv.* **2015**, *5*, 30701–30710. [[CrossRef](#)]
35. Garnier, D.; Li, R.; Delbos, F.; Fourrier, A.; Collet, C.; Guguen-Guillouzo, C.; Chesné, C.; Nguyen, T.H. Expansion of human primary hepatocytes in vitro through their amplification as liver progenitors in a 3D organoid system. *Sci. Rep.* **2018**, *8*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Takai, A.; Fako, V.; Dang, H.; Forgues, M.; Yu, Z.; Budhu, A.; Wang, X.W. Three-dimensional Organotypic Culture Models of Human Hepatocellular Carcinoma. *Sci. Rep.* **2016**, *6*. [[CrossRef](#)]
37. Soto-Gutierrez, A.; Navarro-Alvarez, N.; Yagi, H.; Nahmias, Y.; Yarmush, M.L.; Kobayashi, N. Engineering of an Hepatic Organoid to Develop Liver Assist Devices. *Cell Transplant.* **2010**, *19*, 815–822. [[CrossRef](#)]
38. Shteyer, E.; Ya'acov, A.B.; Zolotaryova, L.; Sinai, A.; Lichtenstein, Y.; Pappo, O.; Kryukov, O.; Elkayam, T.; Cohen, S.; Ilan, Y. Reduced liver cell death using an alginate scaffold bandage: A novel approach for liver reconstruction after extended partial hepatectomy. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 3209–3216. [[CrossRef](#)]

39. Chaouat, M.; Le Visage, C.; Autissier, A.; Chaubet, F.; Letourneur, D. The evaluation of a small-diameter polysaccharide-based arterial graft in rats. *Biomaterials* **2006**, *27*, 5546–5553. [[CrossRef](#)]
40. Autissier, A.; Visage, C.L.; Pouzet, C.; Chaubet, F.; Letourneur, D. Fabrication of porous polysaccharide-based scaffolds using a combined freeze-drying/cross-linking process. *Acta Biomater.* **2010**, *6*, 3640–3648. [[CrossRef](#)]
41. Autissier, A.; Chaubet, F.; Letourneur, D.; Le Visage, C. Preparing porous scaffold for tissue engineering, 3 dimensional (3D) cell culture or cell delivery for therapeutic use, by preparing an alkaline aqueous solution, freezing the aqueous solution, and sublimating the frozen solution. U.S. patent No. 20150246163, 9 March 2015.
42. Letourneur, D.; Le Visage, C. Preparing porous scaffold for tissue engineering, cell culture and cell delivery by preparing alkaline aqueous solution, transforming solution into hydrogel, submerging hydrogel into aqueous solution and washing the obtained porous scaffold. U.S. patent No. 20200016294, 16 January 2020.
43. Fricain, J.C.; Schlaubitz, S.; Le Visage, C.; Arnault, I.; Derkaoui, S.M.; Siadous, R.; Catros, S.; Lalande, C.; Bareille, R.; Renard, M.; et al. A nano-hydroxyapatite–Pullulan/dextran polysaccharide composite macroporous material for bone tissue engineering. *Biomaterials* **2013**, *34*, 2947–2959. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
44. Guerrero, J.; Catros, S.; Derkaoui, S.M.; Lalande, C.; Siadous, R.; Bareille, R.; Thébaud, N.; Bordenave, L.; Chassande, O.; Le Visage, C.; et al. Cell interactions between human progenitor-derived endothelial cells and human mesenchymal stem cells in a three-dimensional macroporous polysaccharide-based scaffold promote osteogenesis. *Acta Biomater.* **2013**, *9*, 8200–8213. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Lavergne, M.; Derkaoui, M.; Delmau, C.; Letourneur, D.; Uzan, G.; Le Visage, C. Porous Polysaccharide-Based Scaffolds for Human Endothelial Progenitor Cells. *Macromol. Biosci.* **2012**, *12*, 901–910. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
46. Lanouar, S.; Aid-Launais, R.; Oliveira, A.; Bidault, L.; Closs, B.; Labour, M.-N.; Letourneur, D. Effect of cross-linking on the physicochemical and in vitro properties of pullulan/dextran microbeads. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2018**, *29*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
47. Abed, A.; Assoul, N.; Ba, M.; Derkaoui, S.M.; Portes, P.; Louedec, L.; Flaud, P.; Bataille, I.; Letourneur, D.; Meddahi-Pellé, A. Influence of polysaccharide composition on the biocompatibility of pullulan/dextran-based hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2011**, *96A*, 535–542. [[CrossRef](#)]
48. Capone, S.H.; Dufresne, M.; Rechel, M.; Fleury, M.-J.; Salsac, A.-V.; Paullier, P.; Daujat-Chavanieu, M.; Legallais, C. Impact of alginate composition: From bead mechanical properties to encapsulated HepG2/C3A cell activities for in vivo implantation. *PLoS ONE* **2013**, *8*, e62032. [[CrossRef](#)]
49. Glicklis, R.; Shapiro, L.; Agbaria, R.; Merchuk, J.C.; Cohen, S. Hepatocyte behavior within three-dimensional porous alginate scaffolds. *Biotechnol. Bioeng.* **2000**, *67*, 344–353. [[CrossRef](#)]
50. Luckert, C.; Schulz, C.; Lehmann, N.; Thomas, M.; Hofmann, U.; Hammad, S.; Hengstler, J.G.; Braeuning, A.; Lampen, A.; Hessel, S. Comparative analysis of 3D culture methods on human HepG2 cells. *Arch. Toxicol.* **2017**, *91*, 393–406. [[CrossRef](#)]
51. Ng, S.; Han, R.; Chang, S.; Ni, J.; Hunziker, W.; Goryachev, A.B.; Ong, S.H.; Yu, H. Improved hepatocyte excretory function by immediate presentation of polarity cues. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 2181–2191. [[CrossRef](#)]
52. Nishikawa, T.; Tanaka, Y.; Kusamori, K.; Mizuno, N.; Mizukami, Y.; Ogino, Y.; Shimizu, K.; Konishi, S.; Takahashi, Y.; Takakura, Y.; et al. Using size-controlled multicellular spheroids of murine adenocarcinoma cells to efficiently establish pulmonary tumors in mice. *Biotechnol. J.* **2017**, *12*, 1600513. [[CrossRef](#)]
53. Nishikawa, T.; Tanaka, Y.; Nishikawa, M.; Ogino, Y.; Kusamori, K.; Mizuno, N.; Mizukami, Y.; Shimizu, K.; Konishi, S.; Takahashi, Y.; et al. Optimization of Albumin Secretion and Metabolic Activity of Cytochrome P450 1A1 of Human Hepatoblastoma HepG2 Cells in Multicellular Spheroids by Controlling Spheroid Size. *Biol. Pharm. Bull.* **2017**, *40*, 334–338. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Boyer, J.L. Bile formation and secretion. *Compr. Physiol.* **2013**, *3*, 1035–1078. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Théard, D.; Steiner, M.; Kalicharan, D.; Hoekstra, D.; van Ijzendoorn, S.C.D.; Mostov, K. Cell Polarity Development and Protein Trafficking in Hepatocytes Lacking E-Cadherin/ β -Catenin-based Adherens Junctions. *Mol. Biol. Cell* **2007**, *18*, 2313–2321. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Tsukada, N.; Ackerley, C.A.; Phillips, M.J. The structure and organization of the bile canalicular cytoskeleton with special reference to actin and actin-binding proteins. *Hepatology* **1995**, *21*, 1106–1113. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Yumoto, A.U.; Watanabe, S.; Hirose, M.; Kitamura, T.; Yamaguchi, Y.; Sato, N. Structural and functional features of bile canaliculi in adult rat hepatocyte spheroids. *Liver* **1996**, *16*, 61–66. [[CrossRef](#)]
58. Zhang, Y.; Wang, C.; Jiang, W.; Zuo, W.; Han, G. Influence of Stage Cooling Method on Pore Architecture of Biomimetic Alginate Scaffolds. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)]

59. Grenier, J.; Duval, H.; Barou, F.; Lv, P.; David, B.; Letourneur, D. Mechanisms of pore formation in hydrogel scaffolds textured by freeze-drying. *Acta Biomater.* **2019**, *94*, 195–203. [CrossRef]
60. Purnama, A.; Aid-Launais, R.; Haddad, O.; Maire, M.; Mantovani, D.; Letourneur, D.; Hlawaty, H.; Le Visage, C. Fucoidan in a 3D scaffold interacts with vascular endothelial growth factor and promotes neovascularization in mice. *Drug Deliv. Transl. Res.* **2013**, *5*, 187–197. [CrossRef]
61. Wang, L.; Wu, Y.-K.; Ai, F.-F.; Fan, J.; Xia, Z.-P.; Liu, Y. Hierarchical Porous Polyamide 6 by Solution Foaming: Synthesis, Characterization and Properties. *Polymers* **2018**, *10*, 1310. [CrossRef]
62. Dulong, V.; Forbice, R.; Condamine, E.; Le Cerf, D.; Picton, L. Pullulan–STMP hydrogels: A way to correlate crosslinking mechanism, structure and physicochemical properties. *Polym. Bull.* **2011**, *67*, 455–466. [CrossRef]
63. Lack, S.; Dulong, V.; Picton, L.; Cerf, D.L.; Condamine, E. High-resolution nuclear magnetic resonance spectroscopy studies of polysaccharides crosslinked by sodium trimetaphosphate: A proposal for the reaction mechanism. *Carbohydr. Res.* **2007**, *342*, 943–953. [CrossRef]
64. Brassard, J.A.; Lutolf, M.P. Engineering Stem Cell Self-organization to Build Better Organoids. *Cell Stem Cell* **2019**, *24*, 860–876. [CrossRef] [PubMed]
65. Kourouklis, A.P.; Kaylan, K.B.; Underhill, G.H. Substrate stiffness and matrix composition coordinately control the differentiation of liver progenitor cells. *Biomaterials* **2016**, *99*, 82–94. [CrossRef] [PubMed]
66. Ramaiahgari, S.C.; den Braver, M.W.; Herpers, B.; Terpstra, V.; Commandeur, J.N.M.; van de Water, B.; Price, L.S. A 3D in vitro model of differentiated HepG2 cell spheroids with improved liver-like properties for repeated dose high-throughput toxicity studies. *Arch. Toxicol.* **2014**, *88*, 1083–1095. [CrossRef] [PubMed]
67. Anada, T.; Fukuda, J.; Sai, Y.; Suzuki, O. An oxygen-permeable spheroid culture system for the prevention of central hypoxia and necrosis of spheroids. *Biomaterials* **2012**, *33*, 8430–8441. [CrossRef] [PubMed]
68. Curcio, E.; Salerno, S.; Barbieri, G.; De Bartolo, L.; Drioli, E.; Bader, A. Mass transfer and metabolic reactions in hepatocyte spheroids cultured in rotating wall gas-permeable membrane system. *Biomaterials* **2007**, *28*, 5487–5497. [CrossRef]
69. Pingitore, P.; Sasidharan, K.; Ekstrand, M.; Prill, S.; Lindén, D.; Romeo, S. Human Multilineage 3D Spheroids as a Model of Liver Steatosis and Fibrosis. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 1629. [CrossRef]
70. McMurtrey, R.J. Analytic Models of Oxygen and Nutrient Diffusion, Metabolism Dynamics, and Architecture Optimization in Three-Dimensional Tissue Constructs with Applications and Insights in Cerebral Organoids. *Tissue Eng. Part C Methods* **2016**, *22*, 221–249. [CrossRef]
71. Ferrell, R.T.; Himmelblau, D.M. Diffusion coefficients of nitrogen and oxygen in water. *J. Chem. Eng. Data* **1967**, *12*, 111–115. [CrossRef]
72. Hulst, A.C.; Hens, H.J.H.; Buitelaar, R.M.; Tramper, J. Determination of the effective diffusion coefficient of oxygen in gel materials in relation to gel concentration. *Biotechnol. Tech.* **1989**, *3*, 199–204. [CrossRef]
73. Chatelin, S.; Oudry, J.; Perichon, N.; Sandrin, L.; Allemann, P.; Soler, L.; Willinger, R. In vivo liver tissue mechanical properties by Transient Elastography: Comparison with Dynamic Mechanical Analysis. *Biorheology* **2011**, *48*, 75–88. [CrossRef]
74. Liu, Z.; Bilston, L. On the viscoelastic character of liver tissue: Experiments and modelling of the linear behaviour. *Biorheology* **2000**, *37*, 191–201. [PubMed]
75. Marchesseau, S.; Heimann, T.; Chatelin, S.; Willinger, R.; Delingette, H. Fast porous visco-hyperelastic soft tissue model for surgery simulation: Application to liver surgery. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2010**, *103*, 185–196. [CrossRef] [PubMed]
76. Guimaraes, C.F.; Gasperini, L.; Marques, A.P.; Reis, R.L. The stiffness of living tissues and its implications for tissue engineering. *Nat. Rev. Mater.* **2020**. [CrossRef]
77. Available online: <https://ansm.sante.fr/> (accessed on 18 April 2020).
78. Bolte, S.; Cordelieres, F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **2006**, *224*, 213–232. [CrossRef] [PubMed]
79. Antunes, J.C.; Oliveira, J.M.; Reis, R.L.; Soria, J.M.; Gómez-Ribelles, J.L.; Mano, J.F. Novel poly(L-lactic acid)/hyaluronic acid macroporous hybrid scaffolds: Characterization and assessment of cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2010**, *94*, 856–869. [CrossRef]



Résumé :

Les plaies chroniques sont des lésions cutanées dont le processus de cicatrisation normal est altéré. Elles peuvent avoir de graves conséquences pour les patients. Le projet de cette thèse CIFRE repose sur le développement de matrices de polysaccharides (pullulane/dextrane) tridimensionnelles poreuses, qui ont été modifiées dans le but d'améliorer la cicatrisation de ces plaies sévères et chroniques. Ces matrices ont été dans un premier temps fonctionnalisées pour délivrer des molécules d'origine végétale utilisées en cosmétique avec une efficacité potentielle pour la cicatrisation. Trois méthodes ont été étudiées pour incorporer ces molécules dans les matrices. Deux profils de libération ont pu être mis en évidence: l'un, très lent, basé sur la dégradation du matériau et l'autre, rapide. Ces cinétiques ont été confirmées à travers des modèles *in vitro*, *ex vivo* et *in vivo*. Dans un second temps, les matrices ont été enrichies soit avec un constituant naturel de la matrice extracellulaire (MEC), soit avec des charges pour améliorer les interactions cellulaires. Ces modifications ont permis d'améliorer l'invasion des deux types cellulaires majoritaires de la peau (kératinocytes et fibroblastes) et l'adhésion de composants de la MEC au matériau. Des études préliminaires *in vivo* ont montré des résultats encourageants par rapport à un produit commercialisé largement utilisé, Intégra®. Les différentes formulations d'hydrogels qui ont été synthétisées au cours de ce travail ont permis la mise au point d'une plateforme libérant des composés pour accélérer la cicatrisation, et de substituts cutanés qui agissent comme une matrice provisoire pour améliorer le processus de réparation.

Mots clés : plaies chroniques, cicatrisation cutanée, hydrogels, plateforme de libération, substitut cutané

Abstract:

Chronic wounds are skin lesions with an impaired healing process that can have serious consequences for patients. This CIFRE thesis is based on the development of porous three-dimensional polysaccharides (pullulan/dextran) matrices, that have been modified in order to improve the healing of severe and chronic wounds. The matrices were first functionalized to deliver molecules originating from plants which are used in the cosmetics domain and have potential effect to heal the wounds. Three methods have been studied to incorporate these molecules into the matrices. Two release profiles have been highlighted: a very slow one, based on the degradation of the material and another more rapid one. The kinetics have been confirmed through *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* models. In a second step, these matrices were enriched with either a natural component of the extracellular matrix (ECM), or with charges in order to improve interactions with the cellular environment. These modifications improved adhesion of two major skin cell types (keratinocytes and fibroblasts) and of ECM components onto the matrix. Preliminary studies, conducted *in vivo*, have shown encouraging results in comparison to a widely used commercial product: Intégra®. The various hydrogel formulations that have been synthesized have enabled the development of: a platform to deliver active compounds accelerating the healing process, and skin substitutes that act as a temporary matrix to improve skin repair.

Key words: chronic wounds, wound healing, hydrogels, delivery platform, cutaneous substitute