



HAL
open science

Biomatériaux auto-supportés et dégradables pour l'ingénierie tissulaire : association d'un gel de fibrine et d'un réseau de polymère synthétique

Marie Deneufchatel

► **To cite this version:**

Marie Deneufchatel. Biomatériaux auto-supportés et dégradables pour l'ingénierie tissulaire : association d'un gel de fibrine et d'un réseau de polymère synthétique. Sciences du Vivant [q-bio]. université Paris-Seine, 2016. Français. NNT : . tel-01501734

HAL Id: tel-01501734

<https://hal.science/tel-01501734>

Submitted on 4 Apr 2017

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



École doctorale Sciences et Ingénierie

De l'Université de Paris-Seine

THÈSE

Préparée en vue de l'obtention du grade de Docteur de l'université Paris-Seine

Sciences de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biomatériaux

Marie Deneufchâtel

**Biomatériaux auto-supportés et dégradables pour
l'ingénierie tissulaire : association d'un gel de fibrine
et d'un réseau de polymère synthétique**

Préparée au sein de la Fédération des Matériaux (I-Mat) de l'Université de Cergy-Pontoise :

- Equipe de Recherche sur les Relations Matrice Extracellulaire Cellules (EA 1391).
- Laboratoire de Physico-chimie des Polymères et des Interfaces (EA 2528).

Soutenue publiquement le 30 Septembre 2016, devant le jury composé de :

Christophe Egles	Professeur, Université de Technologies de Compiègne	Rapporteur
Jacques Desbrières	Professeur, Université de Pau et des pays de l'Adour	Rapporteur
Bruno Mortaigne	Représentant de la DGA	Examineur
Dominique Hourdet	Professeur, Université Pierre et Marie Curie (Paris 6)	Examineur
Odile Fichet	Professeur, Université de Cergy-Pontoise	Directrice de thèse
Véronique Larreta-Garde	Professeur, Université de Cergy-Pontoise	Directrice de thèse

Remerciements

L'écriture des remerciements est l'un des dernières étapes de la thèse, mais pas nécessairement la plus facile, car il s'agit de n'oublier aucune des personnes qui ont contribué à cette aventure, mes compagnons d'aventure, ceux sans qui cette thèse n'aurait pas eu lieu et ceux qui m'ont entouré pendant ces trois dernières années (et demi, si l'on compte le stage de master).

Je commencerai naturellement par remercier les membres de mon jury, qui ont accepté de lire et juger ce travail, et qui l'ont fait avec grand sérieux. Je remercie donc M. Dominique Hourdet, et M. Bruno Mortaigne, mes examinateurs, ainsi que M. Christophe Egles et M. Jacques Desbrières, mes rapporteurs. Les échanges que nous avons pu avoir en amont et le jour de la soutenance ont été la preuve de l'intérêt qu'ils ont porté à mon travail, ce pourquoi je suis très reconnaissante.

Je tiens ensuite à remercier mes deux directrices de thèse, qui ont initié ce travail, en me recrutant lors de mon stage de master (quand j'étais « petite »...) et qui se sont ensuite démenées pour obtenir un financement me permettant de continuer l'aventure en thèse. Pas moins de trois demandes financements plus tard, nous avons eu la joie d'avoir le feu vert de la Direction Générale de l'Armement, que je remercie sincèrement d'avoir rendu cette thèse matériellement possible.

Merci à Véronique Larreta-Garde, tout d'abord pour ses formidables cours d'enzymologie, qui m'ont donné goût pour cette discipline ardue mais ô combien passionnante, et pour ses cours de biotechnologie de master. Merci ensuite pour les longues heures passées en réunions, pour tous ces échanges constructifs et vos conseils concernant les manips. Merci aussi d'avoir su accommoder mon caractère un peu (très ?) têtu et ma tendance à avancer à 300 à l'heure...

Merci à Odile Fichet, qui a su m'apprendre énormément de choses concernant la chimie des polymères pendant ces trois années et demi, alors que mes connaissances étaient extrêmement basiques au début de cette thèse. Merci aussi pour nos innombrables discussions, le plus souvent scientifiques, jusqu'à des heures fort tardives parfois. Le fait que votre porte soit toujours ouverte et que vous soyez toujours disponibles pour me débloquer dans les calculs ou les manips sont des choses pour lesquelles je ne pourrais être assez reconnaissante. Merci aussi pour votre soutien tout au long de ma dernière année de thèse, alors que j'avais choisi de commencer à réviser les concours de l'enseignement en parallèle des manips.

Vous avez toutes les deux été deux très bonnes encadrantes et je vous remercie encore pour votre soutien, votre complémentarité et la pertinence de vos conseils qui m'ont accompagné tout au long de ce travail.

Merci d'avoir contribué de la sorte à ce que ces 3 années soit une excellente expérience personnelle, et merci aussi de me soutenir dans mon changement d'orientation.

Je voudrais ensuite remercier les directeurs des deux laboratoires dans lesquels j'ai travaillé, le Pr Frédéric Vidal pour le LPPI et le Pr Olivier Gallet, pour ERRMECe. J'ai énormément apprécié votre disponibilité, votre intérêt pour ma thèse et les discussions que nous avons pu avoir. Je suis également très reconnaissante pour le fait que vous passiez de si longues heures à travailler au labo car cela me permettait de démarrer mes manips de bon matin et de les achever ... à des heures pas forcément raisonnable mais j'imagine que c'est ainsi que l'on obtient tous les résultats que l'on souhaite pendant ces trois années qui passent bien vite finalement !

Je remercie également l'ensemble des membres permanents du LPPI, pour leurs différentes compétences et pour toutes les discussions que nous avons eu pendant cette thèse. Merci pour tous les efforts que vous avez fait pour comprendre mes problèmes de biochimiste (37°C, pendant de solvants « méchants » ...) et les solutions que nous avons pu élaborer ! Un grand merci à Cédric Vancaeyzeele, avec qui j'ai commencé à apprendre les bases des analyses des matériaux polymères. Tes connaissances en rhéologie et en analyses thermiques m'ont été bien précieuses et merci de m'en avoir transmis autant, et avec tant de clarté ! Merci également à Layla et Séverine, les chevilles ouvrières du laboratoire, pour les conseils que m'avez donné et toutes les résolutions de problèmes techniques que vous apportez au quotidien.

Je remercie également l'ensemble des membres permanents d'ERRMECe, dont un grand nombre ont été mes professeurs pendant mon cursus de biochimie, et dont j'ai pu apprécier les connaissances à la fois dans les amphithéâtres, mais aussi à la paillasse. Merci de m'avoir transmis votre passion pour la biochimie et merci également pour toutes les discussions non scientifiques que nous avons eu et vos conseils concernant mon orientation. Je tiens également à adresser un immense merci à deux personnes essentielles dans ce laboratoire : Rémy et Lamia, que serions-nous sans vous ! Merci de gérer avec autant d'efficacité les soucis du quotidien et d'être une telle aide pour les mises au point des manips et l'interprétation des résultats.

Un grand merci à tous les non-permanents, qui sont très nombreux, et j'espère que vous ne m'en voudrez pas trop si je ne cite pas tout le monde individuellement. Il y a d'abord ceux qui m'ont précédé, et qui ont été une aide précieuse pour l'intégration au sein du LPPI en particulier. Je tiens à remercier Vincent, Camille, Adelyne, Micka, Adrien et Arnaud, dont j'ai partagé le bureau pendant ma première année. Ça a été une très bonne expérience, merci pour ces bons moments de détente et la nécessaire décompression quand les manips refusent de fonctionner. La jeune génération a ensuite pris la relève, et merci à Gwen, Charlotte, Adeline et Emilie (sans oublier Amélie ☺), avec qui nous avons passé tant de bons moments. Je tiens à mentionner les épiques parties de pétanque qui ont rythmé nos pauses déjeuner de l'été, et qui étaient

toujours des grands moments de rivalité conviviale. Bonne chance aux petits nouveaux, Katelyn, Diego, et les autres, bon courage pour la suite de votre apprentissage du français !

Je tiens à réserver un paragraphe à Julie, qui a démarré sa thèse en même temps que moi à ERRMECe et sans qui cette thèse aurait été fort ennuyante. Ma chère Tic, merci pour ton soutien pendant 3 années, dès les premiers jours (à la conquête d'ADUM et pour l'installation dans notre petit bureau d'exilées...) et jusqu'à la fin. Merci pour toutes ces fois où tu venais à ma paillasse pour me demander si j'avais besoin d'aide, et ces pipettages que tu as fait pour moi, quand tu voyais que sans ça j'allais finir encore beaucoup plus tard... Merci aussi pour ces soirées passées à terminer des manips, à des heures indues... Ce furent de bons prétextes pour rigoler à gorge déployer dans les labos, pour chanter (faux !) et faire des photos débiles avec du matériel de labo... Je suis très contente de savoir que tu soutiendras très bientôt et j'attends avec impatience la naissance de ta poupette ! Bon courage pour la suite !

Je voudrais aussi adresser des remerciements spéciaux à ceux qui m'ont donné l'opportunité d'enseigner. D'abord merci à Odile, qui la première m'a demandé d'enseigner les techniques de biochimie aux masters ITC. Bien que terrifiée lors de la première séance, j'ai énormément apprécié le contact avec les étudiants et le fait de transmettre mes connaissances... Merci ensuite à Johanne, Charlotte, Cédric, Franck et Halima, qui m'ont confié des heures d'enseignement dans leurs modules. Ça a été une expérience géniale, et m'a donné la confirmation que c'est vers l'enseignement que je veux me diriger. Je voudrais aussi remercier tout particulièrement Myriam, qui a été un soutien formidable pendant toute ma dernière année, pendant les révisions et après avoir passé les écrits. Merci aussi pour la relecture que tu as faite de mon mémoire pour les oraux, et les discussions toujours très intéressantes que nous avons eu.

Ma famille mérite un remerciement tout spécial pour leur soutien sans faille, depuis un bon quart de siècle maintenant mais en particulier pendant ma thèse. Merci Papa et Maman pour votre écoute patiente et attentive quand je vous racontais les manips, celles qui marchaient et celles qui refusaient obstinément de fonctionner, et aussi pour vos conseils et tous ces échanges quand le moral n'était pas au top. Merci aussi à mes frères et sœurs, qui de près ou de loin ont suivi mes aventures et m'ont encouragé jusqu'à la soutenance.

Merci aussi à tous les « autres » frères et sœurs, pour votre soutien sans faille, et en particulier à ceux qui sont venus m'entourer le jour de ma soutenance.

Table des matières

REMERCIEMENTS	3
TABLE DES MATIERES	7
ABREVIATIONS	13
INTRODUCTION GENERALE	15
CHAPITRE 1 : ÉTUDE BIBLIOGRAPHIQUE	19
1. Matrice extracellulaire	19
1.1. Le collagène	20
1.2. La fibronectine	21
1.3. La laminine	21
1.4. Glycosaminoglycanes et protéoglycanes	22
2. Qu'est-ce qu'un gel ?	23
2.1. Gels physiques et gels chimiques	24
2.2. Hydrogels	25
3. Synthèse des hydrogels	26
3.1. Exemples de formation de gels physiques	26
3.2. Exemples de synthèse de gels chimiques	29
3.3. Combinaison des réticulations physique et chimique	35
4. Propriétés requises pour un hydrogel pour la régénération tissulaire	36
4.1. Biocompatibilité	36
4.2. Vascularisation	37
4.3. Dégradation	39
4.4. Propriétés viscoélastiques	41
4.5. Microenvironnement	44
5. Application des hydrogels en ingénierie tissulaire	46
5.1. Matériaux support (« scaffold »)	46
5.2. Rôle de barrière	47
5.3. Libération contrôlée de principes actifs	47
5.4. Encapsulation cellulaire	49

6. Types d'hydrogels	49
6.1. A base de précurseurs synthétiques	50
6.2. A base de précurseurs naturels	53
6.3. Limitations de ces gels	62
7. Hydrogels complexes	63
7.1. Coréseaux de protéines/peptides PEGylées	63
7.2. Réseaux Interpénétrés de Polymères (RIPs)	68
8. Conclusion	77
CHAPITRE 2 : MATERIAUX RIP A BASE DE PVAM	79
1. Comportement lors de cycle de déshydratation/réhydratation	81
2. Dégradation enzymatique des RIP PVA-BSA/Fb	85
2.1. Suivi visuel de la dégradation	85
2.2. Evolution des propriétés viscoélastiques	86
2.3. Suivi du relargage des fragments protéiques	87
3. Variabilité entre lots et stérilisation du PVAm	90
4. Conclusion	91
CHAPITRE 3 : MATERIAUX POE-BSA/FB	93
1. Choix du remplaçant du PVAm	93
2. Synthèse et caractérisation des coréseaux POE-BSA	95
3. Synthèse des RIPs POE-BSA/Fb	97
3.1. Optimisation de la proportion d'amorceur	98
3.1. Influence du temps de polymérisation	100
3.2. Suivi de la formation des matériaux	103
4. Caractérisation des RIPs	105
4.1. Caractérisation de l'architecture RIP	105
4.2. Biodégradabilité	116
5. Biocompatibilité des RIPs POE(x)BSA(y)/Fb	126
5.1. Approche en deux dimensions	127
5.2. Cytotoxicité de l'Irgacure 2959	134
6. Conclusion	137
CHAPITRE 4 : GREFFAGE ET DELIVRANCE DE MOLECULES A ACTIVITE BACTERICIDE	139
1. Colonisation bactérienne et biomatériaux antibactériens	139

1.1. Colonisation bactérienne des surfaces _____	139
1.2. Stratégie pour limiter le développement bactérien _____	140
2. Choix et caractéristiques des composés bactéricides _____	144
2.1. Coefficient d’extinction molaire _____	145
2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices _____	145
3. Synthèse de RIPs POE-BSA/Fb contenant des sels d’ammonium _____	146
3.1. Aspect des RIPs contenant les sels d’ammonium _____	147
3.2. Vérification du greffage du styrène ammonium au coréseau POE-BSA _____	148
4. Caractérisation des matériaux _____	150
4.1. Caractérisation de la morphologie des matériaux _____	150
4.2. Propriétés viscoélastiques des RIPs contenant des sels d’ammonium _____	152
4.3. Suivi de la dégradation des RIPs contenant les sels d’ammonium _____	155
5. Activité bactéricide de ces RIPs _____	159
5.1. Etude de la diffusion des sels d’ammonium _____	159
5.2. Dénombrement des bactéries en contact avec le matériau _____	162
6. Conclusion _____	165
CHAPITRE 5 : MATERIAUX A BASE DE PLASMA _____	167
1. Etude bibliographique _____	167
1.1. Intérêt de l’utilisation directe du sang _____	167
1.2. Biomatériaux dérivés du sang _____	168
1.3. Utilisation clinique des biomatériaux à base de sang _____	172
1.4. Risques et limites des biomatériaux à base de sang. _____	173
2. Gel de plasma _____	174
2.1. Condition de gélification du fibrinogène du plasma _____	174
2.2. Structure du réseau de fibrine _____	175
3. Matériaux RIPs à base de POE et de plasma total _____	176
3.1. Synthèse de RIPs à base de POE dans le plasma _____	176
3.2. Caractérisation des RIPs POE-BSA/Plasma _____	178
3.3. Biocompatibilité _____	185
4. Conclusion _____	196
CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES _____	199
REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES _____	203

ANNEXES	225
ANNEXE A : RESULTATS COMPLEMENTAIRES AU CHAPITRE 5	227
1. Synthèse de RIP à base de protéines humaines	227
1.1. Vérification de la synthèse	227
1.2. Propriétés viscoélastiques	229
1.3. Biodégradabilité des RIP PVA-HSA/Fb	230
2. Concentration du plasma par centrifugation	231
3. Matériaux RIP à base de PVA et de plasma total	232
3.1. Synthèse des RIPs PVA/plasma	232
3.2. Vérification de l'architecture RIP	233
3.3. Caractérisation rhéologique.	234
3.4. Biodégradabilité	235
ANNEXE B : PARTIE EXPERIMENTALE	237
1. Réactifs chimiques, solvants, enzymes et protéines utilisés	237
2. Modification des polymères	240
2.1. Fonctionnalisation du PVA	240
2.2. Modification de l'albumine de sérum bovin ou humaine (BSA ou HSA)	241
3. Synthèse des matériaux	242
3.1. Gel de fibrine	242
3.2. Matériaux à base de PVAm	242
3.3. Matériaux à base de PEGDM	243
3.4. Matériaux à base de plasma	245
4. Méthodes de caractérisation:	246
4.1. Quantification et analyse des fractions solubles :	246
4.2. Dégradation chimique du réseau de fibrine	248
4.3. Cycles séchage/hydratation :	249
5. Analyses mécaniques	250
5.1. Analyse dynamique thermomécanique (DMA)	250
5.2. Caractérisation rhéologique	250
6. Dégradation enzymatique des matériaux	251
6.1. Suivi du relargage des fragments protéiques	251
6.2. Evolution des modules viscoélastiques	251
7. Biocompatibilité	251

7.1. Culture cellulaire	251
7.2. Cytotoxicité de l'amorceur	254
8. Activité bactéricide	255
8.1. Souches bactériennes	255
8.2. Mesure de l'effet inhibiteur des traitements en culture planctonique	255
8.3. Mesure de l'effet bactéricide des traitements en culture planctonique	255
8.4. Mesure de la diffusion de molécules vers un milieu gélosé	256
8.5. Dénombrement des bactéries viables en contact avec le matériau	256
8.6. Evaluation de l'impact des fragments de dégradation des RIPs sur la viabilité bactérienne	257
9. Analyses statistiques	257
LISTE DES FIGURES ET DES TABLEAUX	259
1. Liste des figures	259
2. Liste des Tableaux	263
Résumé	265
Abstract	265

Abréviations

APS	peroxydisulfate d'ammonium
AH	acide hyaluronique
BSA	Albumine de Sérum Bovin
CTSA	Centre de Transfusion Sanguine des Armées
EDC	1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl)carbodiimide
FB-BJ	Fibroblastes BJ, de derme de prépuce de nouveau-né
FDA	Food and Drug Administration
FGF	Fibroblast Growth Factor
FITC	Fluorescéine IsoThioCyanate
Fg	fibrinogène
Fb	fibrine
GlcNAc	N-acétyl D-glucosamine
I ₂₉₅₉	Irgacure 2959
IGF	Insulin-like growth factor
MEC	matrice extracellulaire
MEB	microscopie électronique à balayage
MMP	métalloprotéase
NVP	N-vinylpyrrolidone
PBS	Phosphate Buffer Sodium
PEG	poly(éthylène) glycol
PDGF	Platelet Derived Growth Factor
PHMB	Polyhexaméthylène
PLA	poly acide lactique
POE	Poly(oxyde d'éthylène)
PVA	alcool polyvinylique
RGD	Arg-Gly-Asp
RIP	Réseaux Interpénétrés de Polymères
SVF	Sérum de Veau Foetal
TEMED	N,N,N', N'-tétraméthylènediamine
TG	transglutaminase
TGF- β	Transforming Growth Factor beta
TL	Thermolysine
UV	Ultraviolets
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

Introduction générale

Un certain nombre d'accidents et de pathologies conduisent à la perte de tissus et/ou au dysfonctionnement d'organes. Depuis les années 1960, grâce à l'utilisation de traitements immunosuppresseurs, la transplantation d'organe est devenue le traitement de choix ¹. Toutefois, la liste d'attente pour ces transplantations n'a cessé de s'allonger au cours des dernières années. Aux États-Unis, 120 450 malades sont en attente d'une greffe (chiffre juin 2016). En France, au 1^{er} janvier 2015, ce chiffre s'élevait à 13 750 malades ² et on estime que plus de 550 patients décèderont faute d'avoir bénéficié à temps d'une transplantation. Ce chiffre augmente chaque année pour atteindre 50% depuis 2007. Ainsi, le temps moyen d'attente pour bénéficier d'une greffe est supérieur à 3 ans. La situation est bien plus grave encore dans les pays sous-développés, en raison du manque de services de chirurgie et de l'inexistence des infrastructures permettant faire le lien entre les patients et les donneurs compatibles.

Afin de répondre à cette demande en organe toujours croissante, l'ingénierie tissulaire s'est développée depuis quelques décennies. Elle vise à régénérer des organes et des tissus endommagés et qui ne remplissent plus leur fonction dans le corps. L'ingénierie tissulaire a été définie par Langer *et al* comme « *l'application des principes et des méthodes de l'ingénierie et des sciences de la vie pour une compréhension fondamentale des relations entre la structure et la fonction des tissus de mammifères normaux et pathologiques, et le développement de substituts biologiques qui restaurent, maintiennent ou améliorent la fonction d'un tissu* » ³. Les matériaux issus de l'ingénierie tissulaire ont donc pour but de servir de support tridimensionnel stable, de libérer des agents thérapeutiques et de favoriser la réparation tissulaire en agissant sur la prolifération cellulaire, la différenciation et la production d'une matrice extracellulaire mature, pour aller jusqu'à sa bio-intégration.

Il est crucial de disposer de matériaux mimant au mieux la matrice extracellulaire qu'ils remplacent afin de permettre la reconstruction de tissus sains. Les matériaux les plus fréquemment utilisés sont, soit des solides poreux (mousses, éponges, ...), soit des matériaux gélifiés. Parmi ces derniers, les hydrogels ont été particulièrement étudiés en raison de leur ressemblance avec la plupart des matériaux mous. En effet, gonflés d'eau, leur consistance est semblable à celle de l'environnement cellulaire tridimensionnel des tissus mous et ils permettent également la diffusion des nutriments et des déchets cellulaires. Des hydrogels ont donc été utilisés pour réparer ou favoriser la régénération de cartilage, de la peau et de vaisseaux sanguins. Il existe principalement deux types d'hydrogels, distingués par leur origine. Les hydrogels synthétiques sont

formés à partir de polymères synthétiques tels que le poly(éthylène glycol), tandis que les hydrogels naturels sont composés de polymères naturels, tels que les protéines ou les polysaccharides.

Les hydrogels naturels, particulièrement synthétisés à partir de collagène et de fibrine, ont été largement utilisés car ils sont biodégradables et ils favorisent l'adhérence cellulaire. La fibrine est connue pour contrôler le saignement et favoriser la réparation des tissus endommagés. Ainsi, les gels de fibrine à concentration physiologique (environ 5 mg.mL^{-1}) possèdent les propriétés biologiques les plus favorables à la régénération tissulaire. Néanmoins, ils ne sont pas manipulables en raison de leur très faible résistance mécanique (entre 30 et 80 Pa). Pour pallier à cela, ils sont utilisés à des concentrations plus importantes, ou en combinaison avec d'autres polymères d'origine naturelle ou synthétique.

Les travaux qui seront présentés dans ce manuscrit s'inscrivent dans la continuité d'un travail initié il y a environ dix ans, entre deux laboratoires de l'université de Cergy-Pontoise : le laboratoire ERRMECe et le LPPI. Ce rapprochement a permis la mise en commun des connaissances et des savoir-faire, d'une part dans le domaine de la matrice extracellulaire et des interactions entre les cellules et leur environnement immédiat, qu'il soit naturel ou synthétique, et, d'autre part, la caractérisation des matériaux polymères, en particulier sous forme de réseaux interpénétrés de polymères (RIP). Dans ce cadre, Edefia Akpalo avait démontré qu'il est possible d'associer un gel de fibrine à concentration physiologique avec un réseau de polyoxyde d'éthylène (POE) ⁴. Ensuite, Laurent Bidault a remplacé le POE par le PVA, afin d'améliorer la réversibilité à l'hydratation des matériaux. Il avait également été démontré que l'incorporation d'albumine dans le réseau PVA permet de le rendre dégradé par protéolyse enzymatique ⁵.

A la suite de ces travaux, l'objectif de ma thèse est de mettre au point la synthèse d'une nouvelle génération d'hydrogels à architecture RIP associant toujours un gel de fibrine et un réseau de polymère synthétique disponible commercialement. Ce matériau doit être biodégradable de façon contrôlée, être biocompatible et favoriser la réparation tissulaire.

Les hydrogels développés ont été étudiés dans le cadre du contrat ANR FibrDerm, qui a commencé en 2014. Les partenaires de ce projet sont les deux laboratoires de l'université de Cergy-Pontoise précédemment cités, le laboratoire BioMécanique et BioIngénierie (UMR CNRS 7338) de l'Université de Technologie de Compiègne, le Centre de Transfusion Sanguine des Armées de l'hôpital Percy et la société Celogos. Le but de cette ANR est de mettre au point pour le traitement des grands brûlés un équivalent de peau humaine, constitué d'un équivalent de derme humain (RIP à base de fibrine) cellularisé, et recouvert d'un épithélium stratifié. Au sein de ce projet, les laboratoires ERRMECe et LPPI ont pris en charge la synthèse des RIP biodégradables à base de fibrine, l'optimisation de leur réticulation et l'étude de leur cinétique de dégradation, mais aussi les premiers essais de biocompatibilité (culture cellulaire en surface de RIP). Tous ces points seront abordés dans ce manuscrit, ainsi que des caractérisations supplémentaires.

Ce manuscrit s'articule en 5 chapitres. Le premier est une revue bibliographique qui présente d'abord la matrice extracellulaire, puisque ses propriétés doivent être reproduites. Les hydrogels utilisés en ingénierie tissulaire sont ensuite décrits, ainsi que leurs modes de synthèse, les polymères synthétiques ou naturels qui les composent, leurs caractéristiques physico-chimiques et leur réponse *in vivo*. Ensuite, les RIP actuellement développés et utilisés pour l'ingénierie tissulaire sont présentés.

Le chapitre 2 décrit mes premières études qui ont permis de compléter les travaux de Laurent Bidault sur les RIP à base de PVA sur lesquels une étude plus approfondie de leur dégradation enzymatique a été mise au point.

Le chapitre 3, cœur de mon travail de thèse, présente les nouveaux RIP à base de POE, d'albumine et d'un gel de fibrine. Les caractéristiques physico-chimiques et biochimiques de ces matériaux, ainsi que leur dégradabilité contrôlée sont exposées. Ce chapitre s'achève avec l'étude de la biocompatibilité de ces nouveaux RIP en présence de fibroblastes. Nous avons ensuite incorporé des sels d'ammonium quaternaire dans ces RIP afin de modifier leurs propriétés mécaniques et limiter la colonisation bactérienne.

Enfin, le chapitre 5 expose l'adaptation des protocoles de synthèse des matériaux pour l'utilisation d'une source alternative de fibrinogène, le plasma sanguin. Celui-ci étant riche en protéines et en facteurs de croissance, les matériaux ainsi synthétisés devront améliorer la réparation tissulaire.

Les méthodes expérimentales mises en œuvre au cours de cette thèse, ainsi que le matériel utilisé ont été rapportés en Annexe.

Chapitre 1 : Étude Bibliographique

L'ingénierie tissulaire vise à régénérer des organes et des tissus ne remplissant plus correctement leur fonction. Elle repose sur l'association d'un matériau servant de support et de cellules. Les hydrogels en raison de leurs propriétés similaires à celles des tissus mous naturels sont parmi les supports les plus utilisés dans différents domaines de la médecine régénérative, pour réparer des tissus endommagés³. Quelle que soit l'application visée, une fois au contact d'un tissu ou d'un organe, les hydrogels doivent posséder des propriétés semblables à celle de la matrice extracellulaire.

1. Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) est un microenvironnement tissulaire dynamique, complexe et tridimensionnel qui entoure les cellules et leur fournit un support physique au sein duquel elles peuvent adhérer, et communiquer par le biais de messagers biochimiques^{6,7}. Elle régule également de nombreux aspects du comportement cellulaire, notamment la prolifération et la croissance, la survie, les changements de morphologie cellulaire, la migration et la différenciation. Certaines MEC sont spécialisées pour une fonction donnée (la filtration, au niveau du glomérule rénal par exemple), d'autres peuvent être calcifiées pour présenter une plus grande résistance mécanique (dents, os).

Les composants de la MEC sont synthétisés, sécrétés et remodelés par les cellules⁸. Toutes les cellules sont capables de sécréter et de dégrader leur MEC, mais certains types cellulaires sont particulièrement actifs dans la production de MEC interstitielle (la MEC située entre les tissus) : c'est le cas par exemple des fibroblastes et des cellules de muscle lisse. La structure et la composition de la MEC varie en fonction du tissu étudié, mais ses principaux constituants sont globalement conservés : ce sont le collagène, l'élastine, les glycoprotéines, les protéoglycanes et les facteurs de croissance, tous arrangés en une ultrastructure tridimensionnelle spécifique du tissu étudié (Figure 1)⁹.

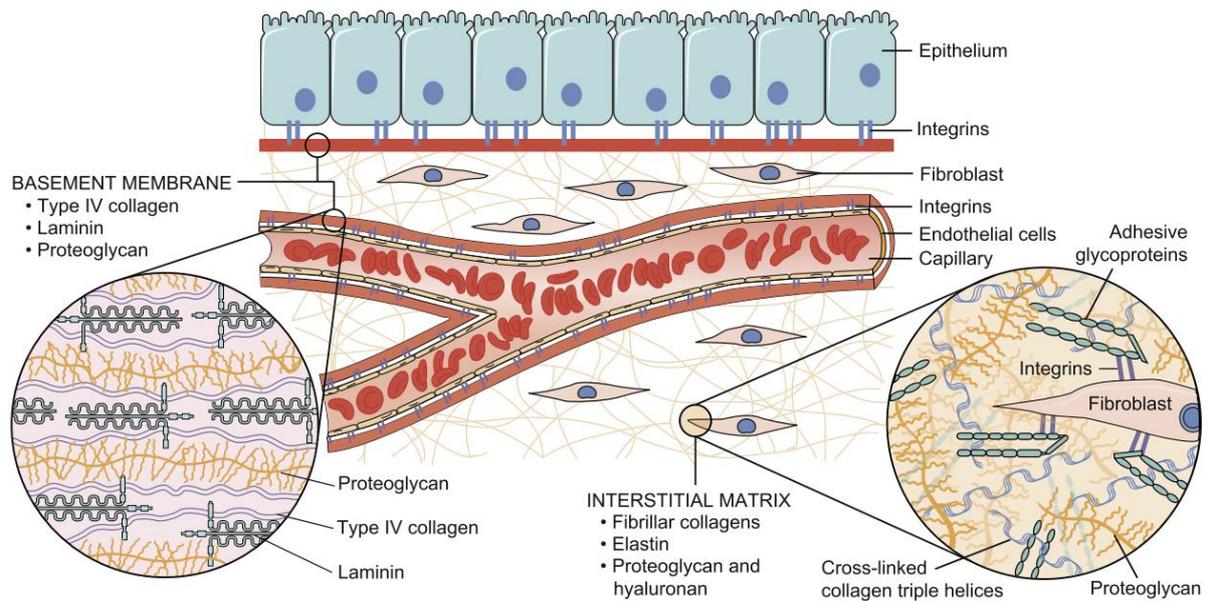


Figure 1 : représentation schématique des principaux composants de la matrice extracellulaire ¹⁰.

Il existe deux catégories principales de MEC : la lame basale (ou membrane basale) et le tissu conjonctif. La lame basale est caractérisée par son épaisseur, comprise entre 30 et 100 nm. Elle est située sous les épithéliums et les endothéliums et crée une barrière sélective pour les macromolécules entre deux types de tissus. Elle est riche en collagène de type IV, en laminine et en perlécan. Le tissu conjonctif est un tissu de soutien situé entre d'autres tissus et composé de cellules incluses dans une quantité relativement importante de MEC. Il est riche en collagènes fibrillaires, en protéoglycane et en glycosaminoglycane ¹¹. Les principaux composants de la MEC sont maintenant brièvement présentés.

1.1. Le collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante dans la MEC des mammifères et représente plus de 90% de son poids sec. Plus de 25 types de collagène différents ont été identifiés, chacun possédant une fonction biologique unique. Le collagène de type I est la protéine structurale la plus abondante dans les tissus. Très présent dans les tendons et les ligaments, il leur fournit la force mécanique. D'autres types de collagène sont présents dans la MEC d'autres tissus mais souvent en quantité plus faible. Le collagène de type IV a une affinité importante pour les cellules endothéliales et il est présent dans la lame basale des structures vasculaires ¹². Le collagène étant largement utilisé en ingénierie tissulaire, sa structure, les mécanismes de gélification et ses particularités structurales seront décrits plus en détail dans la section 6.2.2.1.

1.2. La fibronectine

Seconde protéine la plus abondante dans la MEC, la fibronectine est aussi présente sous forme circulante dans le sang. La fibronectine est retrouvée dans les membranes basales et dans les tissus conjonctifs et forme un dimère d'environ 440 kDa. Elle est riche en ligands qui favorisent l'adhérence cellulaire, en particulier le motif Arg-Gly-Asp (RGD), qui permet l'interaction avec les cellules grâce à l'intégrine $\alpha 5 \beta 1$ (Figure 2). Elle peut former un réseau à la surface des cellules, grâce aux forces générées par le cytosquelette et transmises par les intégrines.

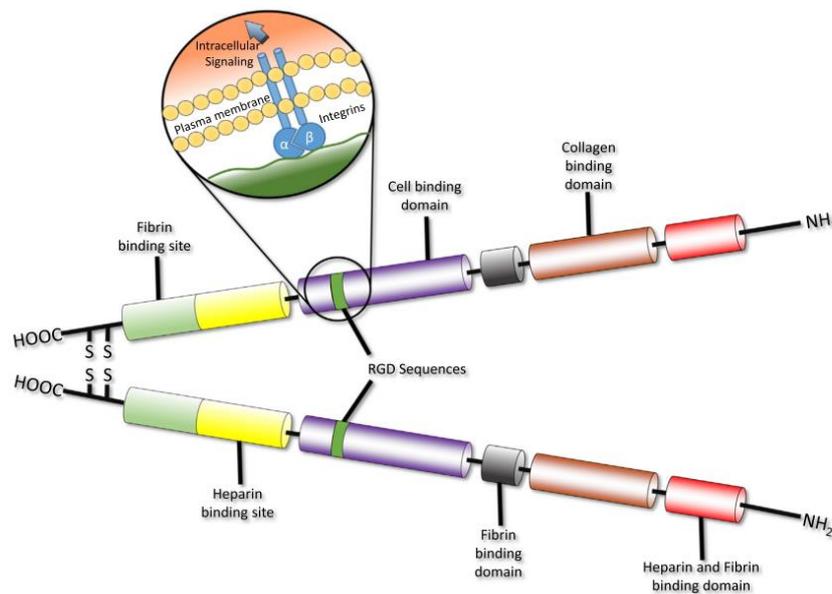


Figure 2 : représentation schématique de la structure de la fibronectine. Protéine formant un dimère, joints par deux ponts disulfure à l'extrémité C terminale .

1.3. La laminine

La laminine est une autre protéine d'adhérence retrouvée dans la MEC, et plus particulièrement dans les membranes basales. Ce polypeptide possède 3 chaînes peptidiques, α , β et γ , formant une structure en forme de croix (Figure 3). Les isoformes variées de chaque chaîne peuvent s'associer pour former différentes formes de laminine. La laminine peut s'assembler sous forme de réseaux en présence de Ca^{2+} 11.

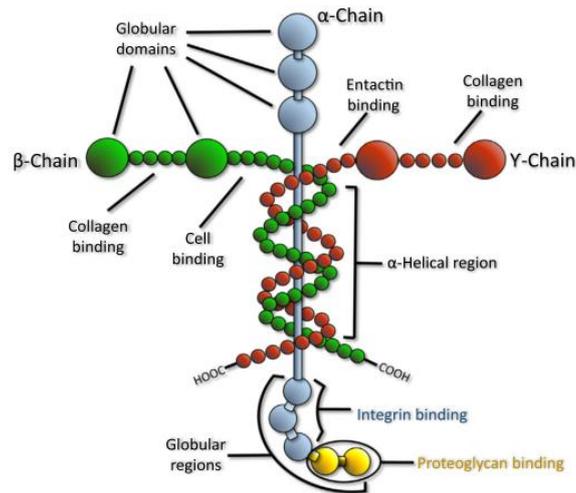


Figure 3 : représentation schématique de la laminine ¹².

1.4. Glycosaminoglycanes et protéoglycanes

Les glycosaminoglycanes (GAG) sont de longs polysaccharides linéaires composés d'unités de répétitions disaccharidiques. Ils possèdent plusieurs fonctions biologiques, notamment la capacité à lier les facteurs de croissance et les cytokines ainsi que les molécules d'eau. Parmi les GAG présents dans la MEC on retrouve l'héparine, l'héparane sulfate, le chondroïtine sulfate et l'acide hyaluronique. Ce dernier sera présenté dans la section 6.2.1.1 pour ses applications en ingénierie tissulaire. Lorsque les GAG sont liés à des protéines, ils forment une molécule appelée protéoglycane (Figure 4).

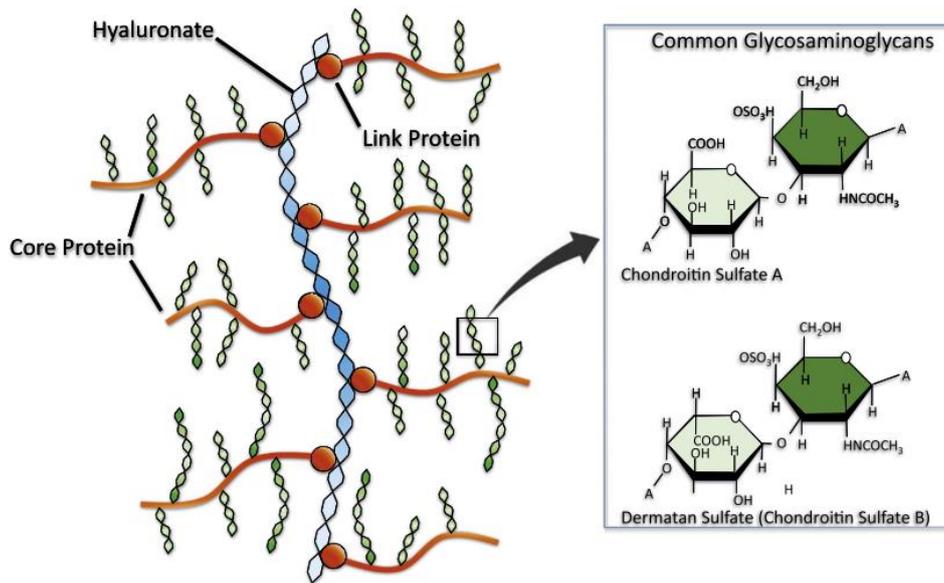


Figure 4 : structure schématique des protéoglycanes ¹².

Il existe plus de 30 protéoglycanes exprimés chez les mammifères. Leur capacité de liaison aux autres composés joue un rôle important dans la cohésion de la MEC. En raison de leur caractère fortement hydraté, ils augmentent la capacité des tissus à résister aux forces de compression ⁷. Les protéoglycanes peuvent également être des protéines de membrane et modulent alors la croissance et la différenciation cellulaires ⁸.

La MEC constitue donc un environnement idéal pour la communication intercellulaire, la croissance cellulaire, et le remodelage tissulaire. Elle permet l'adhérence cellulaire *via* des domaines spécifiques (notamment le motif RGD ¹³), avec lesquels interagissent les récepteurs situés en surface des cellules (intégrines, sélectines, syndécan). Les macromolécules formant la MEC sont enchevêtrées et une grande quantité d'eau est retenue dans ce réseau. La MEC constitue donc un gel dynamique, qui peut être remodelé par les nombreuses enzymes sécrétées par les cellules (métalloprotéases, plasmine, élastase). Elle sert également de réservoir de facteurs de croissance, afin d'influencer le comportement cellulaire ¹⁴.

Les buts de l'ingénierie tissulaire, comme cela a été précisé dans l'introduction, sont de restaurer, de préserver ou d'améliorer la fonction des tissus, mais aussi de remplacer des organes et des tissus endommagés à la suite d'accidents ou de pathologies ¹⁵. Les biomatériaux utilisés pour atteindre ces objectifs doivent donc servir de matrice tridimensionnelle, assurant le soutien mécanique, facilitant la réparation tissulaire, et si possible délivrant des agents thérapeutiques. Afin de reproduire au mieux la structure et les fonctions de la matrice extracellulaire, de nombreux hydrogels ont été mis au point, en particulier depuis une cinquantaine d'années. Nous présenterons ci-dessous l'état gélifié et les hydrogels.

2. Qu'est-ce qu'un gel ?

Un gel est constitué d'au moins deux composants : un réseau tridimensionnel des macromolécules de polymères, et un solvant, la phase liquide, qui représente la plus grande partie du volume ¹⁶⁻¹⁸. Les travaux Almdal *et al* ¹⁷ ont permis de fixer 3 caractéristiques de l'état de gel :

- Un gel consiste en un système homogène, cohérent avec deux constituants : une phase solide contenant une phase liquide dont elle empêche l'écoulement.
- Chacune des deux phases occupe la totalité du volume du gel.
- Le gel se comporte comme un solide viscoélastique.

Les propriétés élastiques et fluidiques des gels font d'eux de bons candidats pour des applications dans des domaines aussi divers que les produits pharmaceutiques, la biotechnologie, l'agriculture, la transformation des aliments et l'électronique ¹⁹.

La formation du gel résulte de l'agrégation des particules solides en solution ou en dispersion dans un liquide. Ainsi, lors de la transition sol-gel, la solution (sol), formée d'amas finis, devient un gel lorsque ces amas s'associent pour former un amas infini.

Ce réseau s'étend dans toutes les directions et retient la phase liquide. Il ne représente que quelques pourcents du volume total mais joue un rôle essentiel d'armature et permet de grandes déformations.

2.1. Gels physiques et gels chimiques

Les gels sont formés de réseaux de polymère liés soit physiquement (liaisons faibles), soit chimiquement (liaisons covalentes). Cela permet de distinguer les gels physiques, d'une part, et les gels chimiques, d'autre part (Figure 5).

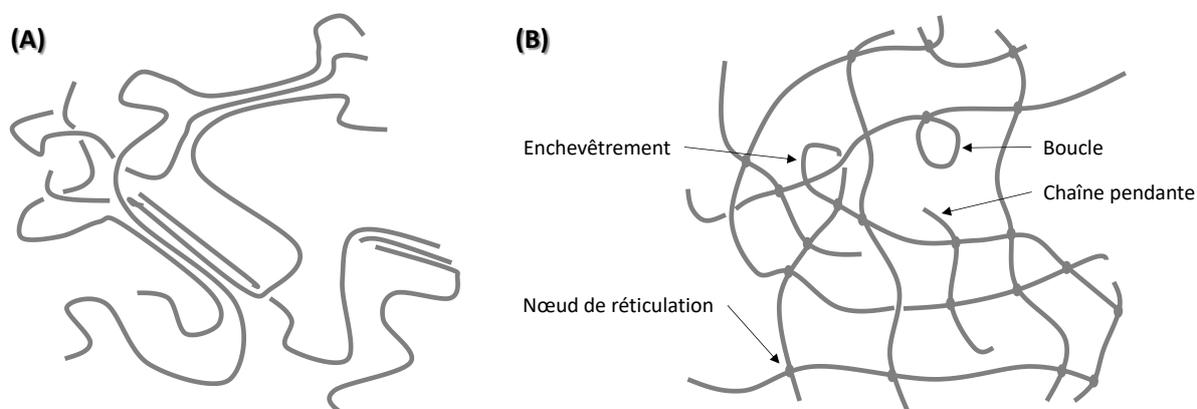


Figure 5 : structure générale d'un réseau de polymère dans un (A) gel physique avec des zones cristallines ; (B) gel chimique de polymère, avec des liaisons covalentes ¹⁹.

Dans les gels physiques, les interactions ou liaisons entre les macromolécules correspondent à des interactions de Van der Waals, des interactions ioniques, ou des liaisons hydrogène, dont l'énergie est d'environ 2 kcal.mol^{-1} . Ces interactions conduisent le plus souvent à la formation de zones cristallines. La transition sol-gel est généralement réversible en fonction des conditions de température, de pH et de force ionique.

Dans les gels chimiques, les réseaux tridimensionnels sont formés par une réaction chimique au cours de laquelle des liaisons covalentes s'établissent entre les macromolécules. En raison de ces liaisons de haute énergie les gels ne sont ni thermoréversibles (retour à l'état liquide par chauffage impossible) ni solvoréversibles (dissolution dans le solvant impossible). La destruction du gel ne peut alors être obtenue qu'en dégradant des liaisons covalentes.

Ces gels physiques et chimiques peuvent être classés de manière plus fine en fonction de la provenance des macromolécules (naturelle ou synthétique), du solvant dont est gonflé le réseau de polymère (organogel ou hydrogel).

2.2. Hydrogels

Un hydrogel est défini comme un réseau tridimensionnel de macromolécules, naturelles ou synthétiques, qui absorbe d'importantes quantités d'eau, de solutions aqueuses ou de fluides biologiques (de 10-20% jusqu'à plusieurs milliers de fois sa masse sèche). Les hydrogels sont utilisés depuis des siècles dans des domaines comme l'alimentation, l'art et la médecine, mais le terme « hydrogel » apparaît pour la première fois dans la littérature en 1894²⁰ et désigne alors un gel colloïdal de sels inorganiques²⁰. Dans les années 1960, Wichterle et Lim mettent au point des matériaux polymères pour des applications biomédicales. Un premier hydrogel à base de polyméthacrylate de 2-hydroxyéthyle est développé comme lentilles de contact²¹. Depuis, l'utilisation des hydrogels comme dispositifs médicaux a connu une véritable explosion, notamment au cours de ces 20 dernières années. La médecine régénérative s'est, en effet, développée pour pallier les besoins en organes et en tissus en fabriquant des tissus de remplacement pour le corps humain.

Les hydrogels peuvent être classés en fonction de leurs propriétés physiques, de leur mode de synthèse (qui sera discuté dans la partie suivante), de leur réticulation, de leur dégradabilité, de leur source et de leur charge ionique (Figure 6)²². Toutefois, la description de tous ces paramètres dépasse le cadre de ce chapitre ; par conséquent, seuls les points pertinents par rapport aux travaux seront présentés par la suite.

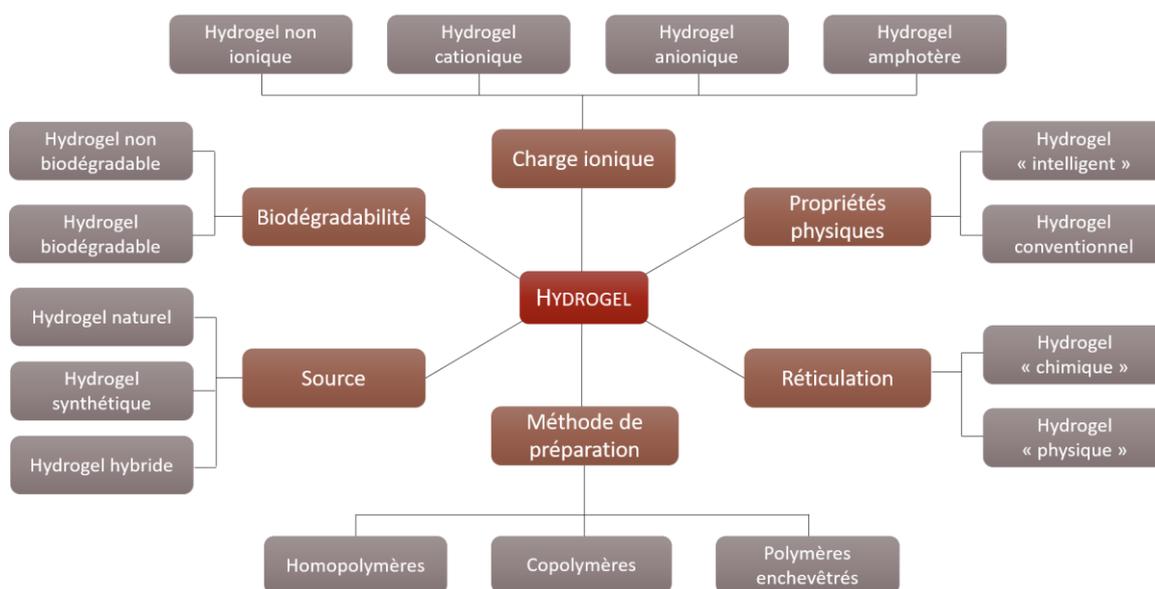


Figure 6 : classification des hydrogels d'après leurs différentes catégories de propriétés (adapté de Patel et Mequanint²²).

3. Synthèse des hydrogels

Selon qu'ils sont physiques ou chimiques, les hydrogels font appel à des liaisons intramoléculaires différentes, donc à des groupements chimiques différents. Quelques exemples, non exhaustifs, sont donnés dans les paragraphes suivants, selon que l'on forme des hydrogels physiques, chimiques, voire les deux combinés.

3.1. Exemples de formation de gels physiques

Des gels naturels sont utilisés depuis la Haute Antiquité pour l'alimentation et certaines productions artisanales comme les colles. Ainsi, les gels d'Aloé Vera sont employés depuis des siècles pour soigner les problèmes cutanés comme les brûlures, les escarres, les dermatoses ou les coupures. Ces biogels sont, pour la plupart, des hydrogels physiques. Constitués de molécules biologiques complexes, leur synthèse a longtemps été effectuée de façon empirique en faisant varier la concentration, la température, le pH. La formation d'hydrogels physiques peut être réalisée au moyen d'interactions physico-chimiques variées : interactions hydrophobes, ioniques, liaisons hydrogène et électrostatiques ²³.

La gélification de nombreux polymères biologiques est induite par la formation réversible de liaisons hydrogène intermoléculaires, en dessous d'une température donnée (Upper Critical Solution Temperature). Ce processus thermoréversible est bien connu pour la gélatine, et un certain nombre de polysaccharides (agarose, amylose, amylopectine, carraghénane) ²⁴. La nucléation et la croissance des agrégats d'hélices sont mues par la formation d'hélices doubles (polysaccharides) ou triples (gélatine).

S'inspirant de ces mécanismes de gélification observés dans la nature, certaines équipes ont développé des systèmes hybrides associant des peptides capables d'adopter une conformation hélicoïdale avec des polymères synthétiques. La gélification intervient quand le repliement des protéines en hélices aboutit à l'organisation d'une combinaison de plusieurs hélices combinées ensemble pour former une superhélice ²⁵ (Figure 7).

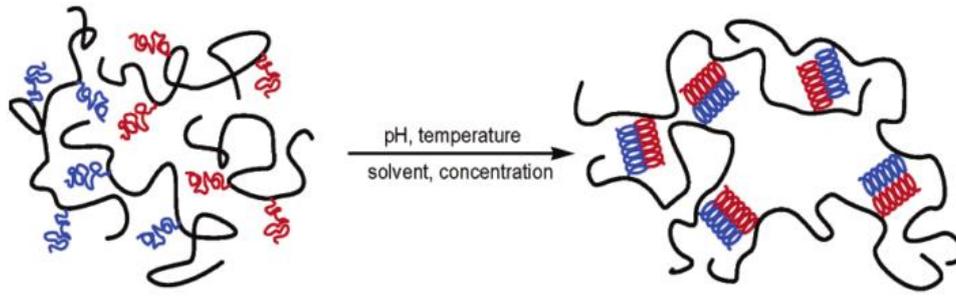


Figure 7 : représentation schématique de la formation d'un hydrogel via la formation de superhélices hétérodimères antiparallèles ²⁶.

Par exemple, une série d'hydrogels contenant des motifs protéiques de type superhélice a été mise au point en greffant, ou non, des segments peptidiques de charges opposées, sur le polyméthacrylamide de N-(2-hydroxypropyl)²⁶. La longueur et le nombre de motifs susceptibles de s'assembler en superhélice influencent la cinétique de gélification, dont les durées varient de quelques minutes à plusieurs jours et cela, même en solutions très diluées (0,1% en tampon PBS). Des polypeptides à bloc ont également été synthétisés pour préparer des hydrogels selon la même méthode ²⁷. Dans ce cas, la gélification dépend de la nature amphiphile des polypeptides, mais aussi de la conformation de la chaîne (hélice α , feuillet β ou random coil). La stabilité thermique et l'auto assemblage de tels hydrogels sont liés aux interactions hydrophobes et électrostatiques. Celles-ci peuvent être contrôlées par modification des séquences en acides aminés et de la longueur des segments superhélice.

Certains polymères dits à « LCST » (pour Lower Critical Solution Temperature) subissent un changement abrupt de solubilité lors d'une augmentation de la température. La séparation de phase alors observée dépend des fractions molaires d'unités hydrophiles et hydrophobes dans les macromolécules. À la température de transition, les liaisons hydrogène entre le polymère et l'eau sont défavorisées par rapport aux interactions polymère-polymère et eau-eau. La macromolécule solvatée se déshydrate et change de structure pour devenir plus hydrophobe ²⁸. Certains dérivés de la cellulose (méthylcellulose, hydroxypropylcellulose, et carboxyméthylcellulose) ont un comportement à LCST ²⁴. Les hydrogels thermosensibles les plus utilisés sont à base de poloxamères (Pluronic® - copolymère tribloc poly(éthylène glycol)-poly(oxyde de propylène)-poly(éthylène glycol) (PEG-PPO-PEG)) ou de poly(N-isopropylacrylamide PNIPAM) (Figure 8). Leur non-biodégradabilité, et leur cytotoxicité potentielle limitent cependant l'utilisation de ces matériaux en ingénierie tissulaire.

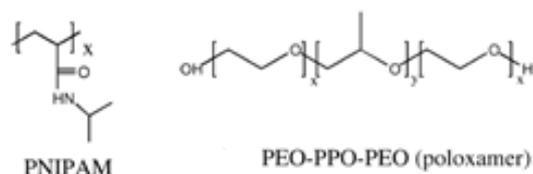


Figure 8 : exemples de polymères thermosensibles dont la gélification intervient pour une température supérieure à la température physiologique.

Des alternatives ont donc été développées, telles que des copolymères à bloc ou greffés contenant des blocs hydrophiles de type PEG et des blocs hydrophobes de type PLA. Ces formulations sont moins cytotoxiques²⁹.

Les interactions entre les charges ont été largement étudiées pour la synthèse d'hydrogels *in situ*. Les matériaux synthétisés par cette approche sont réversibles puisque les espèces ioniques des fluides extracellulaires se lient aux composants du gel de manière compétitive, ce qui aboutit à la dissociation du réseau. Par exemple, l'interaction de cations divalents (Ca^{2+}) avec les groupements anioniques -COO^- de l'alginate permet sa gélification. Ces mêmes groupes carboxylates peuvent interagir avec les groupes amine du chitosane¹⁵.

Des hydrogels peuvent être formés par stéréocomplexation de polymères. Ainsi, des énantiomères de polylactides (D-PLA et L-PLA) peuvent former un stéréocomplexe qui provoque la formation de zones cristallines. La gélification intervient lors du mélange de macromolécules de Dextran sur lesquelles sont greffés soit des blocs PLLA, soit des blocs PDLA (Figure 9)³⁰. Ces copolymères à blocs de PEG-PLA multibras permettent d'obtenir des hydrogels de modules élevés en un temps très court ($2 \cdot 10^3$ Pa en moins de 4 min)³¹.

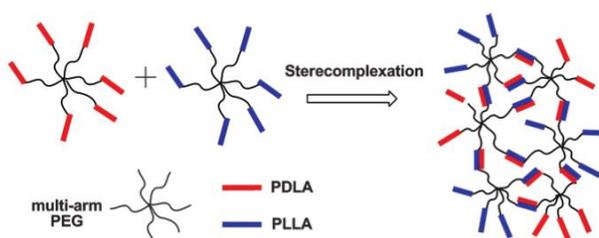


Figure 9 : hydrogels formés par stéréocomplexation de copolymères à blocs en étoile PEG et PLA.

3.2. Exemples de synthèse de gels chimiques

Les liaisons covalentes entre les macromolécules dans les gels chimiques peuvent être créées par différentes voies de synthèse dont quelques-unes sont décrites ci-dessous.

3.2.1. Réaction chimique des groupements fonctionnels

Des hydrogels peuvent être préparés par des réactions entre des groupements fonctionnels présents dans des macromolécules solubles dans l'eau. Les réactions les plus courantes sont les formations de bases de Schiff, les additions de Michael, la formation de liaisons peptidiques ou encore la « chimie-click ».

Ainsi, la synthèse d'hydrogels de protéines est fréquemment réalisée en faisant réagir un aldéhyde sur les fonctions amine pour former une base de Schiff ³² (Figure 10). Bien que d'autres composés contenant des fonctions aldéhyde puissent être employés ³³, le glutaraldéhyde est largement utilisé comme réticulant, malgré sa toxicité même à de faibles concentrations. Avant d'être mis en contact avec des cellules, les matériaux préparés avec ce composé doivent être rincés ou incubés en présence de glycine afin de retirer ou de neutraliser tout le glutaraldéhyde qui n'aurait pas réagi.

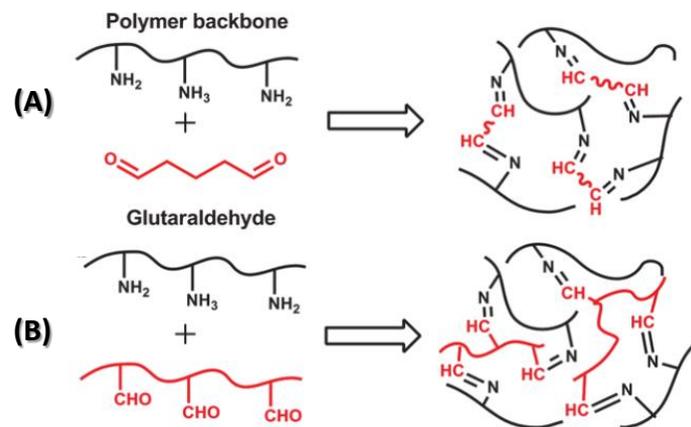


Figure 10 : Macromolécules contenant des fonctions aldéhyde/amine pour préparer des hydrogels par formation de bases de Schiff. (A) Glutaraldéhyde ; (B) composé contenant des aldéhydes.

L'addition de Michael entre un groupement nucléophile (amine ou thiol) et un groupement électrophile (acrylate, vinyle ou maléimide) est une réaction chimique largement utilisée pour la synthèse d'hydrogels, notamment injectables, pour l'ingénierie tissulaire (Figure 11). Le mélange des deux polymères portant les groupements nécessaires à la réaction suffit, en effet, à former l'hydrogel. Les temps de gel sont compris entre 0,5 et 60 minutes.

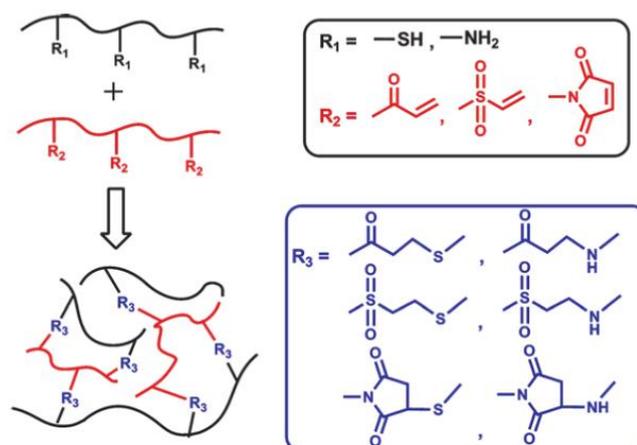


Figure 11 : schéma de synthèse d'hydrogels par addition de type Michael ³⁴.

De nombreux polymères, tels que l'acide hyaluronique, le dextran, le PVA ou le PEG, ont été modifiés pour préparer des hydrogels selon cette voie. Pour cela, des peptides fonctionnels, comportant des groupements thiol sont greffés sur les macromolécules. Les additions de Michael se déroulent dans des conditions douces qui affectent peu la viabilité des cellules lors de la formation des hydrogels. Elles peuvent donc y être encapsulées et demeurent viables pendant plusieurs mois. Cependant, une concentration trop élevée de fonctions thiol peut causer la mort cellulaire³⁵. La résistance mécanique de ces matériaux, bien qu'elle puisse être modulée en ajustant la réactivité et la densité des groupements fonctionnels, est toutefois modérée ^{36,37}.

Des hydrogels peuvent être formés par liaison chimique de peptides ou par modification sélective de segments peptidiques non protégés. Mentionnons, à titre d'exemple, les fonctions aldéhyde terminales d'un PEG qui peuvent réagir avec le NH_2 terminal d'un résidu cystéine pour former des cycles thiazolidine (Figure 12a) ³⁸. Cette réaction se déroule dans des conditions de température douces (25°C pendant 2 à 4h) mais en présence de solvants organiques (CH_2Cl_2 , MeOH) et la gélification intervient en quelques minutes. Néanmoins, ces gels ne demeurent intacts que pendant environ 1 semaine parce que la formation du cycle thiazolidine est réversible. Des hydrogels plus stables ont été synthétisés en introduisant entre l'aldéhyde et le PEG un espaceur ester qui permet la formation d'un cycle pseudoproline (Figure 12b) ³⁹.

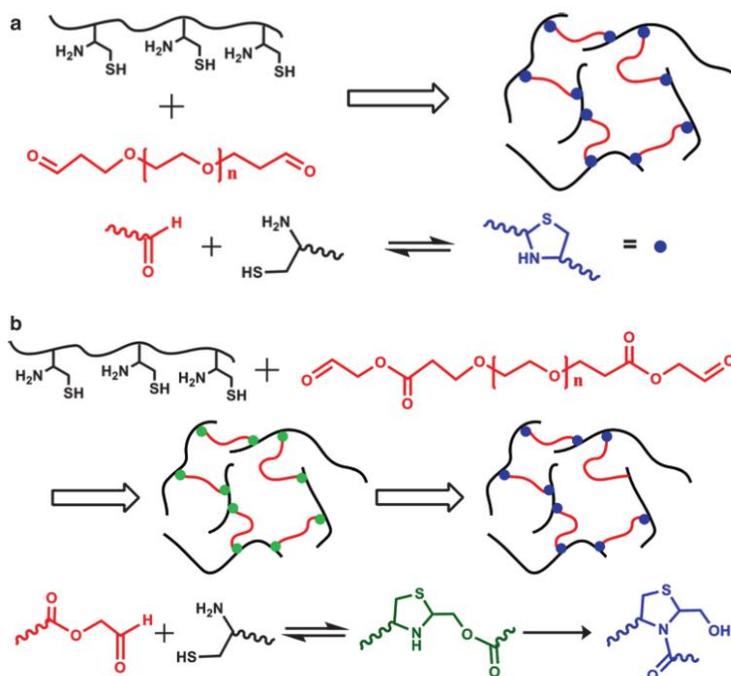


Figure 12 : préparation d'hydrogels par formation de liaisons peptidiques.

Enfin, la « chimie-click » est une réaction quantitative correspondant à la cycloaddition 1,3-dipolaire de fractions azoture et alcyne catalysée par le cuivre ⁴⁰(Figure 13).

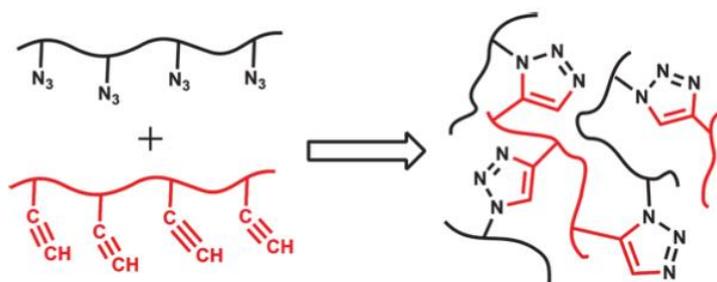


Figure 13 : préparation d'hydrogels par chimie click.

La chimie click peut être effectuée à température et pH physiologiques. Elle permet de synthétiser des réseaux de polymères synthétiques fonctionnalisés, à base de PVA, de PEG, de poly(N-isopropylacrylamide-co-hydroxyléthyl methacrylate) (P(NIPAAm-co-HEMA)) mais aussi des polymères naturels tels que l'acide hyaluronique ou la cellulose ⁴¹. La modification du degré de substitution et de l'accessibilité des groupements réactifs sont deux moyens de modifier la vitesse de gélification. Le cuivre est cependant connu pour être toxique pour la plupart des cellules bactériennes et animales ⁴², aussi des réactions Click

sans cuivre sont développées, comme une alternative pour préparer des hydrogels pour l'ingénierie tissulaire.

Bien que ces réactions soient hautement spécifiques et permettent un contrôle de l'architecture des hydrogels, elles demandent la modification préalable des polymères, processus qui peut être long et délicat à mettre en œuvre, mais également l'usage, dans certains cas, de composés nocifs pour les cellules. La réticulation enzymatique est une solution alternative inspirée des mécanismes qui se déroulent *in vivo*.

3.2.2. Réactions enzymatiques

Les réactions enzymatiques sont essentielles pour la formation de la MEC et pour un grand nombre de processus physiologiques. Elles ont donc aussi été utilisées pour la synthèse *in vitro* d'hydrogels chimiques. L'une des caractéristiques majeures des enzymes est le degré élevé de spécificité pour leur substrat qui limite les réactions secondaires. Agissant comme catalyseurs, elles ne sont pas incluses dans les réseaux qu'elles forment. Il est, de plus, possible de contrôler et de prédire la cinétique de formation de l'hydrogel et d'accroître la densité de réticulation du réseau en modifiant la concentration enzymatique. À titre d'exemple, la transglutaminase (TG), en présence de calcium, est capable de catalyser la réaction des amines primaires sur les carboxyamides des chaînes latérales glutaminyl des protéines ; cette réaction conduit à la formation d'une liaison amide (Figure 14a) ⁴³. L'utilisation de TG a été mise en œuvre avec succès lors de la synthèse d'hydrogels à base, notamment, de PEG fonctionnalisé par un motif glutaminamide ⁴⁴ ou de polypeptides ⁴⁵ pour renforcer des gels de protéines ⁴⁶.

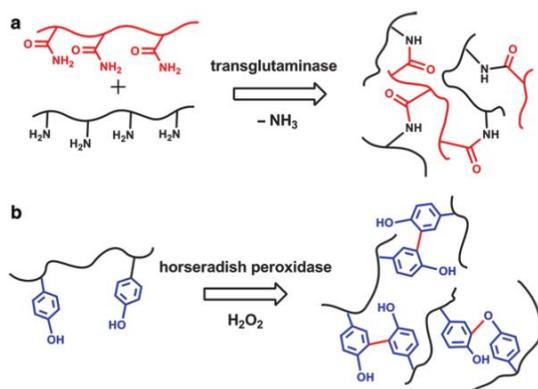


Figure 14 : schéma de réactions enzymatiques pour (a) un polypeptidique ou (b) un polysaccharide.

Par ailleurs, la peroxydase de raifort (HRP, en anglais horseradish peroxidase) est une hème-protéine qui catalyse le couplage des dérivés phénols ou anilines en présence de peroxyde d'hydrogène (Figure 14b). Des hydrogels à base d'acide hyaluronique, de dextran, de cellulose et d'alginate ont été synthétisés par cette approche ⁴⁷. Les temps de gel sont courts (1 minute), les propriétés mécaniques sont de l'ordre de 10^3 à 10^4

Pa, et les matériaux perdent moins de 25% de leur masse en 5 mois, dans du tampon PBS⁴⁸. Ces propriétés peuvent être modifiées en fonction du rapport HRP/H₂O₂/substrat^{49,50}.

Enfin, la thrombine est une protéase qui catalyse le clivage du fibrinogène pour former le caillot lors de la cicatrisation. Le mécanisme de cette réaction ainsi que les caractéristiques du réseau de fibrine ainsi formé seront décrits plus largement dans la partie 6.2.2.3.

3.2.3. Réticulation chimique par polymérisation radicalaire

La polymérisation radicalaire est couramment utilisée dans des applications biomédicales^{51,52} et en ingénierie tissulaire. Pour cela, des monomères ou des macromères portant des groupements vinyle, acrylate ou méthacrylate polymérisent suite à leur amorçage photochimique, redox ou thermique pour former des hydrogels.

Pour les applications mentionnées ci-dessus, la photopolymérisation radicalaire a l'avantage de pouvoir être contrôlée aisément dans l'espace et le temps, d'être rapide (de quelques secondes à quelques minutes) à température ambiante et/ou dans les conditions physiologiques et d'être faiblement exothermique⁵². Ainsi, des hydrogels peuvent être créés *in situ* à partir de précurseurs aqueux de manière peu invasive, en utilisant des dispositifs laparoscopiques⁵³ ou des cathéters⁵⁴. Des hydrogels de formes complexes qui adhèrent et se conforment aux structures tissulaires, peuvent ainsi être formés sous l'effet d'un rayonnement compris entre l'UV et le proche infra-rouge⁵⁵. Cependant, les systèmes biologiques ne tolèrent qu'une gamme restreinte de pH et de température, et les solvants organiques ainsi que les monomères toxiques sont à proscrire. Les conditions de polymérisation doivent donc être suffisamment douces (intensité lumineuse faible, temps d'irradiation court, température physiologique, absence de solvants organiques) pour être menées à bien en présence de cellules et de tissus. En effet, lors l'élaboration de matériaux cellularisés par polymérisation radicalaire photoamorcée, les cellules sont exposées, lors de l'étape d'amorçage principalement, à des doses de rayonnements lumineux plus ou moins importantes et à la création d'un flux de radicaux. Elles peuvent donc voir leur activité métabolique décroître⁵⁶. De plus, la chaleur dégagée lors de la réaction, si elle n'est pas contrôlée, peut induire la nécrose cellulaire⁵⁷. Aussi, pour limiter les dommages cellulaires, la puissance de la lampe UV est en général limitée à 5-10 mW/cm²³¹ et la cytotoxicité des photoamorceurs doit être préalablement étudiée, afin de choisir ceux dont l'effet sur la viabilité cellulaire est le plus faible^{58,59}.

Un photoamorceur absorbe fortement à une longueur d'onde spécifique, ce qui conduit à la coupure homolytique d'une de ses liaisons, et entraîne la libération des espèces radicalaires. Il existe trois grandes classes de photoamorceurs, distinguée par le mécanisme impliqué dans la photolyse. Les amorceurs cationiques ne sont généralement pas utilisés en ingénierie tissulaire car ils génèrent des acides protoniques.

Lors de leur irradiation UV, les photoamorceurs à base de cétones aromatiques, comme la benzophénone et la thioxanthone, par exemple, subissent l'arrachement d'un hydrogène qui génère un radical cétyle et un radical issu du donneur correspondant (Figure 15B). La polymérisation est ensuite généralement amorcée par le radical donneur d'hydrogène.

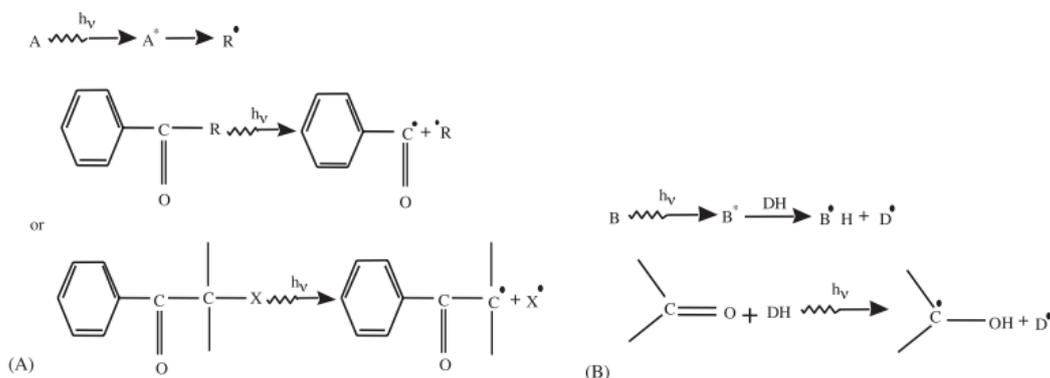
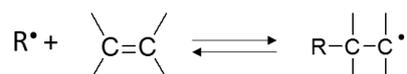


Figure 15 : Décomposition de photoamorceurs de polymérisation radicalaire (A) par photoclivage. (B) par arrachement d'hydrogène.

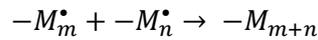
Enfin, certains photoamorceurs subissent un clivage homolytique et libèrent des radicaux (Figure 15A). On retrouve dans cette catégorie les composés à base de carbonyle aromatiques, d'hydroxyalkylphénols et de dérivés de l'acétophénone. Ces derniers, et plus particulièrement le 2,2-diméthoxy-2-phényl acétophénone, ont été utilisés pour synthétiser des hydrogels à base de Poly(éthylène) glycol diacrylate utilisés comme biomatériaux^{31,60}. Quelques exemples d'hydrogels synthétisés à partir de systèmes d'amorçage redox, notamment le couple N,N,N',N'-tetraméthyléthylènediamine (TEMED) et peroxydisulfate d'ammonium (APS), ont été choisis pour la synthèse d'hydrogels de chitosane modifié^{61,62}.

À la suite de l'amorçage, un monomère ou un macromère M est additionné sur le radical et le centre actif est alors porté par la chaîne macromoléculaire en cours de croissance. Au cours de la propagation qui suit, la chaîne macromoléculaire se forme par additions successives d'unités monomères ou macromères sur la chaîne en croissance porteuse du radical selon le schéma suivant :

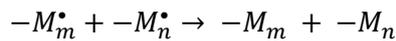


Les radicaux libres étant très réactifs, le temps nécessaire à la formation d'une chaîne macromoléculaire est très court (une fraction de seconde). Le mécanisme de réaction de la polymérisation radicalaire n'induit pas de structure stéréorégulière, les polymères ainsi produits sont donc en général atactiques.

Parallèlement, surtout lorsque la concentration en fonctions réactives devient faible, des réactions de terminaison se mettent en place et provoquent la disparition simultanée de deux radicaux libres. La terminaison peut être une combinaison (les deux chaînes forment une liaison covalente) :



ou bien une dismutation (réaction de transfert d'hydrogène, suivie d'une recombinaison) :



Une viscosité plus élevée du milieu peut ralentir la vitesse de terminaison, puisque le processus nécessite la rencontre de deux entités. La vitesse de propagation étant très élevée, les vitesses des réactions d'amorçage et de terminaison déterminent la cinétique globale de la polymérisation. L'amorçage nécessite une énergie d'activation très élevée, alors que celle de la terminaison est très faible. La formation des radicaux libres est l'étape limitante et leur durée de vie est très courte (<1s) ; ainsi, leur concentration est très faible au cours de la synthèse des hydrogels.

3.3. Combinaison des réticulations physique et chimique

Les hydrogels physiques sont constitués de liaisons réversibles et leurs propriétés mécaniques sont généralement inférieures à celles des hydrogels chimiques. Un certain nombre de méthodes de réticulation chimique implique des composés qui peuvent avoir un effet néfaste pour les cellules. La combinaison des réticulations chimiques et physiques permet d'obtenir des matériaux possédant des propriétés mécaniques élevées, tout en diminuant les concentrations en agents potentiellement cytotoxiques ³⁴.

Certains hydrogels peuvent être synthétisés *in situ* par stéréocomplexation d'un PEG-PLLA à 8 bras et d'un PEG-PDLA à 8 bras, fonctionnalisés à 40% par des méthacrylates qui peuvent être photoréticulés (Figure 16) ³¹. L'hydrogel obtenu présente un module de conservation plus élevé d'un facteur 3 ($6 \cdot 10^3$ contre $2 \cdot 10^3$ Pa) et une meilleure stabilité que ceux de l'hydrogel préparé uniquement par stéréocomplexation.

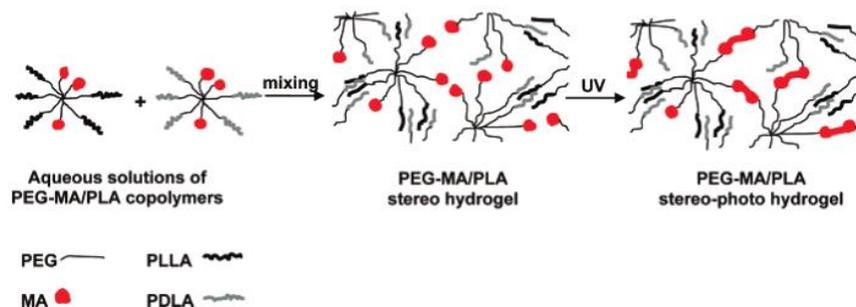


Figure 16 : représentation schématique de la synthèse d'hydrogels par stéréocomplexation et photoréticulation à partir de copolymères étoilés de PEG-PLA porteurs de fonctions méthacrylate ³¹.

Combiner les deux mécanismes de synthèse dans un même système hydrogel permet donc une gélification plus rapide, un meilleur contrôle des propriétés viscoélastiques de l'hydrogel, mais aussi, dans bien des cas, une meilleure biocompatibilité avec les cellules car les concentrations en photoamorceur utilisées sont plus faibles que dans les systèmes ne reposant que sur la photopolymérisation (0,003% au lieu de 0,1%)³⁴.

Les hydrogels peuvent ainsi être synthétisés par différentes méthodes. Les macromolécules associées, leurs proportions relatives et le mode de réticulation influencent la réponse cellulaire. Les propriétés requises pour les différents biomatériaux seront décrites dans la section suivante.

4. Propriétés requises pour un hydrogel pour la régénération tissulaire

La principale fonction d'un hydrogel pour l'ingénierie tissulaire est de favoriser la régénération tissulaire. Il doit donc être conçu comme un environnement tridimensionnel facilitant la croissance cellulaire. En fonction de l'application visée, le gel présente des caractéristiques propres au tissu qu'il vise à remplacer. Toutefois, ces gels doivent déjà être biocompatibles, autoriser la vascularisation sans laquelle les cellules ne disposent pas des nutriments adéquats et ne peuvent survivre, fournir un macroenvironnement adapté - en terme de rigidité, de propriétés viscoélastiques et de porosité – et, pour un certain nombre d'applications, être biodégradables, ou biorésorbables. Nous décrirons de manière succincte ces propriétés ci-dessous.

4.1. Biocompatibilité

Il existe plusieurs définitions de la biocompatibilité. Williams définit la biocompatibilité comme « *la capacité d'un matériau à accomplir sa fonction pour une application spécifique, en induisant une réponse appropriée chez l'hôte* »⁶³. Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, les matériaux sont en interaction avec le corps durant les processus de guérison et de régénération cellulaire ainsi que lors de la dégradation du matériau. S'il n'est pas biocompatible, l'hydrogel ne peut pas accomplir sa fonction, et les tissus avoisinant sont endommagés.

Certains produits utilisés pour la synthèse des hydrogels peuvent poser problème *in vivo*. Ainsi, les amorceurs de polymérisation, les solvants organiques, les agents stabilisants, les émulsifiants, les traces de monomères et d'agents de réticulation n'ayant pas réagi peuvent être toxiques pour les tissus de l'hôte s'ils diffusent hors du matériau. Par exemple, le 2,2-diméthoxy-2-phénylacétophénone, photoamorceur utilisé fréquemment dans les photopolymérisations radicalaires, est cytotoxique⁶⁴. Les maléimides, largement employés pour les additions de Michael, sont des neurotoxines très puissantes⁶⁵. L'utilisation de ces composants est souvent réhibitoire en vue d'une application clinique car, même si la synthèse des hydrogels

est suivie d'étapes de purification, telles que des rinçages à l'eau ou des dialyses, il reste difficile de prouver l'absence de tels composés. Pour des gels formés *in situ*, cela représente un challenge supplémentaire car les réactifs sont injectés directement dans le corps. Ainsi, bien que cette technique soit très intéressante car elle permet une invasivité minimale, il faut s'assurer que les composés utilisés sont peu toxiques et sans dangers pour la santé⁶⁶. La biocompatibilité des dérivés de polymères naturels est généralement considérée comme plus importante que celle des polymères synthétiques. Toutefois, il faut noter que la présence d'agents de réticulation et d'amorceurs, utilisés fréquemment pour la réticulation de monomères ou de prépolymères naturels, doit être contrôlée avec les mêmes précautions que pour les gels purement synthétiques.

La détermination de la biocompatibilité nécessite la réalisation de plusieurs types de tests menés séquentiellement. Dans un premier temps, des tests sont réalisés *in vitro* afin d'évaluer la non-cytotoxicité de l'hydrogel en vérifiant le maintien de la viabilité cellulaire, l'adhérence cellulaire à sa surface et l'éventuelle activation cellulaire. Cette évaluation peut être réalisée en plaçant le type cellulaire spécifique de l'application visée en contact direct avec soit l'hydrogel, soit par les matières solubles extraites du gel, à différentes dilutions (cela renseigne sur la cytotoxicité potentielle des composés de faible masse molaire qui diffusent hors du gel). Ces deux types d'expériences sont relativement aisés à mettre en œuvre et permettent de comparer facilement la réponse du nouveau matériau avec celle de matériaux connus et caractérisés. La norme ISO 10-993, partie 5 (l'évaluation biologique de la cytotoxicité *in vitro* des dispositifs médicaux) décrit un protocole consistant en la mise en contact du matériau entier ou de ses fractions extraites avec une monocouche de cellules L-929 (fibroblastes murins de lignée cellulaire)⁶⁷.

Une fois que la non-cytotoxicité est vérifiée *in vitro*, des tests *in vivo*, plus complexes et demandant toujours des accréditations particulières, sont mis en œuvre. Par ce moyen, il est vérifié chez le petit animal (rat, cochon d'Inde...) que l'hydrogel ne présente pas de danger dans des conditions similaires à celles de l'usage clinique. Un cadre précis pour ces tests, en fonction de la nature du contact entre le gel et l'organisme, mais aussi en fonction de la durée de ce contact est fourni par certaines normes ISO. Plusieurs aspects doivent être évalués : la propension du matériau à générer des réactions de sensibilisation ou d'allergie, sa toxicité, sa génotoxicité, les effets locaux liés à son implantation et enfin sa carcinogénicité⁶⁷. Pour être validé et testé chez l'homme (essais cliniques), le matériau doit posséder des propriétés au moins équivalentes, voire supérieures, à celles des matériaux existants et utilisés.

4.2. Vascularisation

À l'exception d'une minorité de tissus dont le cartilage, la plupart des tissus sont vascularisés. Cette vascularisation permet d'échanger des nutriments et d'éliminer les déchets potentiellement toxiques pour

les cellules. La néovascularisation des hydrogels, bien qu'elle ne soit pas facile à mettre en œuvre, est donc un élément important dont il faut tenir compte en ingénierie tissulaire. Pour cela, l'hydrogel doit avoir une taille de pores adaptée et pouvoir être remodelé à mesure que le tissu gagne en maturité.

Pour favoriser la vascularisation d'un hydrogel avant son implantation, il existe plusieurs approches, dont deux sont illustrées sur la Figure 17. La première consiste à incorporer des molécules favorisant la croissance de vaisseaux sanguins à partir des tissus environnants, ainsi que le recrutement de cellules endothéliales ou de cellules progénitrices d'endothélium^{15,66}. La seconde consiste à ensemercer directement dans le matériau des cellules endothéliales.

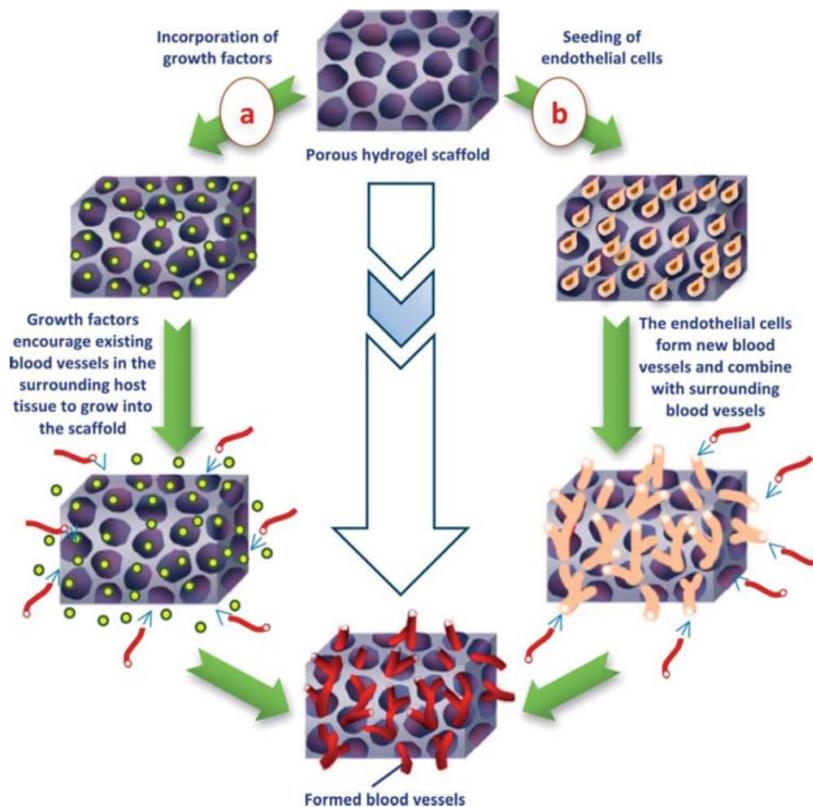


Figure 17 : illustration schématique de la formation de vaisseaux sanguins favorisée par (a) l'incorporation de facteurs de croissance ou (b) par l'ensemencement de cellules endothéliales dans le matériau poreux¹⁵.

Bien que ces deux techniques aient démontré leur utilité dans la vascularisation, elles sont encore imparfaites, car le développement d'un réseau vasculaire est un processus long, qui dépend de la quantité de cellules endothéliales progénitrices circulantes et de leur disponibilité. Une alternative possible est la prévascularisation (implantation *in vivo*, permettant la vascularisation du gel avant son implantation définitive⁶⁸).

4.3. Dégradation

Bien que pour certaines applications, telles que le remplacement de la cornée ou du cartilage articulaire, des hydrogels permanents ou semi-permanents, qui ne subissent pas de dégradation complète, sont préférés ¹⁵, pour de nombreuses applications en ingénierie tissulaire, des matériaux biodégradables sont souhaités. Ils se dégradent peu à peu et sont *in fine* remplacés par des cellules et un tissu formé par la matrice extracellulaire nouvellement synthétisée. Il est alors primordial que les produits de dégradation soient biologiquement inertes, de sorte qu'ils puissent être rapidement métabolisés après leur clivage. Des progrès importants ont été accomplis dans ce domaine au cours de la dernière décennie et, aujourd'hui, la vitesse et le taux de dégradation des hydrogels peuvent être ajustés en fonction de l'application souhaitée ⁶⁹.

Selon la nature (synthétique ou naturelle) des macromolécules formant l'hydrogel, deux mécanismes de dégradation principaux peuvent se mettre en place :

- La dégradation chimique des macromolécules synthétiques est généralement réalisée par hydrolyse spontanée (scission de groupements fonctionnels en contact avec l'eau, pouvant être catalysée par des acides, des bases, ou des sels ⁷⁰). La nature du groupement chimique dans le squelette du polymère détermine la vitesse de l'hydrolyse. Les polymères bien connus pour se dégrader par hydrolyse sont les polyanhydrides, les poly(ortho esters), les poly(α -hydroxy esters) et les thioether-esters, (obtenus par une addition de type Michael) (Figure 18).

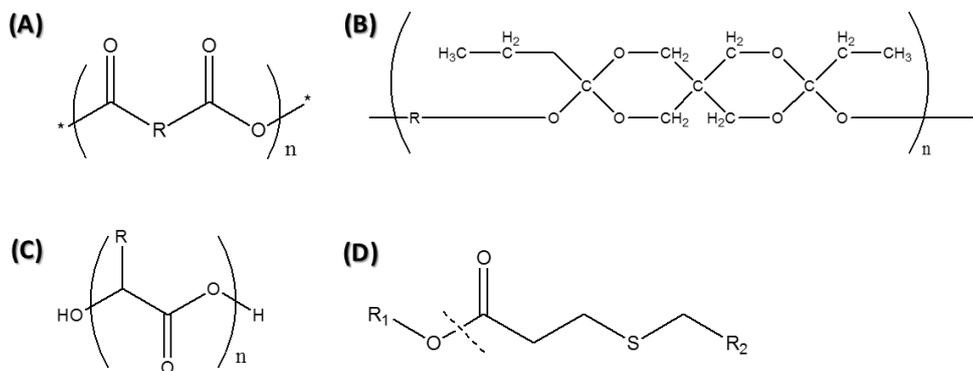


Figure 18 : unités de répétition hydrolysables retrouvées dans les: (A) polyanhydrides; (B) poly(ortho esters); (C) poly(α -hydroxyl esters); (D) liaison thioéther-ester ⁷¹.

- La dégradation des polymères biologiques (oligopeptides, protéines ou polysaccharides) est possible par les enzymes, sécrétées par les cellules. Celles-ci reconnaissent et clivent des sites spécifiques ⁷². La dégradation dépend alors de la localisation et de la concentration en enzyme ainsi que du mécanisme de la réaction.

Une autre approche est la dégradation d'hydrogels à base de polymères synthétiques dans lesquels des segments sensibles au clivage enzymatique (en général de courts fragments peptidiques) ont été introduits (Figure 19).

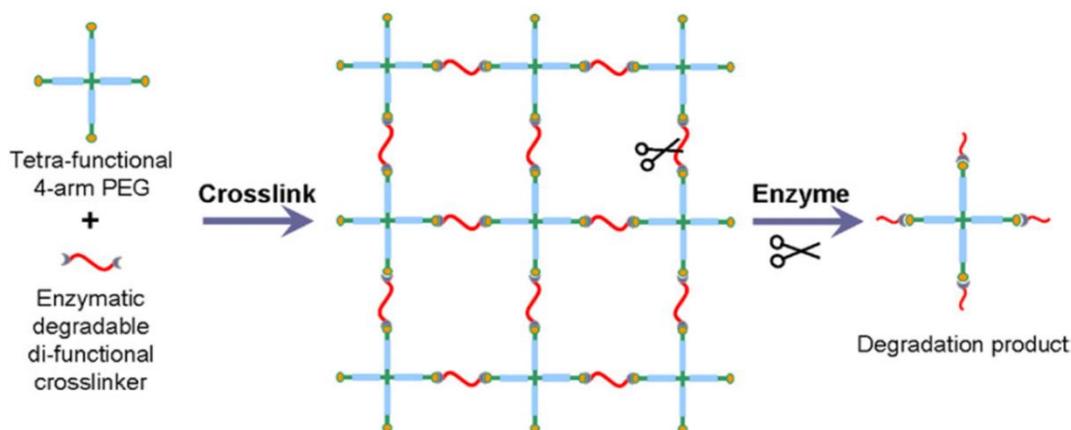


Figure 19 : représentation schématique de la synthèse et de la dégradation enzymatique d'hydrogels contenant des segments sensibles au clivage par les protéases ⁷¹.

Les métalloprotéinases matricielles (MMP) sécrétées par toutes les cellules dégradent spécifiquement des molécules de la MEC. C'est pourquoi des segments dérivés de macromolécules biologiques, pouvant être dégradés par des MMPs ont été également introduits dans des hydrogels de polymères synthétiques ⁷³⁻⁷⁶. Une autre approche est l'incorporation de ponts disulfure (S-S) dans le squelette de la macromolécule synthétique. En effet, dans l'environnement intracellulaire réducteur, les ponts disulfures sont dégradés par la glutathione et la thioredoxine réductases ⁷¹.

Un biomatériau est dégradé soit par l'érosion de sa surface (Figure 20A), soit par sa dégradation dans la masse (Figure 20B). L'érosion de surface est subie par les polymères plutôt hydrophobes, tels que les poly(anhydrides) et les poly(ortho esters), pour lesquels la pénétration de l'eau ou de l'enzyme dans le matériau est réduite. Cette érosion permet le relargage contrôlé de petites molécules. Lors d'une dégradation dans la masse, des liaisons sont clivées dans l'ensemble du matériau, ce qui diminue la densité de réticulation des macromolécules et provoque une augmentation de la teneur en eau, la libération de monomères solubles et de fragments de chaînes, ainsi qu'un changement très important dans les propriétés mécaniques, et ceci dès les premières étapes de la dégradation. Ce type de dégradation est très intéressant pour le relargage contrôlé de macromolécules.

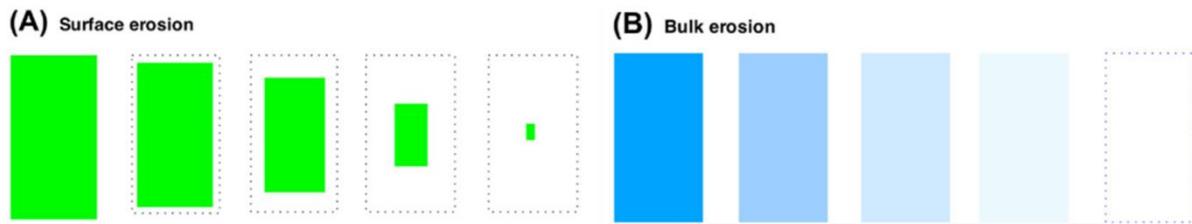


Figure 20 : représentation schématique de (A) l'érosion de surface et (B) la dégradation dans la masse ⁷¹.

Plusieurs approches permettent de suivre la cinétique de dégradation des matériaux. La méthode la plus fréquemment utilisée consiste à suivre l'évolution de la masse de l'échantillon en fonction du temps de dégradation, qu'il soit gonflé ou après une étape de séchage ⁷⁷⁻⁷⁹. Cette méthode est simple à mettre en œuvre et permet de suivre la dégradation de matériaux composés de plusieurs macromolécules, si du moins ils ne se fragmentent pas.

Un des composants de l'hydrogel peut être marqué et sa diffusion suivie hors du matériau. Cela peut être une macromolécule formant le réseau (protéines marquées par des fluorophores ^{76,80-82}) ou une molécule emprisonnée dans le réseau et porteuse d'un fluorophore ⁸³.

Quelques exemples de suivi de l'évolution des propriétés viscoélastiques au cours de la dégradation ont également été rapportés dans la littérature : la dégradation de gels synthétiques a été étudiée par l'équipe de Metters ⁸⁴⁻⁸⁶. Un modèle mathématique décrivant l'évolution de l'architecture lors de la dégradation a été mis point. La cinétique de dégradation d'hydrogels composés de macromolécules naturelles a également été rapportée à deux reprises ^{87,88}. Toutefois, cette méthode est moins fréquemment utilisée que les deux précédentes.

4.4. Propriétés viscoélastiques

La matrice extracellulaire exerçant une tension mécanique sur les cellules d'un tissu, les propriétés mécaniques des hydrogels influencent la croissance et la prolifération cellulaire. Ainsi, quand l'environnement cellulaire est modifié (stressé, par exemple), le phénotype cellulaire est lui-aussi modifié, ces modifications pouvant aller de changements morphologiques à des modifications de l'expression génique ⁶⁶. Suivant le type d'applications visées, les matériaux n'ont donc pas les mêmes modules mécaniques. La Figure 21 résume les modules d'Young des différents tissus mous et organes du corps humain, variant entre 0,1 et 1000 kPa ⁸⁹.

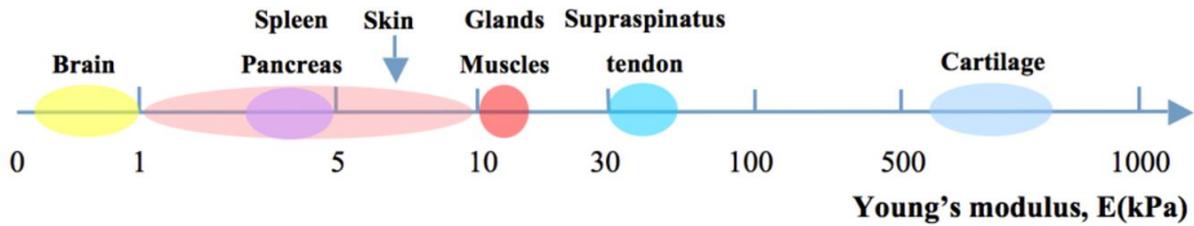


Figure 21 : modules d'Young des tissus mous et organes *in vivo* (hydratés), en kPa ⁸⁹.

Pour certains types cellulaires, la rigidité (module d'Young élevé) est plus importante pour l'étalement que la concentration en ligand d'adhérence. La variation de la densité de réticulation des macromolécules dans l'hydrogel est un moyen efficace pour modifier ses propriétés mécaniques, son taux de gonflement et sa taille de maille. *De facto*, cela permet de modifier le comportement des cellules encapsulées dans l'hydrogel, ainsi que la quantité de MEC sécrétée. Cette dernière est aussi affectée par le caractère hydrophile ou hydrophobe du polymère employé. Modifier la porosité du réseau a également un impact sur l'intégration du matériau aux tissus environnants ⁹⁰ et sur ses propriétés mécaniques ⁸⁹ (bien que cela dépende du tissu). Ces pores permettent la diffusion de nutriments, le transport des déchets, et la néoformation de tissu.

Plusieurs méthodes permettent de mesurer les propriétés mécaniques des hydrogels dont les principes sont schématisés sur la Figure 22. Leur réponse à une sollicitation est liée à la fois au caractère viscoélastique du réseau de polymère, et à la composante liquide. Il existe également des méthodes de mesure sans contact permettant de mesurer les propriétés mécaniques.

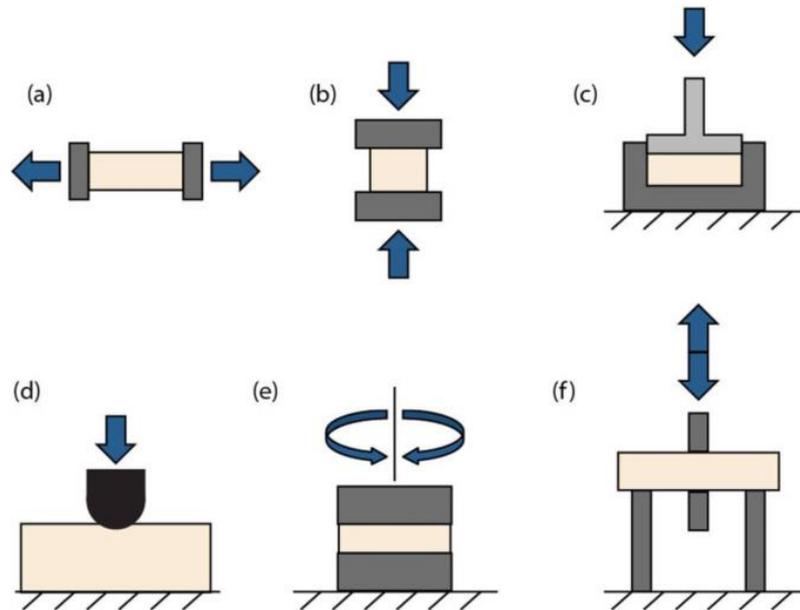


Figure 22 : représentation schématique des différentes méthodes de mesure des propriétés mécaniques : (a) tension, (b) compression, (c) compression confinée, (d) indentation, (e) rhéométrie en cisaillement, (f) analyse mécanique dynamique (DMA), ici illustrée pour une flexion en 3 points ⁹¹.

Pour la plupart de ces mesures, une force uniaxiale (contrainte) est appliquée, et la réponse de l'échantillon (déformation) est mesurée. Les macromolécules constituant l'hydrogel emmagasinent une certaine quantité d'énergie élastique qu'elles peuvent restituer à l'arrêt de la sollicitation.

Si une force de traction est appliquée à un hydrogel, le matériau tend à s'allonger. La grandeur mesurée est le module d'Young E , qui caractérise la résistance du gel à la déformation uniaxiale. Pour réaliser ce type de test, il faut avoir une bonne prise sur l'échantillon, ce qui est particulièrement délicat avec des systèmes hydratés tels que les hydrogels ⁹¹.

Les tests de compression peuvent être effectués plus aisément : l'hydrogel est comprimé uniformément sur toute sa surface. Le renflement du gel qui en découle généralement peut être limité par des mesures de compression dites « confinées ». Le module de compressibilité est généralement noté K et décrit de la variation du volume de l'échantillon.

L'indentation consiste à amener une sonde de géométrie connue pour compresser localement l'échantillon. Méthode de référence pour la caractérisation des matériaux solides elle a été adaptée aux hydrogels et aux matériaux de faibles volumes. Un module dit « réduit » est mesuré. Il est lié au module d'Young par la relation suivante :

$$E_R = \frac{E}{1 - \nu^2}$$

où ν est le coefficient de Poisson de l'échantillon. Celui-ci permet de caractériser la contraction de la matière perpendiculairement à la direction de la contrainte appliquée.

En rhéologie oscillatoire (méthode d'analyse des propriétés viscoélastiques principalement utilisée dans nos travaux), un cisaillement oscillatoire est appliqué à l'échantillon. Le plus fréquemment, un cisaillement d'une amplitude fixe (généralement faible) est appliqué à différentes fréquences d'oscillation. Ces mesures doivent être effectuées dans le domaine linéaire de l'échantillon, c'est-à-dire des fréquences et des déformations imposées au matériau qui ne provoquent pas sa déstructuration.

Le module de stockage G' , qui rend compte de l'élasticité de l'échantillon, et le module de perte G'' , qui rend compte de sa viscosité, sont ainsi mesurés. Ces deux modules composent le module complexe selon l'équation suivante :

$$G^* = G' + iG''$$

Comme la rhéologie permet d'étudier à la fois les liquides et les solides viscoélastiques : elle permet aussi de suivre la gélification.

Les 3 modules introduits ci-dessus sont reliés entre eux par la relation suivante :

$$E = \frac{9KG}{G + 3K} = 3K(1 - 2\nu) = 2G(1 + \nu)$$

Les hydrogels décrits dans cette partie sont caractérisés par ces différentes méthodes, mais il est souvent délicat de comparer les modules obtenus. En effet, le coefficient de Poisson ne peut pas toujours être déterminé, en particulier pour les systèmes hydratés.

4.5. Microenvironnement

L'un des enjeux de la conception d'hydrogels cytocompatibles est de parvenir à mimer la nature dynamique de la MEC, notamment par la biodégradabilité et des propriétés viscoélastiques adaptées, comme cela vient d'être présenté. *In vivo*, la croissance et la prolifération cellulaires sont gouvernées par des facteurs intrinsèques mais aussi extrinsèques (interactions cellule-cellule, des facteurs solubles...) et désignés dans leur ensemble par le terme « microenvironnement » cellulaire ⁶⁶. Ce microenvironnement, notamment impliqué dans la différenciation des cellules souches, est très complexe, car il est formé d'une grande variété de molécules (protéines - collagène, fibronectine, polysaccharides - acide hyaluronique, protéoglycanes, facteurs de croissance divers, enzymes et inhibiteurs) liées par plusieurs types de liaisons et organisées en différents types d'assemblages supramoléculaires.

Dans le cadre de l'ingénierie tissulaire, le matériau implanté doit permettre de contrôler le plus finement possible ce microenvironnement. Le contrôle spatio-temporel des interactions biologiques à l'interface matériau / cellules permet d'agir sur la prolifération, l'adhérence, la migration des cellules, ainsi que sur les interactions ligand/récepteur ⁶⁹. Ces dernières années, d'importants efforts ont été faits pour incorporer dans des hydrogels des éléments de la MEC, afin d'améliorer la survie, la prolifération et la différenciation cellulaires. Pour cela, deux voies ont été développées (Figure 23) :

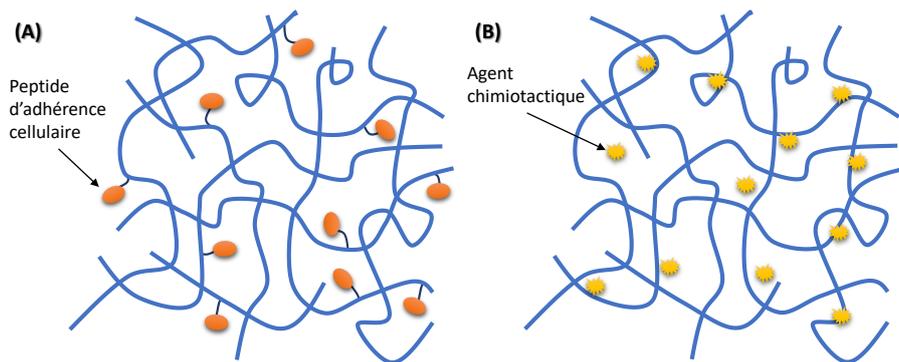


Figure 23 : stratégies d'amélioration de la survie cellulaire par modifications des hydrogels par (A) greffage de molécules biochimiques comme des peptides d'adhérence cellulaire et (B) encapsulation physique d'agents chimiotactiques.

La première consiste en l'incorporation contrôlée de molécules biochimiques. En effet, les cellules interagissent avec leur environnement par la liaison à des molécules de la MEC, en particulier *via* des intégrines. Ces protéines transmembranaires sont les principaux récepteurs d'interaction avec la matrice extracellulaire ⁹². Or les hydrogels synthétiques sont dépourvus de tels motifs moléculaires permettant l'adhérence cellulaire, la migration et la dégradation enzymatique. Des molécules bioactives doivent donc être incorporées au réseau pendant ou après la réticulation ⁹³. La densité, la taille du domaine, la longueur du bras espaceur sont autant de facteurs qui doivent être pris en considération lors de l'incorporation de motifs d'adhérence cellulaire au sein des hydrogels, afin de favoriser l'étalement et l'adhérence cellulaire ⁶⁹.

La seconde voie consiste en l'encapsulation physique de composés d'intérêt qui seront ensuite relargués : plusieurs agents chimiotactiques, influençant la migration cellulaire, peuvent être encapsulés dans des hydrogels ⁶⁶. Des stimuli physiques tels que le pH, la température, des enzymes, etc peuvent initier leur relargage ⁹⁴.

À ce jour, les hydrogels sont principalement utilisés comme éléments de structure, barrières tissulaires et bioadhésives, réservoirs de molécules bioactives ou pour encapsuler et libérer des cellules. La

section suivante est consacrée à une présentation synthétique des fonctions nécessaires pour chacune de ces applications.

5. Application des hydrogels en ingénierie tissulaire

5.1. Matériaux support (« scaffold »)

Comme leur nom l'indique, ces matériaux servent de support temporaire qui facilitent les processus de réparation tissulaire. Ils doivent donc permettre l'adhérence, l'étalement, la motilité, la survie et la différenciation cellulaires⁹⁵. Leur fonction en ingénierie tissulaire est de permettre la croissance cellulaire en leur sein et/ou la migration à partir des tissus environnants. Le matériau support est donc un support pour l'adhérence cellulaire, la prolifération, la différenciation, le transport de nutriments et l'excrétion des déchets pendant que la cellule sécrète sa propre matrice extracellulaire.

Idéalement, ce matériau support doit :

- avoir une structure tridimensionnelle dans laquelle les pores sont interconnectés pour permettre la croissance cellulaire et le flux de nutriments et des déchets métaboliques.
- être biocompatible, c'est-à-dire qu'il ne doit pas susciter de réaction inflammatoire ni posséder une forte immunogénicité ou une cytotoxicité importante⁹⁵.
- être biorésorbable avec une vitesse de dégradation et de résorption contrôlée pour coïncider avec la croissance cellulaire/tissulaire *in vitro/in vivo*. Si sa dégradation est trop rapide, le matériau ne joue plus son rôle de support et l'organisme n'est pas capable d'éliminer les produits de dégradation, ce qui peut engendrer des réponses inflammatoires ou toxiques. Si la dégradation est trop lente, elle limite la croissance du nouveau tissu.
- avoir une surface permettant l'adhérence cellulaire, la prolifération et la différenciation des cellules.
- avoir des propriétés mécaniques correspondant à celles du tissu d'implantation dont ils doivent favoriser la régénération, afin de servir de support lors des premières phases de croissance cellulaire. Si son module de compression est trop faible, le matériau support peut être déformé et écrasé, ce qui conduit à une croissance cellulaire déformée voire à l'absence de toute croissance. S'il est trop élevé, les cellules ne sont pas dans des conditions optimales pour la croissance cellulaire. Les différences de modules élastiques se traduisent par des déformations différentes pour la même contrainte imposée, ce qui peut causer la délamination du matériau support.
- pouvoir être produit en quantité importante et dans des conditions satisfaisantes de qualité, en limitant au maximum l'emploi de solvants organiques⁹⁶.

5.2. Rôle de barrière

Les hydrogels peuvent aussi être utilisés comme barrières pour améliorer la guérison des tissus vasculaires blessés en prévenant la resténose ou la thrombose dues à la formation d'adhérences post-opératoires^{75,97}. La formation intravasculaire d'un hydrogel fin permet, en effet, de limiter l'épaississement de l'intima (couche de cellules endothéliales en contact direct avec le flux sanguin, appuyées sur une lame basale) et la thrombose. L'hydrogel agit alors comme une barrière empêchant les plaquettes, les facteurs de la coagulation et les protéines du plasma d'interagir avec la paroi cellulaire. Leur contact avec la paroi des vaisseaux sanguins étant limité, la prolifération, la migration et la synthèse de matrice extracellulaire par les cellules musculaires lisses ainsi que la resténose le sont également.

Certains hydrogels permettent de limiter la formation d'adhérences induites par des traumatismes chirurgicaux, plus particulièrement au niveau du péritoine⁹⁸, et dues à une fibrinolyse anormale. Ainsi, un gel de poly(éthylène glycol-co-acide lactique) diacrylate, formé par polymérisation en masse sur les surfaces intrapéritonéales, limite le dépôt de fibrine et l'attachement des fibroblastes à la surface tissulaire, minimisant ainsi l'adhérence cellulaire. Ce gel étant biodégradable, il se résorbe au fil du temps⁹⁹. Ces hydrogels constituent donc une barrière qui limite l'adsorption protéique et la diffusion afin d'empêcher les cellules de s'attacher à leur surface.

5.3. Libération contrôlée de principes actifs

Les hydrogels possèdent un certain nombre de propriétés physico-chimiques qui les rendent particulièrement adaptés à la libération contrôlée de molécules bioactives. En effet, leur porosité importante permet le stockage de molécules bioactives et leur relargage de manière prolongée dans le temps⁹⁴. Cette délivrance peut être contrôlée par diffusion, qui dépend du gonflement, de la nature chimique de l'hydrogel et des stimuli de l'environnement (Figure 24). Les propriétés physico-chimiques telles que la perméabilité (pour un relargage prolongé), la sensibilité aux signaux de l'environnement (délivrance pulsatile), la fonctionnalité de surface (greffage de PEG pour la furtivité), la biodégradabilité, ou des sites de reconnaissance en surface (pour une libération et une bioadhésion ciblées) peuvent alors être optimisées. Le contrôle des capacités de gonflement d'un hydrogel est une méthode permettant de déclencher un relargage contrôlé : cela peut être fait par le contrôle de la longueur des chaînes de polymère, ou de la composition en polymère, afin de modifier la densité et le degré de réticulation du réseau.

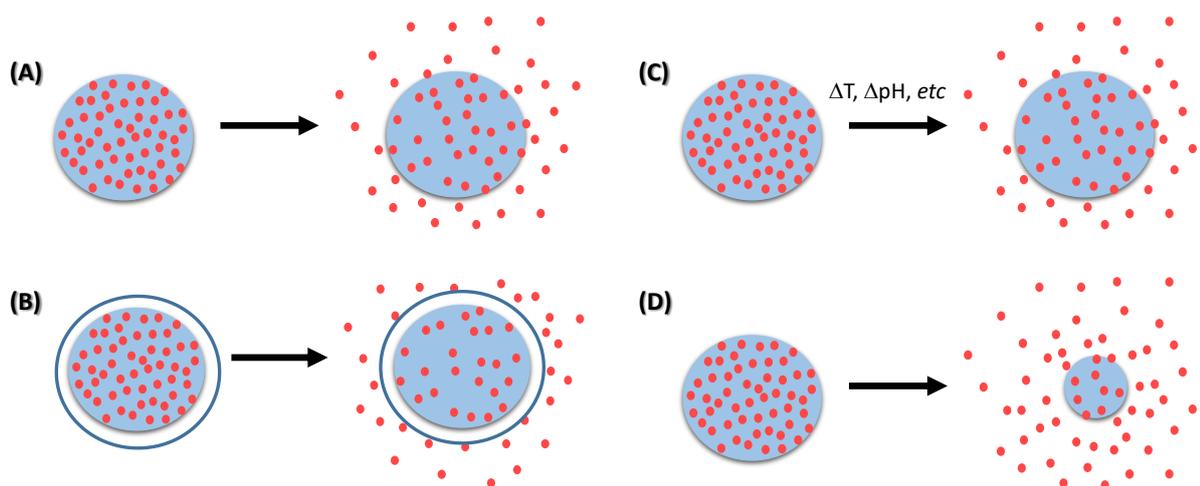


Figure 24 : exemples de mécanismes de délivrance/relargage des hydrogels (A) principe actif (PA) dissout dans l'hydrogel ; (B) PA encapsulé dans l'hydrogel ; (C) PA dissout dans un hydrogel sensible aux signaux de l'environnement ; (D) PA dissout dans un hydrogel dégradabile. D'après Peppas *et al* ¹⁰⁰.

L'existence d'un gradient de concentration en molécules actives entre le matériau et le milieu extérieur favorise leur diffusion de l'intérieur vers l'extérieur. Ces phénomènes de diffusion sont régis par les lois de Fick. Le flux molaire de la molécule bioactive, J (mol/cm²) est alors proportionnel au gradient de concentration (Δc) selon la relation :

$$J = -D \frac{dc}{dx}$$

où D est le coefficient de diffusion dans le polymère (cm²/s), c est la concentration de la molécule bioactive dans l'hydrogel (mol/cm³) et x la distance de diffusion. Par ailleurs, la variation dans le temps du gradient de concentration entraîne une diminution du flux de matière. La variation de concentration en éléments diffusants (dc/dt) est inversement égale à la variation du flux de matière (dJ/dx). La cinétique de relargage est déterminée par l'équation suivante :

$$\frac{dc}{dt} = D \left(\frac{d^2c}{dx^2} \right)$$

Pour les applications biomédicales, les hydrogels biodégradables sont favorisés car la seconde opération chirurgicale pour les retirer n'est pas nécessaire. Par contre, la prédiction du temps de dégradation de l'hydrogel est cruciale pour relarguer les quantités adaptées et sur des durées suffisantes. Les exemples sont nombreux mais ne seront pas détaillés dans ce manuscrit.

5.4. Encapsulation cellulaire

L'encapsulation cellulaire consiste à fabriquer un matériau dans lequel des cellules sont incluses au moment de la synthèse (Figure 25), et à l'utiliser pour remplacer un tissu altéré ou pour implanter des cellules libérant des facteurs trophiques stimulant la réparation tissulaire. De tels traitements ont été développés pour certaines pathologies, telles que le diabète, les dysfonctionnements hépatiques, les troubles neurologiques, les défauts osseux et le cancer¹⁰¹. L'hydrogel utilisé maintient alors la viabilité cellulaire, sans quoi il n'assure pas sa fonction première. Pour cela, la diffusion des nutriments, des déchets métaboliques et de l'oxygène au travers du matériau doit être possible bien qu'elle dépende directement de l'épaisseur et de la porosité du réseau.

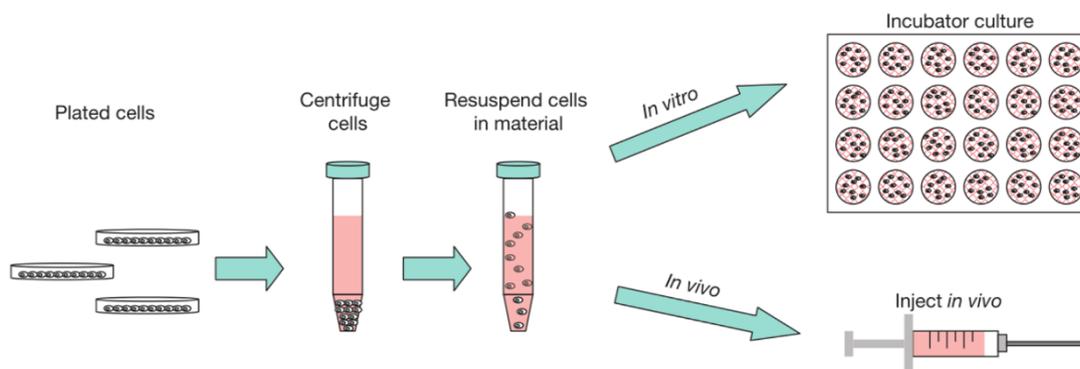


Figure 25 : principe de l'encapsulation cellulaire : les cellules sont cultivées classiquement puis décrochées de leur flasque de culture, centrifugées et resuspendues dans la solution d'encapsulation. Les cellules et les matériaux peuvent être cultivés *in vitro* dans des plaques de culture cellulaire, ou injectés *in vivo*, en fonction de l'application souhaitée¹⁰¹.

Nous allons maintenant décrire les principaux types d'hydrogels utilisés en ingénierie tissulaire. Cette présentation ne sera pas exhaustive mais permettra de situer les travaux réalisés pendant cette thèse par rapport aux hydrogels existants et possédants des propriétés équivalentes.

6. Types d'hydrogels

Les différents matériaux présentés ici peuvent être synthétisés à partir soit de précurseurs synthétiques, soit de précurseurs naturels, soit d'une combinaison des deux. Ce panorama s'étend des travaux précurseurs dans le domaine des hydrogels appliqués à l'ingénierie tissulaire, datant des années 1960, jusqu'à des travaux plus récents tout juste publiés et encore en développement. Les hydrogels qui existent sous forme de produits commerciaux sont également mentionnés.

6.1. A base de précurseurs synthétiques

6.1.1. Hydrogels polyacrylate.

Des hydrogels aux propriétés physico-chimiques adaptées pour les applications biomédicales peuvent être préparés à partir de différents monomères (méth)acrylates disponibles commercialement ¹⁰². Les plus étudiés sont sans doute les hydrogels à base de poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA) (Figure 26A) qui ont été utilisés comme matériaux implantés depuis près d'un ½ siècle maintenant ²¹.

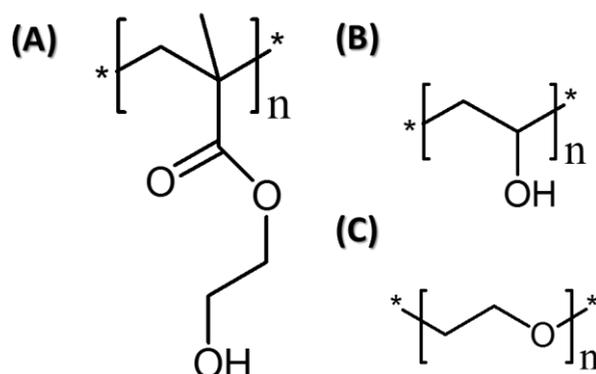


Figure 26 : Formules chimiques des polymères les plus utilisés pour la synthèse des hydrogels en ingénierie tissulaire (A) poly(2-hydroxyéthyl méthacrylate) (PHEMA), (B) alcool polyvinylique et (C) poly(éthylène glycol).

Les réseaux de PHEMA sont synthétisés par polymérisation radicalaire du 2-hydroxyéthyl méthacrylate. Ce monomère commercial contient souvent une petite portion d'éthylène glycol diméthacrylate (< 3%) qui conduit à la réticulation du PHEMA. L'hydrogel peut être préparé dans une grande variété de formes et de tailles. Il est mou, biologiquement inerte et il peut être stérilisé par la chaleur sans subir de dommages. Il est très résistant à l'adsorption protéique et donc à l'adhérence cellulaire.

Ces hydrogels ont été largement utilisés dans les années 1960 comme lentilles de contact. Toutefois, leur transport d'oxygène insuffisant et leur fragilité mécanique (module de Young de 0,5 MPa) ont poussé les chercheurs à améliorer ces matériaux. La perméabilité à l'oxygène est décrite par une valeur de Dk , où D est la diffusivité du matériau et k sa solubilité. Plus la valeur du Dk est élevée, meilleure est la perméabilité à l'oxygène. Pour les lentilles de contact originales, le Dk mesuré était seulement de 10 barrer ¹⁰³. La copolymérisation de N-vinylpyrrolidone (NVP) avec le HEMA permet d'obtenir des hydrogels ayant une meilleure perméabilité pour l'oxygène (de l'ordre de 110 barrer) ¹⁰⁴. Plus récemment, des acrylamides substitués, l'acétate de vinyle et des méthacrylates substitués ont été copolymérisés avec le HEMA pour améliorer encore les propriétés de ces hydrogels, pour obtenir des modules de Young supérieurs à 1MPa ²⁰. Ainsi, des cornées artificielles (kératoprothèses Alphacor™) ont été développées à partir du PHEMA ¹⁰⁵.

Les hydrogels à base de PHEMA sont aussi utilisés pour de la délivrance contrôlée¹⁰⁶. Leur résistance à la dégradation et leur vitesse de délivrance peuvent, en effet, être facilement modulées selon les comonomères et la densité de réticulation choisis. Des hydrogels micro- ou macroporeux de PHEMA peuvent également être préparés en présence de cristaux de glace, qui sont ensuite fondus¹⁰⁷. Ainsi, depuis la fin des années 70, des hydrogels à base de PHEMA sont utilisés pour libérer des agents thérapeutiques, tels que des anti-arythmiques, des vasoconstricteurs, des antibiotiques et des anti-inflammatoires²⁰.

6.1.2. Alcool polyvinylique

L'alcool polyvinylique (Figure 26B) est préparé par hydrolyse partielle du poly(acétate de vinyle). Le degré d'hydrolyse, généralement compris entre 85 et 100%, détermine certaines propriétés du PVA, dont notamment sa cristallinité et sa solubilité dans l'eau. Il peut être réticulé physiquement (zones cristallines) ou chimiquement (réticulation par des dialdéhydes, des anhydrides, et des di-isocyanates). Des hydrogels physiques de PVA peuvent être préparés par des cycles congélation/décongélation, pour densifier la structure macromoléculaire¹⁰⁸. Récemment, des hydrogels chimiques de PVA non cellularisés ont été réticulés par irradiation par des rayons gamma ou par un faisceau d'électrons, comme alternative à l'utilisation des réticulants chimiques qui demeurent à l'état de traces et sont hautement toxiques pour les cellules lors de l'implantation. Cette méthode présente l'avantage de stériliser l'échantillon lors de la réticulation mais n'est pas utilisable pour des matériaux cellularisés.

L'alcool polyvinylique est similaire au PHEMA en termes de concentration en groupements alcool pouvant servir de sites d'ancrage pour les molécules biologiques. De plus, il est élastique et peut ainsi induire l'orientation des cellules ou la synthèse de matrice en augmentant la transmission des stimuli mécaniques aux cellulesensemencées¹⁰⁹. Comme les autres hydrogels neutres, les gels de PVA ne permettent pas l'adhérence des protéines et des cellules. Cette dernière peut, cependant, être obtenue par conjugaison avec des facteurs biologiques. Des hydrogels de PVA ont été étudiés comme systèmes de délivrance contrôlée. Initialement à l'état sec, lorsque le gonflement par les fluides biologiques commence, le relargage de la molécule active est initié²⁰.

Les hydrogels de PVA ont été largement étudiés pour le remplacement de tissus avasculaires. En effet, ces gels sont plus résistants que la plupart des autres gels synthétiques. Ils ont un coefficient de friction faible (entre 0,0276 et 0,0546) et des propriétés similaires au cartilage (dont le coefficient de friction est de 0,01)¹¹⁰. L'équipe d'Oka a étudié des hydrogels de PVA pour le remplacement de cartilage articulaire en examinant des aspects physiques tels que la lubrification, la capacité de charge, la biocompatibilité et l'attachement du biomatériau à l'os. Le matériau obtenu a été testé comme ménisque artificiel dans les genoux de lapins. Ils ont résisté pendant 2 ans sans perte d'intégrité ou de propriétés mécaniques¹¹¹. Un

hydrogel de PVA est actuellement commercialisé en Europe et au Canada pour le remplacement de cartilage articulaire, sous le nom de Salubria™ (Salumedica, Atlanta, GA).

6.1.3. Polyéthylène glycol (PEG)

Le PEG est également un polymère neutre et hydrophile qui est le plus largement utilisé pour des applications biomédicales. Ces polyéthers, obtenus par polycondensation de l'oxyde d'éthylène, possèdent des groupements –OH terminaux qui peuvent être aisément modifiés. Bien que les noms de poly(éthylène glycol) (PEG) et poly(oxyde d'éthylène) (POE) soient employés indifféremment dans la littérature, le terme PEG fait référence aux polymères de faibles masses molaires, tandis que le terme POE renvoie aux polymères de masse plus élevée (> 20 000 g/mol)¹¹². Par souci de clarté, le terme PEG sera utilisé dans la suite de cette section.

Les hydrogels de PEG sont non toxiques, non immunogènes¹¹³, et approuvés par la Food and Drugs Administration (FDA) pour plusieurs types d'utilisations cliniques. Dans de nombreux cas, le PEG est employé comme matériau « furtif », parce qu'il est inerte vis-à-vis de la plupart des macromolécules biologiques, et en particulier des protéines¹⁰⁰. En effet, les premiers travaux de Merrill et al¹¹⁴ ont montré que l'adsorption préalable de PEG sur du verre peut prévenir l'adhérence protéique sur ces substrats. Bien que ce phénomène ne soit pas encore complètement compris, il semble que l'important « volume d'exclusion » des macromolécules de PEG hydratées et leur mobilité en soit la cause¹¹⁵. Depuis, le PEG est largement utilisé pour modifier différentes surfaces et limiter l'adhérence cellulaire (Figure 27)¹¹⁶.

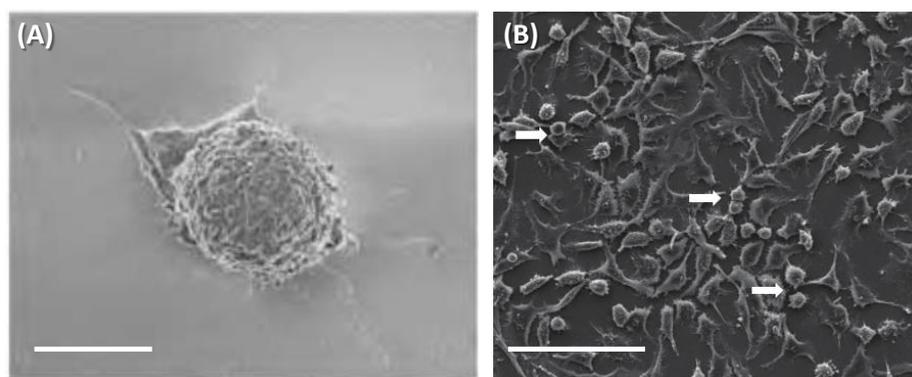


Figure 27 : cellules L929 cultivées pendant 24h sur (A) une surface recouverte de PEG¹¹⁷ et (B) une surface de verre¹¹⁸. La barre représente 5 μm pour la figure (A) et 100 μm pour la figure (B).

Pour être utilisé en tant qu'hydrogel, le PEG doit être réticulé. Pour cela, la photopolymérisation radicalaire (cf.§ 3.2.3) de monomères de PEG comportant des extrémités acrylate ou méthacrylate est largement employée⁷⁵. Les groupements acrylate peuvent aussi réagir avec des thiols libres (addition de type Michael). La réticulation du PEG en solution aqueuse peut également être réalisée sous rayons gamma ou

avec un faisceau d'électron ¹¹⁹. Des hydrogels physiques (cf. § 263.1) de PEG ont aussi été décrits. Leur réticulation est alors assurée par des interactions physiques entre des blocs hydrophobes de copolymères triblocs. Par exemple, des copolymères triblocs de PEG et Poly(oxyde de propylène) (copolymère PEG-*b*-PPO-*b*-PEG commercialisé par BASF sous le nom Pluronic[®], et des copolymères multiblocs PEG/Poly(L-lactique acide) PLA ont été développés ¹²⁰. Ils forment des gels physiques réversibles, qui peuvent passer à l'état gel à température physiologique, en formant une phase cristalline liquide ¹²¹.

En présence de cellules, les hydrogels de PEG sont des constituants passifs de l'environnement cellulaire car ils empêchent l'adsorption des protéines. C'est pourquoi ils sont utilisés pour l'encapsulation cellulaire ¹²²⁻¹²⁵. Toutefois, les hydrogels de PEG peuvent être modifiés pour devenir des matrices polyvalentes. Ainsi, par exemple, des séquences peptidiques γ ont été incorporées pour induire la dégradation ⁷⁵, ou modifier l'adhérence cellulaire ^{55,113,126}. Le PEG peut également être un médiateur dans l'immobilisation de la séquence RGD. En effet, le PEG de 3500 Da a une longueur caractéristique de 35 Å, distance qui rend le peptide RGD accessible aux cellules pour permettre leur adhérence ¹²⁷.

Les premiers hydrogels de PEG ont été principalement utilisés au sein de systèmes de délivrance contrôlée, et comme biomatériaux antiadhésifs. L'équipe de Graham a mis au point des hydrogels de PEG diisocyanate réticulés par l'hexanetriol pour la délivrance prolongée de la prostaglandine E2, la caféine et la morphine ¹²⁸. Des gels formés à partir de PEG branchés modifiés ont montré des propriétés antithrombogéniques. Enfin, des hydrogels de PEG méthacrylate ont été synthétisés pour l'encapsulation de levures ¹²⁹ et d'enzymes ¹³⁰.

6.2. A base de précurseurs naturels

Les polymères d'origine naturelle sont largement utilisés pour la synthèse d'hydrogels en ingénierie tissulaire. Ces polymères peuvent être des polysaccharides ou des protéines qui appartiennent à la matrice extracellulaire naturelle. Les hydrogels qu'ils forment possèdent des propriétés biofonctionnelles, comme la modulation du comportement cellulaire et la sécrétion de matrice extracellulaire. A l'exception de la fibroïne, les polymères présentés dans cette section présentent l'avantage d'être dégradés par des enzymes du corps humain. Les hydrogels ainsi préparés sont biorésorbables. Les polymères présentés sont ceux qui d'une part, font partie de la matrice extracellulaire des mammifères, et qui, d'autre part, sont les plus fréquemment utilisés en ingénierie. Certains ne répondent pas à ce critère, mais ils sont présentés car ils peuvent être utilisés pour renforcer des hydrogels synthétisés à partir de polymères de cette MEC.

6.2.1. Polysaccharides

6.2.1.1. Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique (AH) est un glycosaminoglycane non sulfaté composé d'unités D-N-acétylglucosamine et acide D-glucuronique alternées reliées par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$ et $\beta(1\rightarrow3)$. C'est un composant essentiel de la matrice extracellulaire de plusieurs tissus mous, comme la peau ou le cordon ombilical, le cartilage et l'humeur vitrée. Dans les tissus humains, il est présent sous forme de solutions très visqueuses de molécules de haut poids moléculaire (1-10 MDa) et donc difficiles à manipuler. Pour préparer des hydrogels, l'acide hyaluronique subit préalablement un traitement acide ou basique pour diminuer sa masse molaire et rendre les solutions moins visqueuses.

Dans le corps, l'AH est dégradé en oligosaccharides par la hyaluronidase, ainsi que par deux autres enzymes (la D-glucuronidase et la N-acétyl-hexominidase). Outre cette dégradation enzymatique, l'AH est sujet à une dégradation par des espèces réactives de l'oxygène, mécanisme intervenant notamment au cours de l'inflammation. Ainsi, l'AH subit une dégradation rapide, et il est rapidement éliminé du site d'administration.

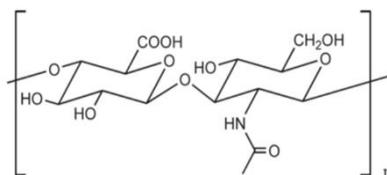


Figure 28 : structure chimique de l'acide hyaluronique

Toutefois, sa grande viscoélasticité (à concentration physiologique – 3,4 mg.mL⁻¹, sa viscosité est de 0,15 Pa.s. Son G' est de 3.10⁻³ Pa et son G'' est de 3 .10⁻² Pa ¹³¹) le rend particulièrement intéressant en ingénierie tissulaire. Il a été utilisé avec succès dans des applications telles que la cicatrisation ¹³², l'augmentation de tissus mous ¹³³ et la chirurgie ophtalmique ¹³⁴. Très hydrophile, il est également adapté pour limiter l'adhérence cellulaire, et notamment comme barrière contre les adhérences post-opératoires.

L'AH doit cependant être purifié avant son utilisation, pour enlever les impuretés et les endotoxines qui peuvent transmettre des maladies ou activer une réponse immunitaire.

6.2.1.2. Chitine et chitosane

La chitine est le principal composant contenu dans l'exosquelette d'invertébrés tels que les crustacés ou les insectes. Elle est aussi présente dans la paroi cellulaire de la plupart des champignons et dans certaines

algues. Structurellement, la chitine est un homopolymère de résidus *N*-acétyl-D-glucosamine (GlcNAc) liés par des liaisons $\beta(1\rightarrow4)$. La chitine peut être transformée en composés solubles, tels que le chitosane, la carboxyméthylchitine ou la glycochitine, qui sont tous biocompatibles, biodégradables, capables d'adsorption et très réactifs.

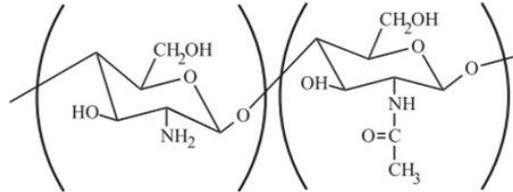


Figure 29 : structure chimique du chitosane

Parmi ces dérivés, le chitosane, polymère linéaire de D-glucosamine et de *N*-acétyl-D-glucosamine, est préparé par *N*-désacétylation partielle (de 50 à 90%) de la chitine. Le degré de désacétylation détermine la cristallinité qui est la plus importante (72%¹³⁵) pour la chitine (0% de désacétylation) et pour le chitosan (100% de désacétylation). Une cristallinité plus faible est obtenue pour des taux de désacétylation intermédiaires¹³⁶. Le chitosane présente des similarités avec les glycosaminoglycanes (GAG). *In vivo*, il est dégradé par le lysozyme¹³⁷, qui se trouve dans le cartilage, et la cinétique de dégradation est inversement proportionnelle au degré de cristallinité.

Ce polymère cationique est insoluble dans des solutions neutres ou basiques, mais la protonation des amines dans des solutions d'acide dilué (pH < 6,2) facilite sa dissolution. Une fois dissout, le chitosane peut gélifier lors de l'augmentation de pH ou par extrusion de la solution dans un non-solvant. Les dérivés du chitosane peuvent également être réticulés chimiquement par le glutaraldéhyde. Enfin, les hydrogels de chitosane peuvent être formés par des réseaux enchevêtrés, par des complexes, par irradiation UV, et par des variations thermiques¹⁰⁸.

Le chitosane est largement utilisé en raison de sa biocompatibilité pour les cellules humaines, la régénération des tissus abîmés, de son activité non-immunostimulatrice, de l'induction d'une hémostase immédiate, de sa capacité à capturer les radicaux libres et de son activité antimicrobienne. Ainsi, sa versatilité permet son utilisation dans des domaines tels que la délivrance contrôlée de médicaments, de gènes et de facteurs de croissance, la régénération tissulaire (rein artificiel¹³⁸, réparation du cartilage) mais aussi les pansements. À l'heure actuelle au moins 6 produits à base de chitosane ont reçu l'approbation de la FDA, pour des utilisations dans le cadre de l'hémostase et de la cicatrisation¹³⁹ (Clo-Sur P.A.DTM, HemCon[®] Bandage ChitoFlex[®], Syvek[®] Patch, ChitoSeal[®], Traumastat[®] et ExcelArrest[®]).

6.2.1.3. Alginate

L'alginate est un polysaccharide naturel extrait d'algues brunes. Ce copolymère à blocs est constitué d'unités d'acide β -D-mannuronique (M) et d'acide α -L-guluronique (G), dont les proportions relatives dépendent de la source de l'alginate. Les proportions M/G permettent de contrôler le pouvoir de gélification et la taille des pores des gels d'alginate. Sa masse molaire est de l'ordre de 1 MDa et varie en fonction de la source et du processus de production.

Il est très utilisé du fait de sa biocompatibilité, de sa faible toxicité, de son coût relativement faible et de son caractère mucoadhésif ²⁴. Sa gélification ionotropique est aisée en présence de cations divalents tels que le Ca^{2+} (Figure 30) ¹³⁷. Cependant, des changements dans l'environnement, de pH ou de concentration en sels, peuvent provoquer le relargage des ions calcium et la dégradation des gels. Ainsi, un gel d'alginate perd en moyenne 40% de sa résistance mécanique dans les 9 premiers jours *in vitro* ¹⁴⁰.

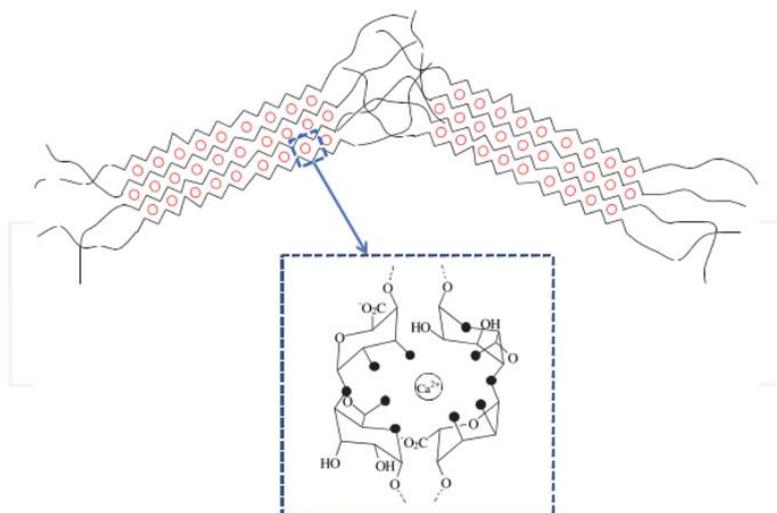


Figure 30 : Gélification ionotropique de l'alginate par interaction ionique entre les groupements carboxylate COO^- et les cations divalents métalliques (ici Ca^{2+}) ¹⁴¹.

L'alginate est utilisé pour la microencapsulation cellulaire ¹⁴², notamment pour le traitement du diabète (encapsulation d'îlots de Langerhans). Il a également été employé pour la libération contrôlée de principes actifs ⁶⁶ et pour l'ingénierie tissulaire du cartilage ¹⁴³. Enfin, il a été utilisé comme pansement suite à des brûlures ou des ulcères chroniques ¹⁴⁴.

6.2.2. Protéines

Les protéines utilisées pour former des hydrogels sont présentées ci-dessous par ordre d'importance décroissante.

6.2.2.1. Collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante dans le règne animal. Constitutif des tissus conjonctifs, tels que le cartilage, l'os, la peau et les tendons, il représente près de 30% des protéines du corps humain. Cette protéine, qui joue un rôle important de support cellulaire, est constituée de 3 chaînes polypeptidiques en hélice gauche qui s'assemblent pour former une triple hélice droite, appelée tropocollagène (Figure 31). Le motif répété Gly-X-Y est retrouvé tout le long de la chaîne polypeptidique, X et Y étant le plus souvent les résidus proline et hydroxyproline. Toutes les sortes de collagène partagent cette structure en triple hélice, mais différent par leur longueur et par le nombre de carbohydrates attachés aux segments en triple hélice. *In vivo*, des liaisons covalentes s'établissent entre les molécules de tropocollagène pour former des fibres et des réseaux ¹⁴⁵.

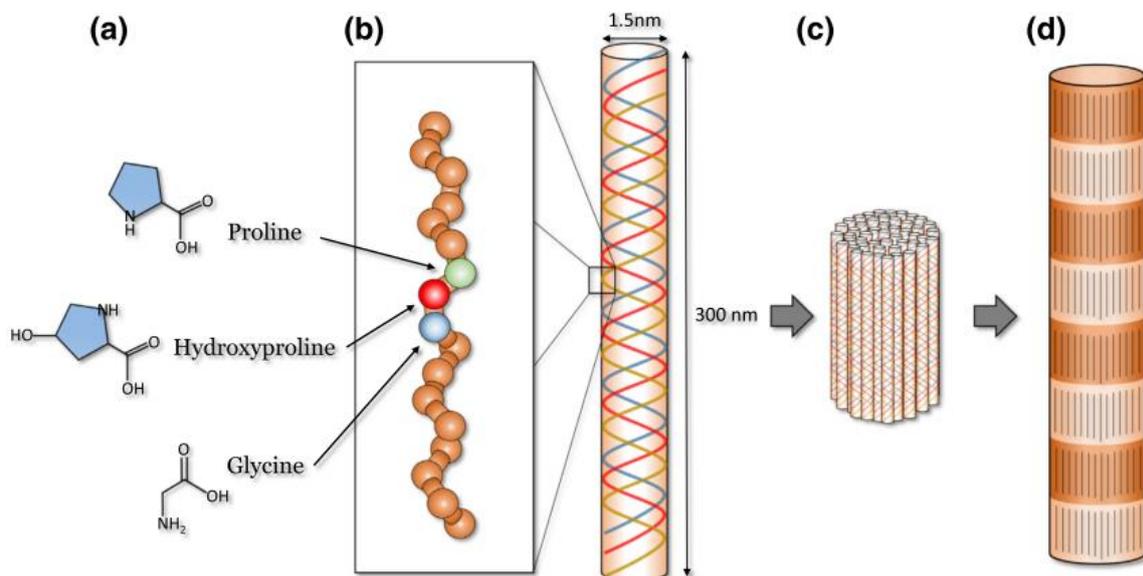


Figure 31 : représentation schématique de l'assemblage du collagène. (a) Chaîne individuelle de collagène, constituée de la séquence répétitive Gly-X-Y, où X est souvent la Proline et Y l'hydroxyproline. (b) Le collagène est formé de 3 chaînes polypeptidiques qui s'assemblent en hélice droite. (c) Les molécules de collagène s'assemblent en fibrilles. (d) Les fibres de collagène sont formées par assemblage latéral de fibrilles de collagène ¹².

Le collagène, protéine abondamment présente dans la matrice extracellulaire, est utilisé comme biomatériau car il est largement répandu dans la nature et peut être facilement modifié ¹⁴⁶. Les hydrogels physiques de collagène sont thermoréversibles. Cependant, leur dégradation rapide (inférieure à 12h ¹⁴⁷) et leur faible résistance mécanique (module de compression < 500 Pa ¹⁴⁸) limitent leur utilisation dans la plupart des applications en ingénierie tissulaire ¹⁴⁹. Ainsi, la réticulation chimique du collagène permet de mieux contrôler leur taux de dégradation et d'améliorer leurs propriétés mécaniques. Le glutaraldéhyde a été largement utilisé comme agent réticulant, mais sa toxicité potentielle compromet la biocompatibilité de tels hydrogels *in vivo*. Les carbodiimides sont utilisées comme alternative (la toxicité du couple EDC/NHS est assez

réduite car l'EDC est transformé en un dérivé non toxique de l'urée lors de la réaction de couplage^{34,150}). Ces hydrogels chimiques n'ont pas, cependant, des propriétés mécaniques suffisantes pour certaines applications. Ils sont également potentiellement immunogéniques (car il n'existe pas de source de collagène humain), ils se contractent fortement *in vivo* (jusqu'à 80% du volume initial en 24h^{80,151}) et coûtent relativement cher.

En ingénierie tissulaire, les gels de collagène ont été utilisés comme support de culture, car ils favorisent l'attachement cellulaire et peuvent être dégradés par voie enzymatique, mais aussi pour la reconstruction de différents organes/tissus comme les cordes vocales, la peau, le foie, les vaisseaux sanguins¹⁵² et l'intestin grêle.

6.2.2.2. Gélatine

La gélatine est produite par dénaturation du collagène de type I, principalement de porc et de bœuf, bien que, récemment, des sources alternatives aient été développées (peau et arêtes de poisson, méduse). Sa masse molaire, sa composition en acides aminés et son point isoélectrique dépendent de la source du collagène et de sa méthode de préparation¹⁵³. La triple hélice du collagène est alors dénaturée :

- par une hydrolyse acide, qui produit une gélatine dont le pI est de 9. La source de collagène (peau, tendon) est incubée dans une solution d'acide dilué pendant 10 à 48h, puis la solution est rincée et chauffée à 50°C pour dénaturer et solubiliser le collagène.
- par un procédé alcalin, qui produit une gélatine dont le pI est de 5. Le collagène bovin étant fortement réticulé, les os ou les peaux macèrent dans un bain de chaux pendant plusieurs semaines. Comme pour la dénaturation par hydrolyse acide, le chauffage permet d'achever la solubilisation du collagène.

La gélatine ainsi préparée conserve sa capacité à former des gels physiques par reconstitution partielle de triples hélices. Sa température de transition sol-gel se situant autour de 30°C, elle doit être réticulée chimiquement pour éviter la solubilisation à température physiologique. Divers groupements chimiques peuvent être greffés sur les acides aminés qui la composent, ce qui permet notamment sa réticulation par photopolymérisation radicalaire¹⁵⁴. Des hydrogels de gélatine ont ainsi été utilisés pour des applications telles que la régénération osseuse ou vasculaire, la régénération du tissu cardiaque ou celle des disques intervertébraux. Elle présente l'avantage, par rapport au collagène, de ne pas être immunogène, et d'être bien moins coûteuse¹³⁸.

6.2.2.3. Fibrine

La fibrine est un polymère biologique formé à partir du fibrinogène. Cette protéine joue un rôle crucial dans l'hémostase et la réparation tissulaire spontanée. Elle forme naturellement un réseau lors de la coagulation sanguine, suite au clivage du fibrinogène par la thrombine ¹⁵⁵.

Le fibrinogène est synthétisé par les cellules hépatiques. C'est une protéine circulante sous forme de dimère dont chaque monomère est composé de 3 chaînes polypeptidiques : une chaîne A α , une chaîne B β et une chaîne γ . Le fibrinogène forme une structure allongée de 46 nm, avec deux domaines extérieurs D, chacun connecté au domaine central E par un segment de superhélice. 29 ponts disulfure permettent de stabiliser l'ensemble de cette structure ¹⁵⁶.

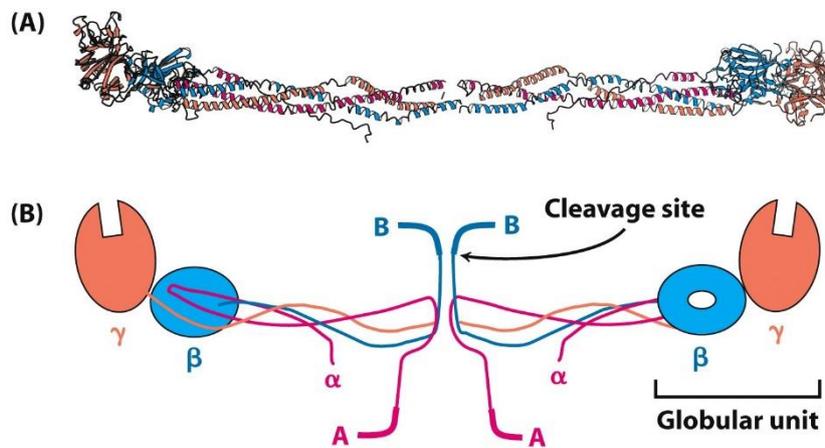


Figure 32 : (A) Structure tridimensionnelle du fibrinogène déterminée par diffraction des rayons X (B) structure schématique faisant apparaître les sites de clivage par la thrombine ¹⁵⁷.

La formation du réseau de fibrine se déroule dans le contexte de la coagulation sanguine. Chez les vertébrés, la coagulation inclut trois processus principaux:

- la contraction immédiate des vaisseaux sanguins à l'endroit de la blessure vasculaire,
- la formation d'un clou plaquettaire (les plaquettes sont des fragments de cellule dépourvus de noyaux et capables de s'agréger) et
- la formation d'un caillot de fibrine qui stabilise le clou plaquettaire.

Les événements de la coagulation sanguine se déroulent dans un ordre bien précis, et de manière hiérarchisée. Le contact avec l'air initie une cascade enzymatique. L'un des événements finaux de cette cascade est l'activation de la prothrombine en thrombine. Cette protéine extracellulaire de la famille des sérine-protéases reconnaît spécifiquement le fibrinopeptide A (FpA) et l'hydrolyse. Les molécules de

fibrinogène ayant subi ce premier clivage peuvent s'assembler en protofibrilles. Un changement conformationnel de la protéine intervient alors, ce qui permet une seconde hydrolyse par la thrombine et la formation d'un réseau tridimensionnel de fibrine. Cette étape est suivie par la réticulation chimique du réseau par la transglutaminase (FXIII). Ce réseau est temporaire, et est dégradé ensuite *in vivo* par la plasmine.

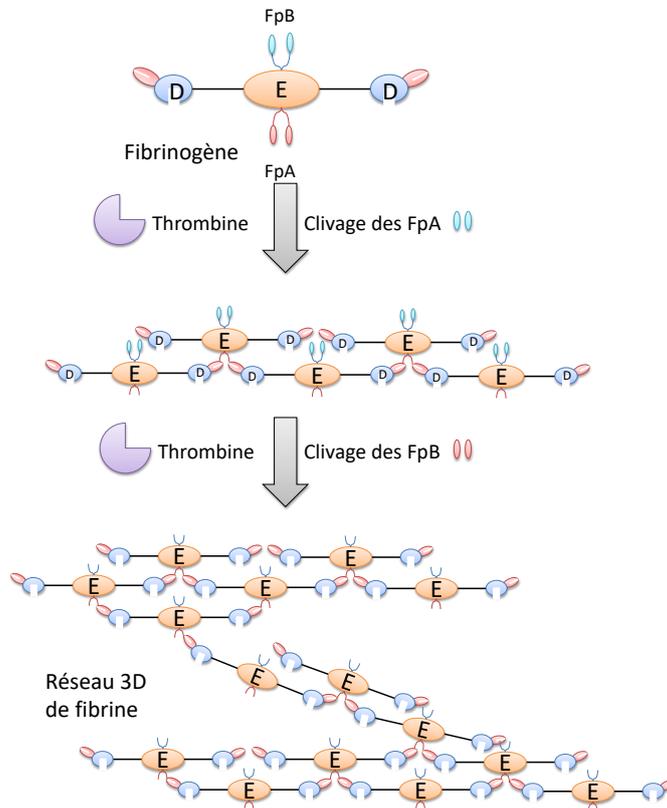


Figure 33 : représentation schématique de la formation du réseau de fibrine *in vivo* ¹⁵⁷.

L'une des caractéristiques du réseau de fibrine est le nombre élevé d'interactions possibles avec différents types cellulaires, et ceci par le biais de plusieurs types de récepteurs (de type intégrine ou non ¹⁵⁸). Le résultat de ces interactions est l'adhérence, l'étalement et la prolifération cellulaires (plaquettes, cellules endothéliales, cellules du système immunitaire, fibroblastes), mais aussi la phagocytose et le relargage de facteurs de la coagulation.

Le gel de fibrine joue aussi le rôle de réservoir de facteurs de croissance, tels que le FGF et l'IGF et sert de support provisoire de la matrice extracellulaire néoformée, en interagissant avec la fibronectine, la vitronectine et le collagène ¹⁵⁹. Il a également été noté que la fibrine induit l'angiogenèse, c'est-à-dire la formation de nouveaux vaisseaux sanguins ¹⁵⁸.

La fibrine n'est donc pas un composant de la matrice extracellulaire mature mais le constituant de base d'une matrice temporaire qui est ensuite remplacée par les composants habituels de la MEC. Puisque le fibrinogène est présent dans le sang, des gels de fibrine peuvent être obtenus de manière autologue à partir du sang des patients. La biocompatibilité de ces gels est excellente¹⁶⁰ et lors de leur dégradation aucun composé susceptible de générer une réaction inflammatoire n'est libéré. L'ensemble de ses propriétés font de la fibrine un candidat idéal pour l'ingénierie tissulaire¹⁶¹. Elle est d'ailleurs largement utilisée sous sa forme concentrée, appelée « colle de fibrine », pour faire des sutures au niveau de plaies, traiter des brûlures et cultiver ou fixer des substituts cutanés¹⁶².

Un défaut des hydrogels de fibrine est qu'à la concentration physiologique de 5 mg.mL⁻¹, ils présentent des propriétés mécaniques très faibles, comprises entre 13 et 100 Pa^{163,164}. De tels matériaux ne peuvent donc pas être manipulés et ne soutiennent pas leur propre poids. Aussi, différentes stratégies ont été développées pour pallier ce défaut, par exemple l'élaboration de supports à partir de solutions plus concentrées de fibrine ou la réticulation des gels de fibrine par la transglutaminase. La fibrine a aussi été associée avec différentes matrices telles que des polyuréthanes (PU), des polycaprolactones (PCL), du β -tricalciumphosphate ou du polyéthylène glycol¹⁵⁵. Pour des applications en régénération du cartilage, l'implantation *in vivo* de matrices de PCL et de PCL-PU donne lieu à une vascularisation importante et les hydrogels ont une résistance à la compression similaire à celle d'un cartilage sain^{165,166}. La modification du fibrinogène par des molécules de PEG de différentes tailles permet de multiplier les modules de stockage par un facteur compris entre 2 et 25 suivant le poids moléculaire du PEG (entre 4 et 20 kDa)¹⁶⁷. Les gels de fibrine deviennent alors manipulables et peuvent être utilisés à des fins de régénération tissulaire (osseuse notamment¹⁶⁸).

In vivo, les hydrogels de fibrine sont dégradés par hydrolyse enzymatique en quelques heures. Pour allonger le temps de dégradation des gels de fibrine, plusieurs stratégies ont été explorées. Des inhibiteurs de protéases (tels que l'aprotinine) sont ajoutés pour inhiber l'action des enzymes sécrétées par les cellules et responsables de la dégradation de la fibrine. Ainsi, des gels de fibrine traités à 10% sont stables pendant plus de 5 semaines, alors que des gels contrôles sont totalement dégradés en seulement 3 jours. Le greffage de motifs PEG photoréticulables sur la fibrine, permet d'augmenter la densité de réticulation et limite donc la diffusion des enzymes³⁴.

Les domaines de l'ingénierie tissulaire dans lesquels des hydrogels à base de fibrine ont été employés sont très nombreux : tissu adipeux, os, tissu cardiaque, cartilage, foie, tissu musculaire, tissu nerveux, tissu oculaire, peau et tissu vasculaire¹⁵⁵. Dans la majorité des cas, la fibrine est associée à une autre molécule au sein de l'hydrogel et sert de matrice d'encapsulation cellulaire.

L'enjeu étant de conserver au maximum les propriétés intrinsèques du réseau de fibrine, celui-ci doit être synthétisé à la concentration physiologique au sein d'un matériau, sans qu'aucune autre réaction chimique n'interfère avec sa formation.

6.2.2.4. Fibroïne

La fibroïne de soie est une protéine naturelle synthétisée par le ver à soie *Bombyx mori*. Sa structure primaire est constituée principalement de résidus glycine, alanine et sérine. En raison de l'abondance de ces répétitions, elle est riche en feuilletts β . Elle est composée de 3 chaînes : la chaîne lourde, la chaîne légère, et une glycoprotéine P25.

Des hydrogels de soie peuvent être préparés par gélification à basse température (cryogélation). Leurs caractéristiques dépendent de la concentration en protéine, du pH et de la température¹⁶⁹. La porosité et la taille moyenne des pores sont inversement proportionnelles à la concentration de la fibroïne de soie en solution. Ces hydrogels présentent une remarquable résistance ainsi qu'une capacité de gonflement exceptionnelle (jusqu'à 590% de prise en eau).

La fibroïne de soie a été utilisée pour la culture cellulaire, dans le domaine de la cicatrisation (notamment comme pansement lors des opérations chirurgicales), la libération contrôlée, l'immobilisation enzymatique, et comme matrice support en ingénierie tissulaire¹⁷⁰. Les hydrogels de fibroïne sont des candidats prometteurs pour les applications en régénération tissulaire en raison de leurs propriétés mécaniques (module de compression de 3 MPa pour un gel à 12% P/V), de leur biocompatibilité et de leur caractère pérenne (la fibroïne est, en effet, résistante à l'hydrolyse enzymatique et persiste jusqu'à 1 an *in vivo*). Bien que les premiers hydrogels de fibroïne aient provoqué d'importantes réactions inflammatoires dans les tissus adjacents au site d'implantation, des techniques modernes permettent de modifier la chimie de cette protéine et d'améliorer sa purification pour limiter cette réponse inflammatoire¹⁷¹.

6.3. Limitations de ces gels

Les protéines de la matrice extracellulaire sont donc largement utilisées pour former des hydrogels. Elles peuvent être couplées à des motifs biofonctionnels qui régulent l'adhérence, la prolifération, le phénotype cellulaires, et la production de matrice ainsi que l'activité enzymatique pour le remodelage et la régénération d'un tissu fonctionnel. De nombreux hydrogels de fibrine et de collagène ont été décrits pour des applications *in vitro* et *in vivo*^{146,158}. Ces deux protéines s'assemblent en réseaux fibrillaires par des liaisons faibles et covalentes. En dépit de ces nombreux avantages, ces hydrogels présentent plusieurs inconvénients sérieux¹⁷²⁻¹⁷⁴ :

- de faibles propriétés mécaniques ;

- un contrôle très limité de leur biodégradation ;
- une tendance à être fortement compactés lors du remodelage par les cellules.

Les polymères synthétiques sont disponibles commercialement, ils sont chimiquement bien définis et il n'existe quasiment aucune variation entre les lots. Les chaînes latérales permettent des modifications chimiques pour la réticulation. Les propriétés mécaniques, la morphologie et la chimie des hydrogels ainsi synthétisés peuvent être finement contrôlés. Néanmoins, leur biocompatibilité est souvent inférieure à celle des hydrogels à base de polymères naturels, et la dégradation est bien plus longue.

L'obtention de matériaux possédant des propriétés adéquates passe donc par la combinaison de plusieurs polymères. Plusieurs approches existent et sont résumées sur la Figure 34 : la synthèse de coréseaux, où deux polymères sont réticulés pour ne former qu'un seul réseau, et les réseaux interpénétrés de polymères (RIP), où deux réseaux distincts sont juxtaposés, sans liens covalents entre eux.

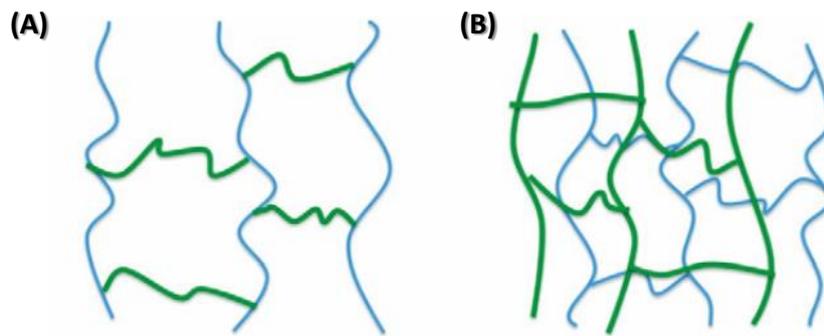


Figure 34 : stratégies pour améliorer les propriétés des hydrogels (A) coréseau (ou réseau greffé) constitué de 2 polymères liés de façon covalente ; (B) réseau interpénétré de polymères, sans liaison covalente entre les deux réseaux ¹⁷⁵.

La dernière partie de ce chapitre est consacrée à la description d'exemples choisis de ces deux types d'hydrogels. Ces matériaux contiennent tous au moins un polymère naturel constitutif de la matrice extracellulaire des mammifères et ont été synthétisés dans le but d'une utilisation en ingénierie tissulaire.

7. Hydrogels complexes

7.1. Coréseaux de protéines/peptides PEGylées

Seuls les réseaux formés de protéines modifiées par des chaînes de poly(éthylène glycol) (« PEGylées ») seront ici décrits. Cette approche, visant à ralentir la dégradation des réseaux de protéines et à modifier leurs propriétés mécaniques, a été abondamment décrite dans la littérature. Des molécules de

PEG de poids moléculaires variés et possédant différents groupements terminaux sont disponibles. Nous présenterons, dans un premier temps, des hydrogels combinant ce polymère à des protéines afin d'en modifier la structure et les propriétés. Dans un second temps, l'incorporation de motifs peptidiques au sein de gels de PEG sera décrite.

7.1.1. Hydrogels de fibrinogène PEGylé

La dégradation des réseaux de protéines peut être ralentie en protégeant le squelette protéique par greffage d'un polymère tel que le PEG. Cette modification permet, en effet, d'augmenter d'un facteur 10 la demi-vie plasmatique des peptiques thérapeutiques ou des principes actifs protéiques. De la même manière, la PEGylation a largement été utilisée. Son principe appliqué au fibrinogène est illustré par la Figure 35. On parle alors de gels hybrides : leur stabilité physique est améliorée et leur sensibilité à la dégradation enzymatique est réduite, mais la synthèse de ces hydrogels n'utilise pas de composés cytotoxiques (tels que les carbodiimides ou les *N*-hydroxysuccinimides^{147,150}) risquant d'affecter l'activité cellulaire.

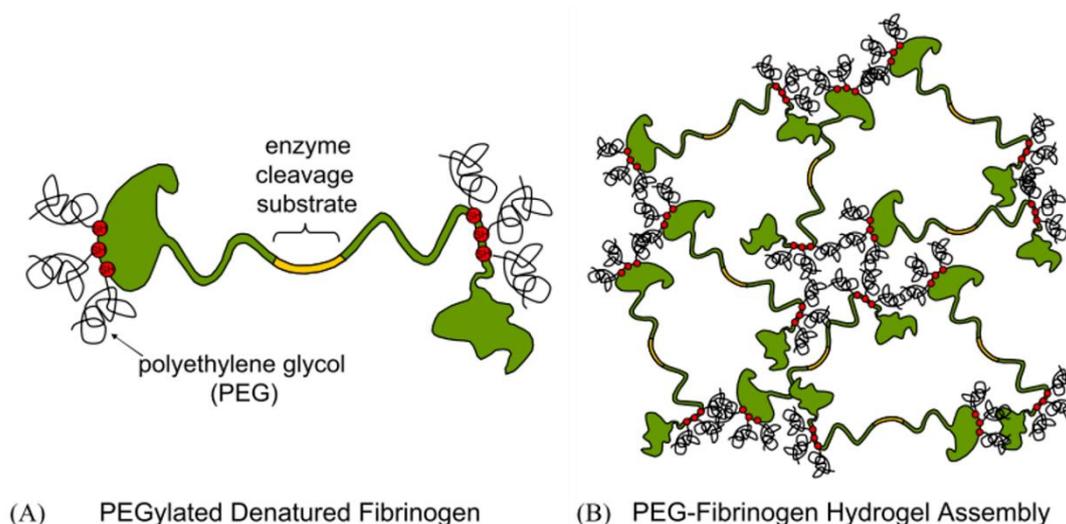


Figure 35 : illustration schématique de l'assemblage des hydrogels de fibrinogène PEGylé. Les fragments de fibrinogène PEGylés (A) contiennent des sites de clivages par des protéases (jaune) et de nombreux thioles non liés pour la liaison covalente de PEG fonctionnalisé *via* une addition de Michael (rouge). La formation de l'hydrogel de PEG-fibrinogène (B) est accomplie par photoamorçage du PEG-DA (diacrylate) qui n'a pas réagi. Cela permet la formation d'un réseau de fibrinogène PEGylé¹⁶⁷.

L'équipe de Seliktar a PEGylé du fibrinogène avec du PEG 6 ou 10 kDa, ensuite photopolymérisé en présence d'Irgacure 2959, pour former des hydrogels ayant des propriétés structurales modulables. La présence du fibrinogène assure une bonne adhérence cellulaire à l'hydrogel, tandis que le PEG permet de contrôler sa dégradation¹⁶⁷. En présence de collagénase ou de trypsine, un hydrogel fibrinogène-PEG 10 kDa n'est dégradé que de 20% en 150 min alors que les gels de fibrine sont complètement dégradés⁸². Cependant, le module de stockage de tels hydrogels reste très faible (de l'ordre de 70 Pa) et la proportion de PEG ne peut

pas être trop augmentée, sous peine de limiter l'adhérence cellulaire. Ces hydrogels favorisent la réparation osseuse, sans libération de facteurs ostéogéniques ¹⁶⁸, mais ils orientent aussi la différenciation de mésoangioblastes vers un phénotype de myocytes, pour le soin des dystrophies musculaires ¹⁷⁶. De plus, l'architecture de ce réseau peut être modifiée par l'incorporation de micelles de Pluronic[®] F127 qui modifient les propriétés viscoélastiques et le comportement cellulaire au sein du gel ¹⁷⁷.

7.1.2. Hydrogels d'albumine PEGylée

Des hydrogels de BSA PEGylée ont également été synthétisés ^{178,179}. L'albumine ne fait pas partie de la MEC mais cette protéine sérique, circulante, est l'une des protéines les plus étudiées en biochimie. L'albumine humaine, de poids moléculaire de 66,5 kDa, est la protéine la plus présente dans le plasma sanguin. Elle contient beaucoup d'hélices (70%) et de nombreuses cystéines, la plupart formant des ponts disulfure qui contribuent à sa structure tridimensionnelle globulaire (17) ¹⁸⁰. Elle possède une affinité importante pour différentes molécules, en particulier pour les acides gras. Une molécule d'albumine peut lier jusqu'à 6 acides gras (Figure 36). Elle est également capable de transporter des principes actifs variés, qu'elle lie (par des liaisons faibles) au niveau de deux domaines d'affinité principaux ¹⁷⁹ mais aussi de façon covalente par réaction avec un groupement thiol libre. L'albumine peut gélifier d'elle-même par dénaturation liée au pH et à la température ¹⁸¹, ou par réduction de ses ponts disulfure ^{182,183}. Cependant, ces gels présentent une stabilité très limitée et des propriétés viscoélastiques faibles ($G' = 60$ Pa). Des hydrogels synthétisés à partir d'albumine PEGylée ont donc été développés : leur application principale est la délivrance contrôlée de principes actifs retenus dans le gel d'albumine.

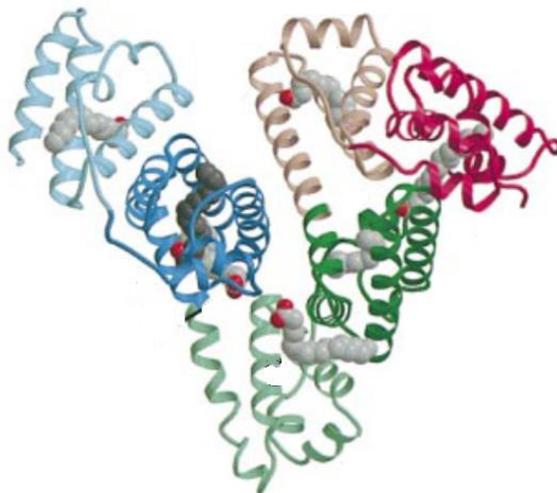


Figure 36 : structure tridimensionnelle de l'albumine humaine, ici complexée avec des acides gras (représentés en gris) ¹⁸⁴.

Ces gels peuvent être synthétisés avec des PEG de différentes masses comprises entre 4,6 et 20 kDa, afin de modifier l'affinité de l'albumine pour les principes actifs retenus dans les réseaux ainsi formés¹⁸⁵. Le taux de relargage peut être contrôlé par la composition de l'hydrogel¹⁸⁶. Ces gels étant photopolymérisables, ils peuvent être formés *in situ* pour permettre la délivrance locale d'agents thérapeutiques. L'incorporation de fibrinogène PEGylé à un gel de BSA-PEG permet d'améliorer la biocompatibilité et la régénération tissulaire⁸³. Cependant, ces réseaux hybrides ont un module de stockage très faible (30 Pa) et se dégradent intégralement en moins de 7h en présence d'une solution de collagénase⁸¹. Leur biocompatibilité est néanmoins très bonne et ils pourraient être utilisés pour le relargage de principes actifs sur des durées prolongées. De plus, l'albumine peut être produite de façon recombinante dans la levure *Pichia Pastoris*, en grande quantité et purifiée à un grade pharmaceutique¹⁸². Cela permet de s'affranchir des problèmes de pureté et d'immunogénicité rencontrés avec les albumines provenant d'autres sources.

7.1.3. Hydrogels de PEG contenant des segments peptidiques

D'autres approches ont été explorées, notamment par l'équipe de Hubbell, pour la synthèse d'hydrogels hybrides multifonctionnels, s'affranchissant des protéines entières. Des segments sensibles à certaines métalloprotéases sont greffés sur des macromères de PEG. La réticulation se fait par voie radicalaire, et les hydrogels peuvent alors être dégradés par une protéase spécifique^{74,75,187}. Des peptides incorporant la séquence RGD peuvent également être introduits au sein du réseau⁷⁴. Les gels ainsi obtenus sont non seulement sensibles aux protéases, mais ils servent également de support pour l'adhérence et l'étalement cellulaires. La conjugaison de ces deux éléments est cruciale pour la colonisation par les cellules. Ces gels peuvent être utilisés pour combler d'importants défauts osseux et ils favoriseraient la formation de tissu osseux fonctionnel⁷⁴.

Dans d'autres travaux, des molécules de PEG sont préalablement fonctionnalisées par un segment contenant un site de coupure pour une MMP ou un site RGD. Ceux-ci peuvent réagir par voie enzymatique pour former des hydrogels hybrides. La transglutaminase réticule ensuite ces deux segments protéiques ensemble en présence de Ca^{2+} (Figure 37)^{188,189}. Des facteurs de croissance, tels que le VEGF, peuvent également être incorporés à ce réseau, sur le même principe de réticulation catalysée par la transglutaminase¹⁸⁸.

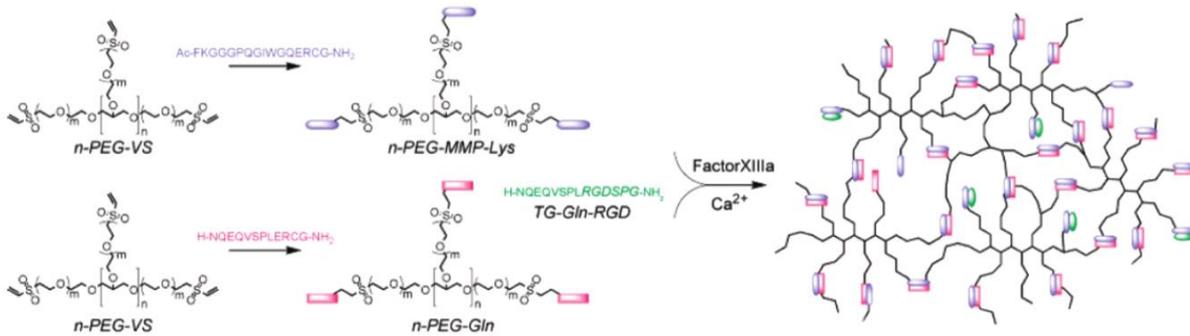


Figure 37 : formation d'un réseau de PEG multifonctionnel catalysée par la transglutaminase. La transglutaminase (Facteur XIIIa) est utilisée pour réticuler deux conjugués de PEG multi-bras liés à des peptides : n-PEG-MMP-Lys et n-PEG-Gln (avec ici, $n=8$) est combiné avec un peptide d'adhérence cellulaire TG-Gln-RGD, pour former un hydrogel hybride multifonctionnel ¹⁸⁸.

Lors de culture cellulaire tridimensionnelle, la présence de motifs RGD est essentielle pour l'attachement cellulaire et leur étalement au sein du gel peut être corrélé à la concentration en RGD ^{188,189}. Les cellules expriment des quantités importantes de MMP2, ce qui indique qu'elles remodelent leur microenvironnement extracellulaire ¹⁸⁹. Elles créent ainsi un espace suffisant pour leur prolifération. Le relargage du VEGF lors du clivage protéolytique du gel est associé à une augmentation de l'angiogenèse ¹⁸⁸.

Des gels de PEG contenant également des segments sensibles aux métalloprotéases et des sites RGD peuvent aussi être réticulés par une addition de Michael, pour l'encapsulation de cellules endothéliales et de fibroblastes ¹⁹⁰. Ce type de gel permet une bonne vascularisation, liée à la dégradation partielle du réseau par les MMP sécrétées par les cellules. Cela permet d'envisager une application de ce matériau injectable pour le traitement des maladies ischémiques.

Suivant une stratégie similaire, l'incorporation de peptides RGD et VEGF au sein d'hydrogels de PEG maléimide (Figure 38) permet d'obtenir une matrice pour l'encapsulation de cellules pancréatiques. Ces matériaux sont destinés au traitement du diabète de type 1 ¹⁹¹. La dégradation du réseau permet le relargage du VEGF, qui a pour conséquence une meilleure vascularisation et, sur le plus long terme, une bonne intégration des îlots cellulaires dans le pancréas.

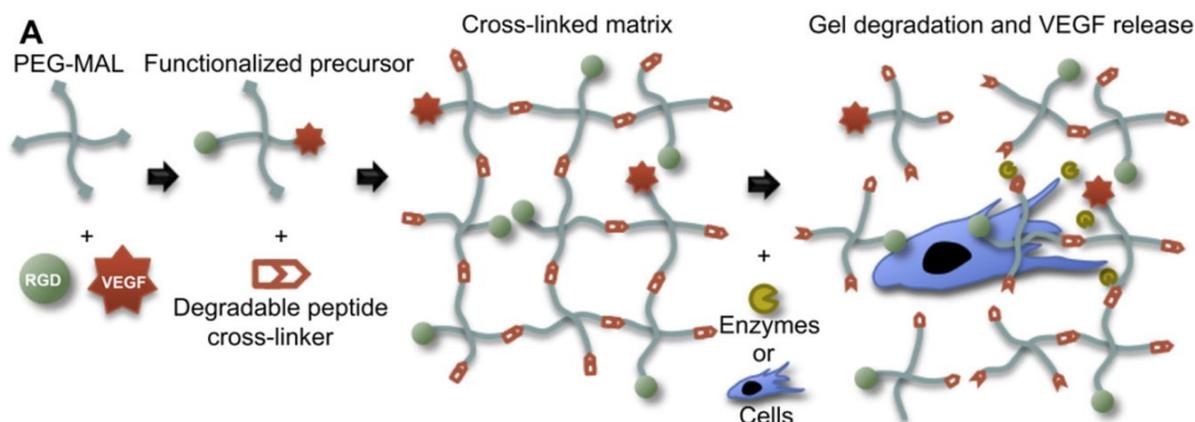


Figure 38 : le macromère de PEG-maléimide à 4 bras est fonctionnalisé par une réaction de Michael avec un peptide RGD et le facteur de croissance VEGF. Le gel est formé en présence d'un peptide portant la séquence CGCRDVPMSMRGGDRCGC. Les protéases exprimées par les cellules dégradent l'hydrogel en clivant le réticulant peptidique, et en relarguant le VEGF ¹⁹¹.

Pour la régénération d'importants défauts osseux, le RGD a été remplacé par de l'hexapeptide GFOGER dans un gel de PEG-maléimide ¹⁹². Cette séquence, retrouvée dans le collagène de type I, permet une interaction avec l'intégrine $\alpha 2\beta 1$, signal crucial pour la différenciation entre phénotype ostéogénique et minéralisation. Le VEGF est alors remplacé par de la BMP2. Cet hydrogel possède une activité ostéogénique intrinsèque, et permet la réparation de défauts osseux de taille critique, avec une efficacité supérieure aux mousses de collagène habituellement utilisées.

Bien que ces hydrogels avec des architectures de coréseaux (ou réseau de copolymères) présentent d'incontestables qualités, et peuvent être utilisés dans de nombreux domaines, ils présentent plusieurs inconvénients. Les réseaux de macromolécules naturelles présents *in vivo*, que ce soit le réseau de collagène, d'acide hyaluronique ou de fibrine, sont en effet, dénaturés puisque modifiés chimiquement. Ils sont également produits à très petite échelle, et le coût de production des peptides synthétiques et des protéines recombinantes demeure très élevé.

7.2. Réseaux Interpénétrés de Polymères (RIPs)

Une voie élégante qui permet d'associer des macromolécules de natures différentes est la synthèse de réseaux interpénétrés de polymères (RIPs). Ils sont définis selon Sperling comme la combinaison de deux, ou plus, réseaux de polymères synthétisés l'un en présence de l'autre ¹⁹³. Les réseaux sont partiellement enchevêtrés, mais sans lien covalent entre eux ¹⁹⁴. L'enchevêtrement de deux polymères réticulés au sein d'un RIP conduit à une « miscibilité forcée » comparée à celle des mélanges de polymères, habituellement incompatibles. Une conséquence de la réticulation de chaque composant du RIP est que cette architecture est dimensionnellement stable dans le temps, même sous contrainte ou action de la température. Ces

associations de polymères sont, en général, réalisées dans le but d'élaborer de nouveaux matériaux associant les propriétés recherchées de chacun des partenaires tout en minimisant leurs défauts.

Les RIPs peuvent être préparés par deux méthodes : la synthèse simultanée consiste à mélanger les précurseurs des deux réseaux dans une solution homogène et les deux réseaux sont formés, simultanément ou l'un après l'autre, par des mécanismes de polymérisation/réticulation différents et indépendants (Figure 39A). La synthèse séquentielle est réalisée en deux étapes : un premier réseau est synthétisé puis il est gonflé par une solution contenant les précurseurs du second réseau (Figure 39B). La synthèse du second réseau est ensuite déclenchée au sein du premier réseau.

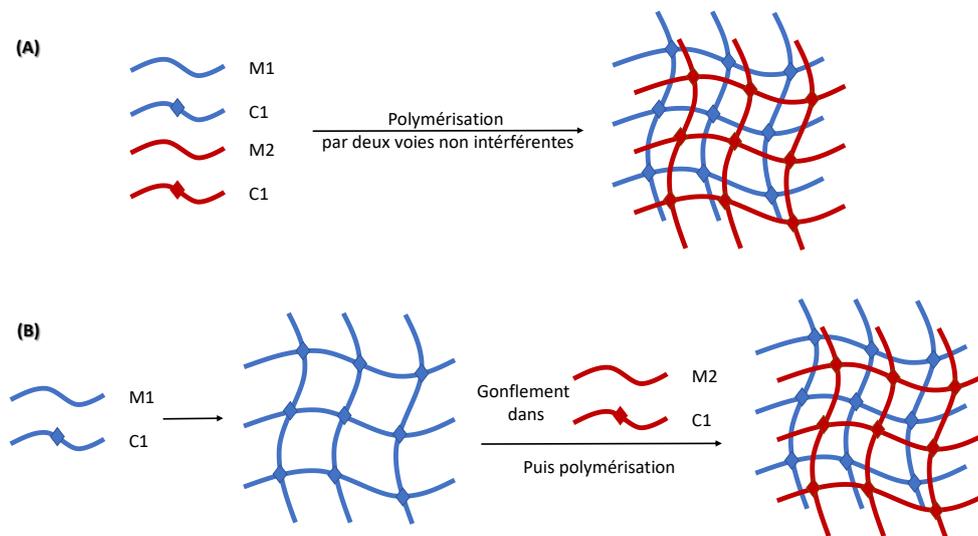


Figure 39 : représentation schématique de la synthèse (A) simultanée ; (B) séquentielle des RIPs ¹⁹⁵.

Lorsque l'un des polymères est linéaire mais emprisonné dans le réseau de l'autre polymère, l'architecture est alors qualifiée de réseau semi-interpénétré de polymères (semi-RIP). Il est parfois possible de réaliser ensuite la réticulation sélective de ce polymère linéaire pour obtenir un RIP ¹⁹⁵.

Des matériaux présentant une architecture de réseaux interpénétrés de polymères ont été proposés comme alternative avantageuse, en utilisant une ou plusieurs macromolécules naturelles intactes pour former des hydrogels. Le coût de fabrication des hydrogels est alors bien inférieur et la structure native de la protéine est préservée. Des taux de dégradation plus élevés ainsi qu'une meilleure bioactivité sont obtenus.

Un nombre important d'hydrogels constitués, soit d'une combinaison de polymères synthétiques, soit d'un réseau de polymère synthétique associé à un réseau de macromolécules d'origine biologique, ou encore de deux réseaux de macromolécules biologiques, ont été décrits. Cependant, nous ne présenterons ici que les hydrogels contenant au moins un partenaire d'origine biologique provenant des mammifères. En

effet, les matériaux étudiés au cours de cette thèse ont été synthétisés à partir de tels précurseurs. Les matériaux répondant à ce critère sont, à notre connaissance, élaborés à partir de trois macromolécules seulement : l'acide hyaluronique, le collagène (ainsi que la gélatine) et la fibrine. Pour chacune de ces macromolécules, les semi-RIPs et les RIPs décrits dans la littérature, ainsi que leurs propriétés, seront brièvement présentés.

7.2.1. Matériaux RIPs incluant l'acide hyaluronique

De l'acide hyaluronique a été immobilisé dans un réseau de poly(éthylène glycol) synthétisé par photopolymérisation (Irgacure 2959 à 0,05%) pour former un semi-RIP¹⁹⁶. Les modules de compression de ces matériaux sont similaires à ceux d'un réseau simple de PEG et de l'ordre de 200 kPa. Des chondrocytes peuvent être encapsulés dans ces hydrogels, avec une viabilité supérieure à 80% jusqu'à 28 jours. Ces chondrocytes sécrètent d'importantes quantités de collagène et de glycosaminoglycane, mais remodelent peu le gel. L'acide hyaluronique n'étant pas réticulé, 90% de la masse introduite est relarguée en 4 semaines dans du PBS. Ce type de matériau, capable de supporter d'importantes compressions, pourrait donc être utilisé pour la régénération du cartilage humain qui doit être capable de supporter des forces comprises entre 100 et 2000 kPa. Webb *et al.* ont également élaboré et caractérisé des semi-RIPs à base d'acide hyaluronique et de PEG afin de comprendre les facteurs qui influencent la croissance, l'étalement et la migration de fibroblastes^{197,198}. Ainsi, une proportion trop élevée d'acide hyaluronique, bien qu'elle permette d'augmenter le taux de gonflement des gels (de l'ordre de 30) et leur module élastique (jusqu'à 45 kPa), ne permet pas un étalement optimal des cellules puisqu'elles s'accumulent dans certaines zones, formant des défauts dans la structure du gel (Figure 40). Ces zones sont alors préférentiellement attaquées par les enzymes (en particulier la hyaluronidase) et ne permettent plus l'adhérence cellulaire¹⁹⁷.

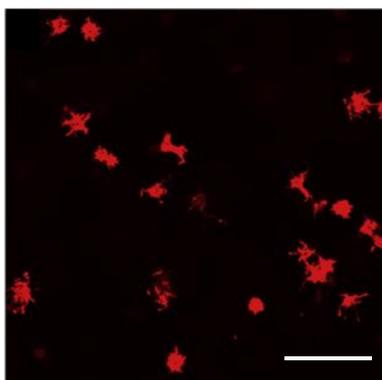


Figure 40 : images de microscopie confocale de fibroblastes de derme humain (marquage de l'actine) encapsulés au sein du semi-RIP PEG (10%)/AH (0,60%) à 200 μm de profondeur après 7 jours de culture¹⁹⁹. La barre correspond à 100 μm.

Pour limiter les problèmes liés à la diffusion de l'acide hyaluronique linéaire, ce dernier peut également être réticulé, ce qui conduit alors à la formation de RIPs. Pour être réticulé, l'AH doit préalablement être fonctionnalisé par des groupes méthacrylate^{79,150,200} ou des groupements pouvant être réticulés par des réactions de chimie click (cf.§ 3.2.1)^{80,201,202}.

L'acide hyaluronique modifié par des groupements méthacrylate est copolymérisé avec du PEG-diacrylate pour des applications en régénération du cartilage⁸⁸. Le semi-RIP PEG (5%)/AH a un module mécanique de 25000 Pa, soit 10 fois plus élevé que ceux des réseaux simples associés. Ces hydrogels peuvent être dégradés par la hyaluronidase, incorporée au moment de la synthèse. La dégradation se traduit par une importante chute des propriétés mécaniques (plus de 99%) dans les minutes qui suivent la fin de la polymérisation ce qui prouve que ces gels sont complètement dégradables. Il est possible d'incorporer un peptide RGD au sein de ces gels, pour améliorer l'étalement cellulaire. Sans cela, de la même manière que pour les semi RIP, les cellules ne parviennent pas à s'étaler correctement dans l'ensemble de la matrice¹⁹⁷.

L'AH préalablement modifié avec des groupements méthacrylate a été associé à un gel physique de collagène conduisant à la formation d'un RIP AH / collagène⁷⁹. Pour cela, le mélange des précurseurs est placé à 37°C afin de permettre aux triples hélices du collagène de s'associer pour former un gel. Dans un second temps, le gel est exposé aux UV pour polymériser des fonctions méthacrylate de l'AH, en présence d'Irgacure 2959. Ce mode de synthèse permet, *via* l'utilisation de masques, de définir des zones dans lesquelles la densité de réticulation varie. La microarchitecture ainsi obtenue permet de reproduire les différences de propriétés structurales et mécaniques qui existent dans les tissus complexes natifs. Le réseau fibrillaire peut toujours être attaqué par des collagénases ou la hyaluronidase.

Les réactions de chimie click ont également été utilisées pour produire des RIPs à base d'AH uniquement. La combinaison de 4 types d'acide hyaluronique fonctionnalisé avec des groupements réactifs différents (aldéhyde, thiol, hydrazide et 2-dithiopyridyl - Figure 41) qui permettent de réaliser les réactions dites orthogonales et hautement sélectives²⁰². L'architecture RIP permet d'obtenir des propriétés mécaniques élevées (5000 Pa) par rapport à celles des réseaux simples équivalents (2000-2500 Pa), tout en conservant une viabilité des cellules à leur surface supérieure à 95%. Ces gels présentent la particularité d'être extrêmement stables dans le temps (5 jours), même en présence de doses élevées d'hyaluronidase (8000 U.mL⁻¹).

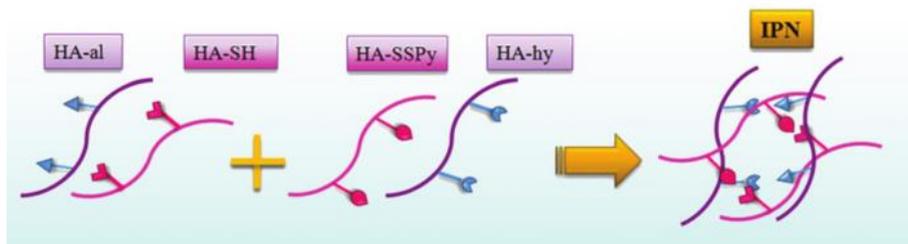


Figure 41 : représentation schématique du RIP formé à partir de 4 acides hyaluroniques fonctionnalisés.

Les gels à base d'acide hyaluronique sont des supports intéressants et versatiles, pouvant être remodelés en présence d'enzymes. Le coût élevé de cette macromolécule demeure, toutefois, un frein à son utilisation.

7.2.2. Matériaux RIPs incluant le collagène ou la gélatine

À notre connaissance, le seul semi-RIP à base de collagène associe une éponge de collagène (Suprasorb® C) à un réseau de poly(N-isopropyl acrylamide-co-diéthylène glycol diacrylate) synthétisé par voie radicalaire²⁰³. En raison de son architecture poreuse, cet hydrogel peut servir de réservoir de molécules thérapeutiques. Par rapport à une simple éponge de collagène, la dégradation en présence de collagénase est significativement ralentie puisque les semi-RIPs contenant des quantités de collagène comprises entre 28 et 72% gardent leur intégrité structurale pendant 48h (contre 6h pour l'éponge) avec une perte de 50% de leurs propriétés mécaniques. Le relargage de la Norfloxacin (antibiotique appartenant à la famille des fluoroquinones) peut être maintenu pendant 48h, ce qu'il est impossible d'obtenir avec un hydrogel de collagène pur.

Il existe plusieurs exemples de RIPs à base de collagène ou de gélatine. Des RIPs associant du poly(éthylène glycol) diméthacrylate au collagène de type I^{204,205} ont été développés (noter que ce n'est pas un « vrai » RIP puisque le collagène est alors greffé au réseau de PEG). Ces semi-RIPs contiennent 10% de PEG et entre 0,9 et 1,8% de collagène. La polymérisation est amorcée par le Darocur 1173 et elle peut conduire à des hydrogels avec des formes complexes par stéréolithographie. Leurs modules de compression sont de 10 à 15 kPa et ils pourraient être utilisés pour le remplacement du ménisque²⁰⁴. Des RIPs PEG/collagène ont également été élaborés via une synthèse séquentielle²⁰⁵. Pour cela, dans un premier temps, le gel de collagène est formé par incubation à 37°C. Ce matériau est ensuite gonflé dans une solution de PEG diacrylate (PEG-DA) contenant également le photoamorceur (Irgacure 2959 à 0,4%). L'hydrogel ainsi gonflé est ensuite exposé aux UV. Des précurseurs PEG-DA de différentes masses molaires ont été utilisés : plus leur masse molaire est élevée, plus les modules de stockage du RIP résultant diminuent (16,9 kPa pour un RIP incorporant du PEGDA de 3,4kDa contre seulement 7,8 kPa pour un RIP avec du PEGDA de 10 kDa).

Ces hydrogels sont poreux, et les fibres de collagène ont un diamètre moyen de 60 nm : la formation du réseau de PEG ne les modifie donc pas leur formation. Elles fournissent des points d'ancrage pour les cellules, qui adoptent une morphologie allongée. Ces matériaux présentent l'avantage notable de résister à la contraction exercée par les cellules, qui intervient en général quelques jours après l'encapsulation des cellules dans un gel de collagène et peut alors atteindre jusqu'à 60 % de réduction du diamètre.

Le collagène a également été associé à un gel d'alginate afin de comprendre l'impact de la rigidité des hydrogels sur le comportement de fibroblastes²⁰⁶. Pour cela, les solutions de collagène et d'alginate (et éventuellement de cellules) sont injectées avec une seringue à 2 corps dans une solution de sulfate de calcium. La concentration en calcium nécessaire à la gélification de l'alginate n'a pas d'effet sur la taille des pores mais modifie fortement le module de stockage (de 40 Pa avec 2,5 mM de Ca^{2+} à 1000 Pa pour 10 mM). Les hydrogels les plus rigides (1200 Pa) limitent considérablement l'étalement des cellules bien qu'elles demeurent viables. Au-delà de la compréhension des phénomènes régulant la réaction des cellules à leur microenvironnement, de tels gels pourraient être utilisés pour la cicatrisation.

Des RIPs alginate/gélatine ont été obtenus en réticulant la gélatine avec de la transglutaminase²⁰⁷. La proportion d'alginate incorporé permet de moduler l'élasticité des RIPs. Ainsi, ces matériaux peuvent être synthétisés sous forme de fibres, dont la résistance est suffisante pour les tisser en une « tresse » de 20 cm de long. Des applications telles que les sutures sont donc envisagées. Ces hydrogels sont dégradables par voie enzymatique, mais aussi en échangeant les ions Ca^{2+} contre des ions Na^+ dans le tampon. Plus la concentration en gélatine est importante, plus la dégradation en présence de papaïne ($0,05 \text{ mg.mL}^{-1}$) est ralentie. En effet, un gel d'alginate est complètement dégradé en 3h alors qu'un RIP contenant 10% de gélatine n'est dégradé qu'au bout de 9h. La viabilité de fibroblastes L929 sur ces matériaux est supérieure à 85% après 5 jours. Par ailleurs, la réticulation chimique de la gélatine au sein d'un RIP alginate/gélatine²⁰⁸ peut aussi être réalisée avec du glutaraldéhyde, le gel d'alginate se formant toujours au contact d'une solution de Ca^{2+} . L'ensemencement de cellules souches du tissu adipeux sur de tels hydrogels oriente leur différenciation vers un phénotype chondrogénique. Le potentiel de ces gels pour la régénération du cartilage est donc important.

La fibroïne de soie a aussi été associée à un gel de gélatine au sein d'une architecture RIP⁷⁷. La gélatine est préalablement fonctionnalisée avec des fonctions méthacrylate. L'exposition aux UV du mélange gélatine/fibroïne de soie permet de polymériser ces fonctions, puis ces gels sont traités par une solution de méthanol à 70% pour induire des changements conformationnels aboutissant à la gélification de la fibroïne. La fibroïne augmente nettement les propriétés mécaniques (de 2,5 kPa pour un gel de gélatine à 6% et 70 kPa pour un RIP contenant 2% de fibroïne) et limite la sensibilité du matériau à la dégradation par la collagénase (dégradation totale du gel de gélatine en 48h et dégradation des RIPs de seulement 20% en 72

h). Ces matériaux pourraient avoir différentes applications en ingénierie tissulaire, puisque leurs propriétés structurales sont modifiées par les quantités de fibroïne introduite, et parce que l'utilisation d'un masque lors de la photopolymérisation permet de dessiner des motifs dans le gel, ces zones pouvant alors être colonisées par les cellules (Figure 42).

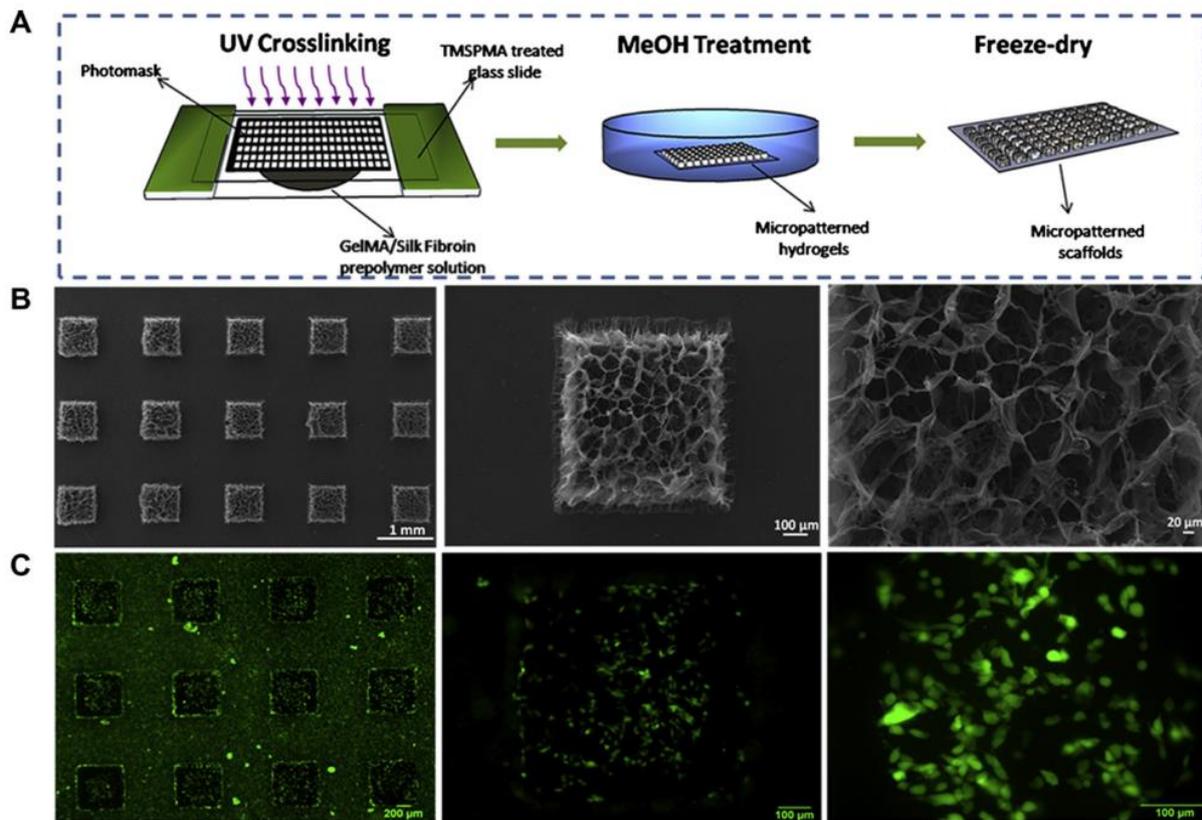


Figure 42 : (A) processus de fabrication de matériaux avec des géométries définies par photolithographie et lyophilisation. (B) Images en microscopie électronique à balayage des zones réticulées dans un RIP Gélatine/Fibroïne. (C) Images de microscopie à épifluorescence (2x,10x et 20x) de fibroblastes NIH-3T3 après 1 jour de culture dans le matériau (C) ⁷⁷.

Enfin, des RIPs gélatine/PEG ont été synthétisés via des réactions de chimie click (cf.§ 3.2.1) avec de la gélatine fonctionnalisée par un groupement méthacrylamide, et du PEG avec des alkynes aux extrémités de chaîne ²⁰⁹. Ainsi, le PEG réticule par couplage des thiol-yne, alors que la gélatine réticule par le couplage des thiol-ènes, à 70°C. Ces réactions sont spécifiques et permettent d'obtenir un réseau hautement poreux et résistant à la compression (module élastique de 320 kPa pour un gel contenant 20% de PEG et 20% de Gélatine). L'adhérence cellulaire en surface est d'autant meilleure que le contenu en gélatine est élevé. Ce matériau peut être gélifié au sein d'un système microfluidique, pour en faire des canaux de tailles différentes.

7.2.3. Matériaux RIPs incluant la fibrine

La fibrine a été incorporée au sein de RIPs pour diverses applications. Par contre, à notre connaissance, aucun réseau semi-RIP n'a été élaboré à partir de cette macromolécule.

Le premier RIP à base de fibrine a été décrit en 2006 par Rowe et Stegemann. Ils préparent alors des hydrogels en mélangeant du collagène bovin à une solution de fibrinogène¹⁵¹. La solution est amenée à un pH neutre et la thrombine est ajoutée. La combinaison de ces deux macromolécules permet de multiplier le module élastique des hydrogels par un facteur 2 ou 3 par rapport à ceux des réseaux simples associés. Les conditions de synthèse étant douces, elles conviennent bien à l'encapsulation cellulaire. Ainsi, des cellules musculaires lisses adoptent, au sein de ces hydrogels, une morphologie étalée avec un grand nombre de pseudopodes. Cependant, une importante contraction de la matrice est observée dès le 1^{er} jour après l'encapsulation (le degré de compaction du gel est de 25% par rapport au volume initial). Ce phénomène, observé à la fois pour les gels de collagène et de fibrine, est retrouvé dans les RIPs, ce qui induit une diminution du nombre de cellules au bout de 7 jours. L'application visée est l'ingénierie tissulaire cardiaque.

Shikanov *et al.* ont ensuite développé des hydrogels à architecture RIP au sein desquels la fibrine est associée à un gel d'alginate, pour l'encapsulation de cellules ovariennes^{210,211}. Ces structures, synthétisées sous forme de goutte, miment les follicules ovariens. Le module de stockage des hydrogels acellularisés est assez faible (300 Pa) et le gel de fibrine est dégradé progressivement (dès 24h) par les protéases (plasmine et métalloprotéases) sécrétées par les cellules encapsulées. L'alginate, dont la dégradation est bien plus lente, assure le soutien physique, et les follicules maintiennent leur intégrité structurale pendant plusieurs semaines dans des conditions de culture classiques (37°C, 5% CO₂, milieu de culture : α -MEM)²¹⁰. La sécrétion hormonale générée par ces structures est similaire à ce qui peut être mesuré *in vivo*. Récemment, cette même équipe a montré que ce type d'hydrogel peut être utilisé pour la détection à grande échelle de l'impact de substances médicamenteuses sur le comportement ovarien, donc la potentielle reprotoxicité, sans avoir recours à l'animal²¹¹.

Des RIPs associant la fibrine à l'acide hyaluronique modifié chimiquement par des groupements thiol et dithiopyridyl ont également été décrits. Des ponts disulfure créés entre les macromolécules d'acide hyaluronique assurent sa réticulation, alors que le fibrinogène est clivé par la thrombine⁸⁰. Les modules de stockage ne sont pas modifiés par l'incorporation d'acide hyaluronique, mais sa présence permet de ralentir fortement la dégradation en présence de nattokinase (une enzyme présentant une forte activité fibrinolytique : dégradation totale en 5 jours au lieu de 2,5). Ces hydrogels présentent l'avantage de résister à la contraction cellulaire exercée suite à l'encapsulation, et la prolifération est encore augmentée (x1,3) par

la présence d'acide hyaluronique. Ce type d'hydrogel pourrait être utilisé comme support pour la culture et la différenciation cellulaires.

L'acide hyaluronique peut également être modifié par des groupements tyramine, pouvant être réticulés par une peroxydase en présence de peroxyde d'hydrogène. La gélification de ces RIPs Fibrine / HA est donc obtenue par mélange des deux macromolécules avec la peroxydase et la thrombine ²¹². La morphologie du réseau de fibrine est modifiée par la présence de l'acide hyaluronique, qui se traduit par des pores de taille réduite et des fibres plus fines. Ces hydrogels sont assez résistants à la dégradation enzymatique et pourraient être utilisés pour l'encapsulation cellulaire, car ils permettent un maintien de la prolifération cellulaire pendant plus d'une semaine, dans du milieu de culture contenant 10% de SVF. Il faut noter que ce sont les seuls travaux publiés à ce jour, hormis ceux de notre équipe, présentant des RIPs dans lesquels la fibrine est utilisée à concentration physiologique, c'est-à-dire à 5 mg.mL⁻¹. Dans tous les autres cas, elle est utilisée à des concentrations supérieures, et le réseau n'a donc ni la même morphologie, ni la même influence sur le comportement cellulaire.

Enfin, notre équipe a démontré qu'il était possible de synthétiser des RIPs à base d'un réseau de fibrine à concentration physiologique, combiné un polymère synthétique. Les premiers travaux avaient identifié le poly(éthylène glycol) comme partenaire. Les RIP POE/Fb ainsi obtenus sont autosupportés et manipulables, ce qui n'est pas le cas d'un gel de fibrine à 5 mg.mL⁻¹. Ces travaux avaient permis de vérifier que la polymérisation radicalaire du PEGDM ne perturbe pas la formation du réseau de fibrine, et que la réticulation est satisfaisante, avec moins de 6% de polymère extrait. La viabilité cellulaire de CHO en surface de ces RIPs est bonne, attestant de leur non-cytotoxicité ²¹³.

Cependant, ces matériaux présentent une réversibilité à l'hydratation inférieure à 70%. Or, ce type de matériau contenant un gel de fibrine à concentration physiologique, est un candidat intéressant comme pansement, pour arrêter le saignement dans un premier temps, puis favoriser la cicatrisation. Ces gels devant être stockés à sec, le PEG a été remplacé par un polymère plus hydrophile, l'alcool polyvinylique (PVA) ²¹⁴. Le PVA est préalablement modifié par des groupements méthacrylate pour être réticulé par voie radicalaire. Ces matériaux présentent des propriétés viscoélastiques équivalentes à celles d'un RIP POE/Fb, aux alentours de 3 kPa : ils peuvent donc être aisément manipulés. Leur réversibilité à l'hydratation est d'autant plus importante que le pourcentage en PVA dans l'hydrogel est élevé, et une réversibilité totale est atteinte pour un RIP contenant 10% de PVA. Bien que la viabilité cellulaire de fibroblastes de derme humain soit supérieure à 95% pendant les 3 premiers jours de culture, elle chute ensuite. La prolifération cellulaire est nulle en surface de ces RIPs PVA/Fb. Les fibroblastes ne peuvent pas remodeler le support car le PVA ne peut être clivé de manière enzymatique.

Ces RIPs PVA/Fb ont donc été rendu dégradables. Pour cela, une protéine pouvant former un coréseau avec le PVA a été recherchée. L'albumine, protéine sérique abondante pouvant être modifiée chimiquement par des méthacrylates, a été choisie. Le réseau constitué de cette manière comporte des nœuds de réticulation de nature protéique, possédant plusieurs segments reconnus par les métalloprotéases présentes *in vivo*. La dégradabilité de ce type de matériau avait été vérifiée macroscopiquement en présence de quantités importantes d'une métalloprotéase d'origine bactérienne ²¹⁵. En fonction de la quantité d'albumine présente dans le RIP, la dégradation semblait plus ou moins importante.

8. Conclusion

Dans ce premier chapitre, la définition des hydrogels et leurs différents modes de synthèse ont été décrits. Pour des applications en ingénierie tissulaire, les hydrogels doivent non seulement être manipulables, mais leurs propriétés viscoélastiques doivent être équivalentes à celles du tissu à remplacer, afin de fournir un soutien mécanique pour les cellules, et jouer ce rôle de support temporaire. En effet, le matériau doit être biodégradable, et cette dégradation doit se faire de manière contrôlée. Il est primordial que les cellules aient le temps de coloniser le matériau et de sécréter des macromolécules de la MEC avant la disparition complète de l'hydrogel. Ces matériaux doivent être biocompatibles, c'est-à-dire qu'il n'engendrent pas de réaction inflammatoire incontrôlée, mais idéalement, qu'ils s'intègrent à leur environnement, afin de favoriser la formation d'un tissu fonctionnel.

Différents types d'hydrogels ont été développés montrant la diversité des polymères et des modes de synthèse pouvant être utilisés.

Le Tableau 1 récapitule les principales caractéristiques des différents types d'hydrogels, formés à partir de polymères synthétiques, naturels ou d'une combinaison des deux, en termes de propriétés mécaniques, de dégradabilité et de biocompatibilité.

	Propriétés mécaniques	Dégradabilité	Biocompatibilité
Polymères synthétiques	Modulables en fonction de l'architecture (peuvent être > 10 kPa)	Lente (plusieurs semaines/mois)	Non immunogène mais ne favorisent pas l'adhérence cellulaire
Polymères naturels	Faibles (<500 Pa)	Rapide (quelques heures)	Favorisent l'adhérence, la prolifération et la différenciation cellulaires
Combinaison synthétique/naturel	Peuvent être modulées en fonction de la proportion des composés associés	Peut être contrôlée avec la proportion des composés associés	Le polymère naturel permet l'adhérence cellulaire et favorise la prolifération

Tableau 1 : tableau présentant les principales propriétés des hydrogels conçus pour une application en ingénierie tissulaire.

Le cahier des charges pour les hydrogels que nous souhaitons élaborer est le suivant : ils doivent être composés d'un gel de fibrine (à concentration physiologique), car c'est la protéine formant le réseau temporaire de la cicatrisation. Cela doit permettre la reconstruction d'un tissu sain à l'endroit où le matériau est implanté. Ces matériaux doivent être manipulables aisément et résistants mécaniquement. Ces critères sont importants à la fois pour le clinicien amené à les manipuler, mais aussi pour leur devenir au sein du corps. Ils doivent résister aux pressions exercées par les tissus environnants sans se déformer. Ces matériaux doivent également se résorber au fil du temps. Cette dégradation doit pouvoir être contrôlée. Plusieurs applications peuvent être envisagées, et la durée pendant lequel le matériau demeure intact n'est pas forcément la même pour chacune d'elles.

A partir de ce cahier des charges et des principales caractéristiques des réseaux interpénétrés de polymères (cf § 7.2), nous avons choisi de développer de tels matériaux à partir des RIP PVA-BSA/Fb développés précédemment par Laurent Bidault, ce qui fait l'objet du chapitre suivant.

Chapitre 2 : Matériaux RIP à base de PVAm

Au cours de sa thèse, Laurent Bidault a mis au point la synthèse des hydrogels d'architecture RIP en associant de l'alcool polyvinylique modifié par des fonctions méthacrylate (PVAm) à un gel de fibrine à la concentration physiologique. La synthèse de ces matériaux se fait par mélange des différents précurseurs en solution, qui sont ensuite exposés aux UV (365 nm) à 37°C pendant 1h (Figure 43). De cette façon, deux réactions se déroulent simultanément : le PVAm réticule par polymérisation radicalaire photoamorcée, alors que le fibrinogène est clivé par la thrombine pour former un réseau homogène de fibrine ²¹⁴.

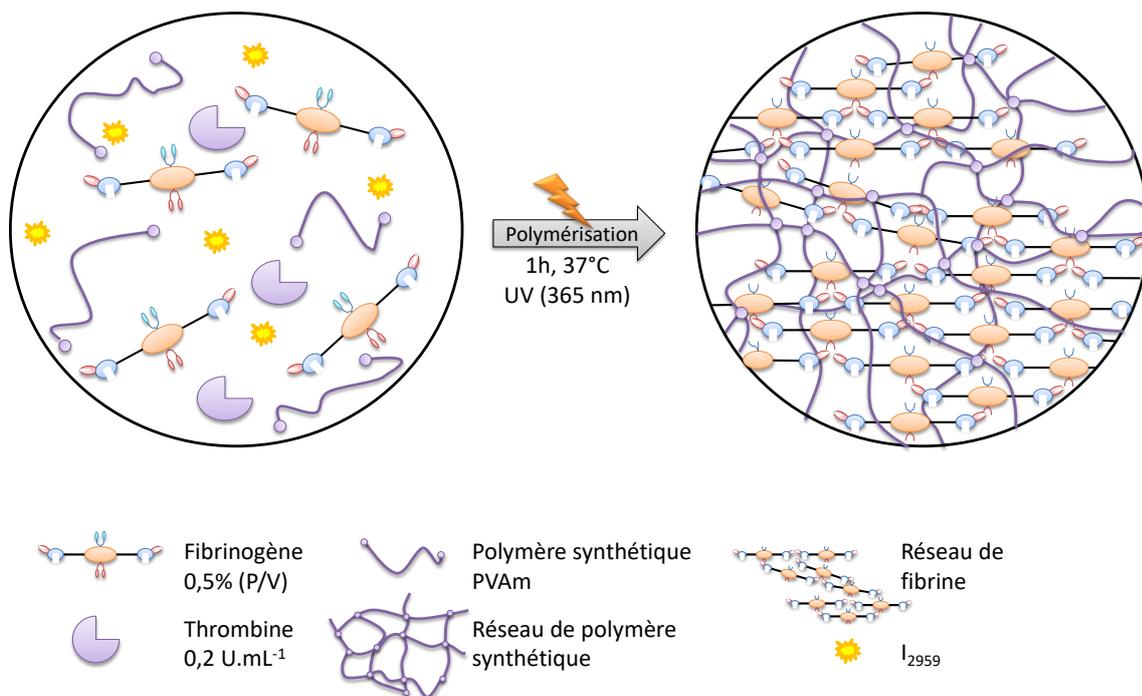


Figure 43 : schéma de synthèse des RIP à base de PVAm et de fibrinogène.

Les matériaux autosupportés obtenus ont des modules de stockage de l'ordre de 3000 Pa, soit environ 50 fois supérieurs à celui du gel de fibrine seule (entre 30 et 80 Pa). Contrairement aux RIPS à base de POE, qui avaient fait l'objet de la thèse d'Edefia Akaplo et d'une partie de la thèse de Laurent Bidault, ces nouveaux RIPS PVA/Fb montrent une réversibilité totale à la réhydratation. Ils sont également non cytotoxiques puisque des fibroblastes humains (FB-BJ) adhèrent et s'étalent à leur surface. De tels matériaux

possèdent les propriétés requises pour un pansement : ils sont mécaniquement résistants et peuvent être facilement manipulés par un praticien, ils sont non cytotoxiques, et enfin ils permettent la conservation de l'humidité de la plaie et peuvent absorber les exsudats. De plus, ils contiennent un réseau homogène de fibrine, qui favorise la réparation tissulaire. Cependant, la survie cellulaire à leur surface n'est pas optimale, car leur viabilité diminue après une semaine. Cela est en accord avec ce qui a été décrit dans la littérature : le PVA étant un polymère hydrophile, il ne favorise pas l'adhérence cellulaire, sauf lorsqu'il est conjugué à des peptides mimant des sites de liaison pour les intégrines^{216,217}.

Ce matériau a ensuite été rendu dégradable par des protéases, de sorte qu'il puisse être remodelé lors de la cicatrisation. Pour cela, comme décrit dans la littérature²¹⁵, des segments protéiques hydrolysables, à base de sérum albumine bovine (BSA) ont été introduits dans le réseau PVA. Ainsi, la BSA entière a été fonctionnalisée avec des groupements méthacrylate qui peuvent copolymériser avec les fonctions méthacrylate du PVAm (Figure 44). Les coréseaux PVA-BSA contenant une proportion massique en BSA supérieure à 50%, sont alors partiellement dégradables par une enzyme protéolytique modèle.

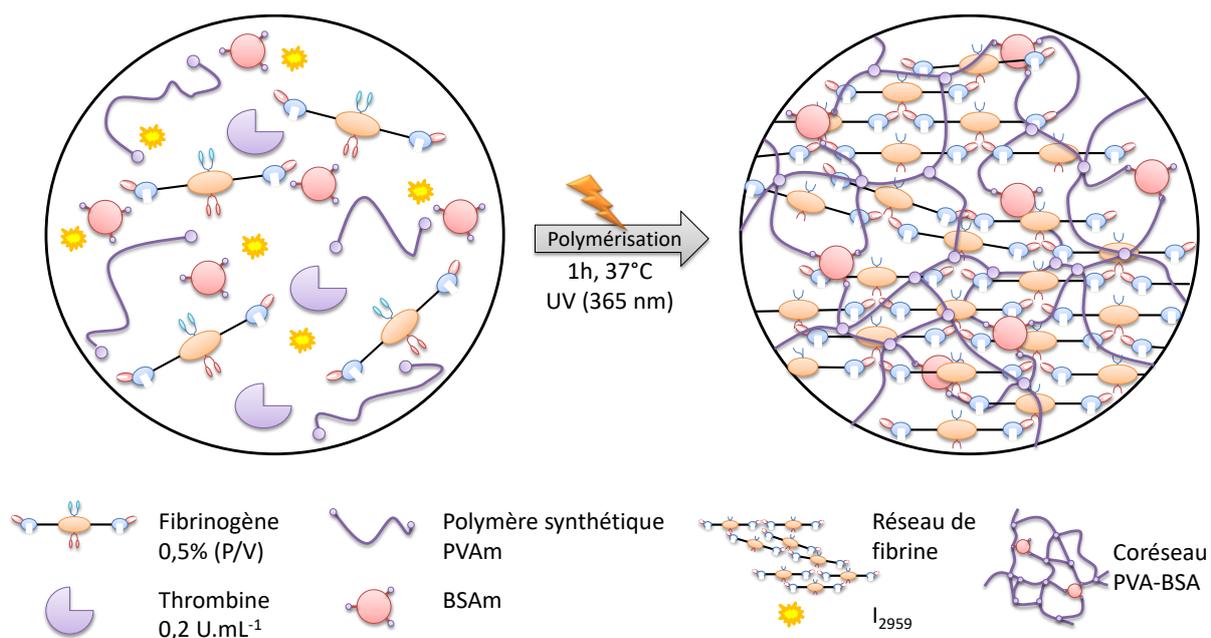


Figure 44 : schéma de synthèse des RIP coréseaux à base de PVA, BSA et fibrinogène.

La répartition de la fibrine au sein du RIP PVA-BSA/Fb reste homogène. Ces hydrogels sont autosupportés, et leur module de stockage, à l'état humide ($G = 800$ Pa pour le RIP PVA(5)BSA(5)/Fb), est environ 10 fois supérieur à celui du gel de fibrine à concentration physiologique. Leur réhydratation est élevée (80%) et ils maintiennent leur hydratation. De plus, l'incorporation de segments hydrolysables augmente la bioactivité du RIP : la surface de ces matériaux est complètement recouverte par des

fibroblastes en une semaine environ, ce qui n'était pas le cas des RIP PVA/Fb et la viabilité demeure supérieure à 95%. Ces cellules sécrètent des macromolécules de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène de type I, acide hyaluronique) et les structurent (fibronectine structurée en fibres). Ces propriétés font de ces RIPS PVA-BSA/Fb d'excellents supports de culture. Placés sur une plaie, ils pourraient donc permettre d'augmenter de manière importante la vitesse de cicatrisation en fournissant aux cellules de la peau une matrice provisoire pour leur déplacement et la formation de tissu sain.

Des premiers essais d'encapsulation de fibroblastes au sein de ces matériaux ont également été réalisés, et la viabilité des cellules demeure élevée jusqu'à 5 semaines (arrêt de la culture). Ces matériaux pourraient donc être à la base d'un substitut cutané cellularisé et bioactif.

A ce stade, correspondant au début de ma thèse, plusieurs points devaient encore être étudiés :

- la méthode de conservation des matériaux devait être évaluée afin de déterminer si leur stockage à l'état sec est possible : la réversibilité à l'hydratation des RIP PVA/Fb est excellente, mais l'influence de l'albumine introduite sur cette propriété restait à déterminer.
- Leur biodégradabilité et la cinétique de dégradation devaient être quantifiées. En effet, seuls des essais préliminaires (immersion 24h dans une solution d'enzyme à 20U.mL⁻¹) avaient permis de conclure qualitativement à la biodégradabilité sans évaluation quantitative.
- La fonctionnalisation de l'alcool polyvinylique par des groupements méthacrylate étant réalisée au laboratoire, il a fallu vérifier que celle-ci pouvait être réalisée dans des conditions stériles, ou que le polymère modifié pouvait être stérilisé avant son utilisation, afin d'éliminer tout risque de développement microbien. Par ailleurs, la reproductibilité de la synthèse devait être évaluée.

Les réponses à ces différents points sont maintenant présentées.

1. Comportement lors de cycle de déshydratation/réhydratation

Dans le but d'applications thérapeutiques, il est nécessaire de disposer d'une méthode optimale de conservation des matériaux. S'ils sont synthétisés préalablement, ils doivent être stockés, puis transportés pour être amenés au lit du patient. Il faut donc assurer leur stérilité et la conservation de leurs propriétés biologiques et mécaniques. Dans ce contexte, un stockage des matériaux à l'état sec est la méthode la plus fréquemment utilisée.

Les hydrogels RIPS RIP PVA-BSA/Fb contiennent un gel de fibrine qui devient friable, une fois déshydraté, quand il est seul. Ce gel présente une capacité de réhydratation faible (environ 22%). Les

capacités d'hydratation et de déshydratation des RIPS PVA-BSA/Fb ont donc été quantifiées, afin de mesurer l'impact de la présence du partenaire synthétique PVA-BSA sur cette propriété.

Après leur synthèse, les matériaux sont immergés dans un tampon d'hydratation jusqu'à atteindre l'équilibre des masses hydratées ($M_{hydratation\ 1}$), puis ils sont séchés jusqu'à l'obtention d'une masse sèche constante ($M_{sec\ 1}$). Le taux de gonflement initial (SR_1) est calculé selon la relation suivante :

$$SR_1 = \frac{M_{hydratation\ 1}}{M_{sec\ 1}}$$

Une fois ce premier séchage terminé, le matériau est réhydraté en l'immergeant dans le tampon d'hydratation ($M_{hydratation\ 2}$). Le matériau est à nouveau séché ($M_{sec\ 2}$) et les masses ainsi obtenues permettent de calculer le taux de gonflement SR_2 :

$$SR_2 = \frac{M_{hydratation\ 2}}{M_{sec\ 2}}$$

Les matériaux protéiques Réseau Simple (RS) BSA(10) et RIP BSA(10)/Fb perdent leur intégrité lors de leur réhydratation : ils se fragmentent de façon assez importante, en particulier le RS BSA(10). Les taux de gonflement mesurés sont très élevés (supérieurs à 30) et certainement erronés. C'est pourquoi ils n'ont pas été considérés par la suite. En revanche, les matériaux contenant du PVA restent intacts : ils ne se fragmentent pas, même à l'issue d'un second cycle de déshydratation. Le réseau formé par le polymère synthétique permet donc d'éviter la fragmentation des matériaux secs lors de leur réhydratation. La Figure 45 présente les taux de gonflement des différents matériaux testés.

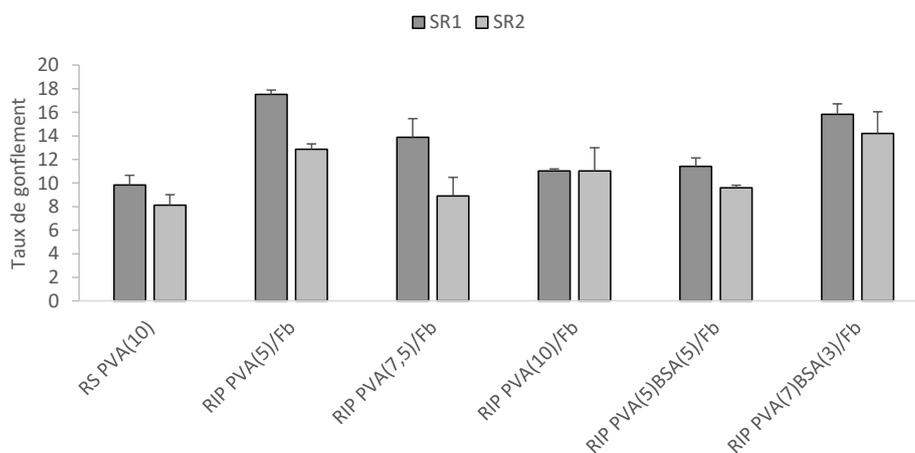


Figure 45 : taux de gonflement des différents réseaux simples et RIP à base de PVA au cours de cycles de déshydratation/ hydratation.

Une première tendance générale peut être dégagée : plus la proportion de PVA est importante dans le matériau, plus son gonflement dans le tampon est faible. En effet, alors que le gonflement initial du RIP PVA(5)/Fb est de 17,5, celui du RIP PVA(7,5)/Fb est de 13,9 et celui du RIP PVA(10)/Fb est de 11. Le PVA limite donc le gonflement des matériaux dans le tampon. Les taux de gonflement des matériaux contenant de l'albumine sont plus élevés ($SR_1 = 15,7$ pour BSA(10) et $19,3$ pour BSA(10)/Fb). Les valeurs des RIP PVA-BSA/Fb sont comprises entre celles des RIP PVA/Fb et BSA/Fb. Le gonflement des RIPS correspond donc à la moyenne pondérée des deux phases en présence. Toutefois ces taux restent inférieurs à celui de la fibrine ($SR_1 = 60$ ²¹²). Ainsi, même en présence de BSA, le PVA continue à jouer son rôle d'armature qui limite le gonflement.

Quelle que soit sa composition, le taux de gonflement initial (SR_1) de tout RIP contenant du PVA est toujours supérieur à son taux de gonflement SR_2 mesuré après un premier séchage. Ceci peut s'expliquer par l'augmentation de la proportion des zones cristallines de PVA induites par les séchages et qui limitent la réhydratation du matériau. Cela a d'ailleurs été vérifié par Laurent Bidault: plus le nombre de cycles d'hydratation/séchage est important, plus la proportion des zones cristallines augmente⁵.

La réversibilité à l'hydratation calculée comme $\%R(1 \rightarrow 2) = \frac{SR_2}{SR_1} \times 100$ (Figure 46), tend à augmenter avec la proportion de PVA dans le matériau. En effet, le RIP PVA(5)/Fb peut être réhydraté à 73% de sa première valeur (avant séchage) alors que le RIP PVA(10)/Fb retrouve quasiment sa valeur initiale (environ 100%). Cette tendance se vérifie aussi lors des cycles de déshydratation/réhydratation des RIPS PVA-BSA/Fb. Ainsi, le RIP PVA(5)BSA(5)/Fb se réhydrate à 84% de sa valeur initiale tandis que le RIP PVA(7)BSA(3)/Fb a une réversibilité de 90%. Quelle que soit la composition du RIP, la réversibilité à l'hydratation est supérieure à 80%, ce qui est bien supérieure à celle d'un gel de fibrine, qui perd toute capacité de réhydratation après une étape de séchage.

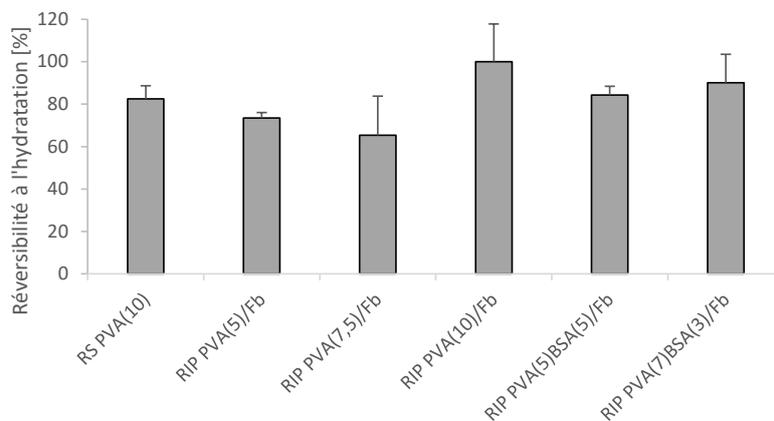


Figure 46 : réversibilité à l'hydratation des matériaux à base de PVA.

La synthèse de RIP associant le PVA à l'albumine permet donc d'obtenir des matériaux qui présentent des gonflements satisfaisants, et qui peuvent être fortement réhydratés après leur séchage. Ce point est crucial car cela permet d'envisager un stockage des matériaux à l'état sec avant leur utilisation dans un contexte d'ingénierie tissulaire.

La répartition du réseau de fibrine dans les différents matériaux ayant subi ces cycles d'hydratation et de déshydratation a été comparée à celle observée dans ces mêmes matériaux en sortie de synthèse (images réalisées par L. Bidault), afin de vérifier que le séchage et la réhydratation n'affectent pas la morphologie du gel de fibrine. Pour cela, après un cycle de déshydratation / réhydratation (soit après le second séchage), les matériaux ont été réhydratés dans un tampon Borate et un marquage du réseau de fibrine a été réalisé soit avec du N-succinimide Alexa 488 pour les matériaux ne contenant pas de BSA, soit avec l'anticorps anti-fibrinogène couplé au FITC pour les matériaux en contenant. Les matériaux sont ensuite observés en microscopie confocale (Figure 47). Préalablement, il a été vérifié que les réseaux simples RS PVA et RS BSA n'émettent pas de fluorescence lorsqu'ils sont marqués dans ces conditions. Les larges zones sphériques ne renvoyant pas de fluorescence correspondent à des bulles d'air emprisonnées lors de la synthèse des matériaux du fait de la viscosité de la solution initiale.

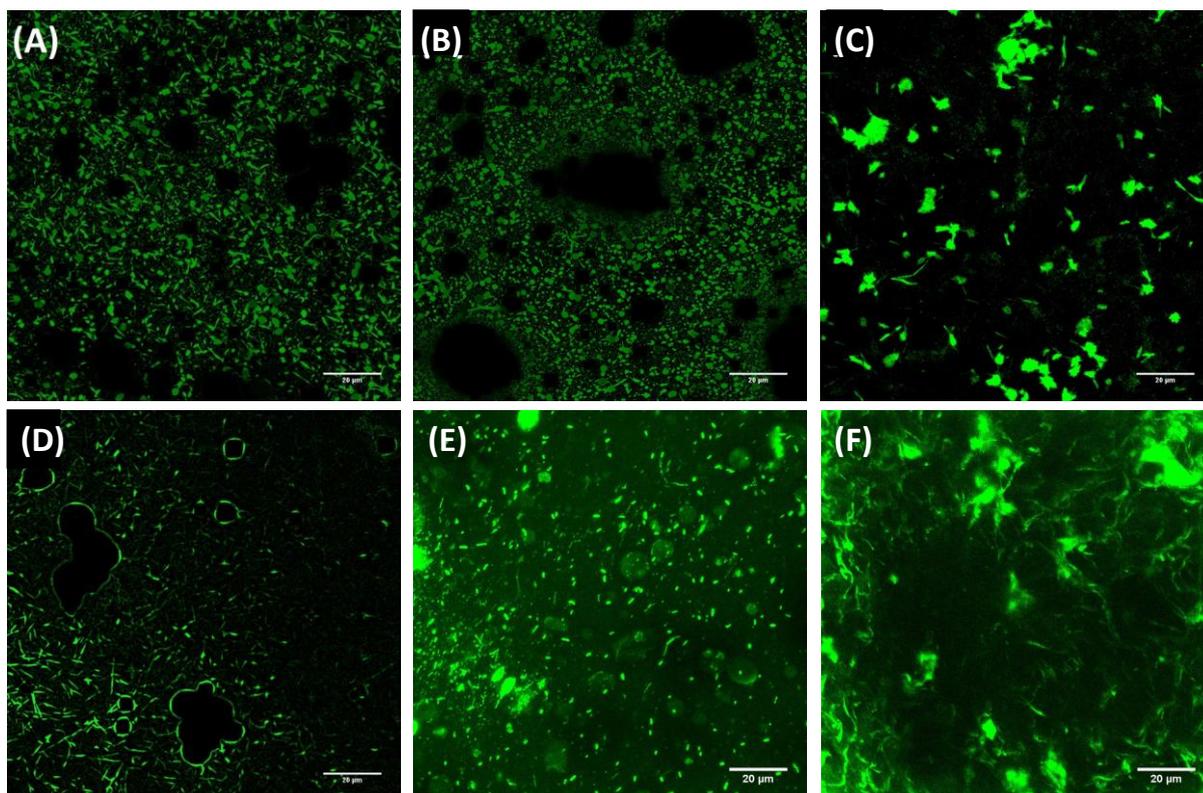


Figure 47 : Observation en microscopie confocale du réseau de fibrine en sortie de synthèse (A, B et C) et après le cycle d'hydratation/déshydratation (D, E et F). (A et D) RIP PVA(5)/Fb; (B et E) RIP PVA(10)/Fb et (C et F) RIP PVA(5)BSA(5)/Fb. (A) à (C) : marquage par le n-succinimide Alexa 488 ; (D) à (F) : marquage par l'anticorps anti-fibrinogène couplé au FITC.

Le réseau de fibrine est dense et continu dans les RIP PVA(5)/Fb et RIP PVA(10)/Fb en sortie de synthèse (A et B). Après leur séchage (D et E), le réseau fibrillaire est toujours détecté, mais il est moins régulier. Pour le RIP PVA(10)/Fb, la fluorescence est principalement détectée sous forme d'agrégats, et même si quelques fibres peuvent être retrouvées dans l'épaisseur du matériau, l'ensemble est assez hétérogène. Pour ce qui est du RIP PVA(5)BSA(5)/Fb (F), le réseau fibrillaire est bien reconnaissable et des zones de plus forte fluorescence peuvent être observées (pas sous forme d'agrégats comme pour les formulations ne contenant pas d'albumine). Cela indique que le gel de fibrine contenu dans le RIP pour lequel la proportion en PVA est plus faible, est plus altéré par la lyophilisation. La présence de la BSA dans le matériau affecte donc la répartition et la structure du gel de fibrine.

Les matériaux RIP à base de fibrine peuvent donc être séchés, et réhydratés presque totalement, même en présence d'albumine coréticulée au PVA. La présence du polymère permet de conserver les matériaux intacts au fil de cycles d'hydratation/déshydratation, alors qu'ils se fragmentent s'ils sont uniquement de nature protéique. Bien que la morphologie du réseau de fibrine soit un peu altérée par ce séchage pour les RIP PVA/Fb, cela n'est pas le cas pour le RIP PVA(5)BSA(5)/Fb. La présence d'un coréseau PVA-BSA semble donc favoriser la conservation de la morphologie du réseau de fibrine.

Nous avons ensuite cherché à quantifier la dégradation de ces matériaux.

2. Dégradation enzymatique des RIP PVA-BSA/Fb

La dégradation des RIPS contenant du PVA et/ou de la BSA a été étudiée de différentes manières. Aucun protocole n'ayant été élaboré avant cette étude, celui-ci a dû être mis au point.

La dégradation enzymatique est réalisée en immergeant les matériaux dans une solution de métalloprotéase, à une concentration connue, pendant différentes durées, à 37°. Préalablement à toute mesure, une simple observation visuelle du matériau est réalisée afin de vérifier son intégrité ou non. Dans un second temps, les modules mécaniques des matériaux ont été mesurés après différents temps d'immersion. En effet, la dégradation de certains segments protéiques devrait diminuer la densité de réticulation du matériau et donc ses propriétés mécaniques. Simultanément des fragments protéiques doivent être libérés dans la solution d'enzyme. La diffusion de ces fragments a donc été mesurée en suivant d'absorbance de la solution à 280 nm. Les différents résultats obtenus sont maintenant présentés.

2.1. Suivi visuel de la dégradation

Dans un premier temps, les différents RIPS ont été incubés pendant 24 h à 37°C dans une solution de métalloprotéase d'origine bactérienne, la thermolysine (à 20 U.mL⁻¹). Les images de ces RIPS sont présentées sur la Figure 48.

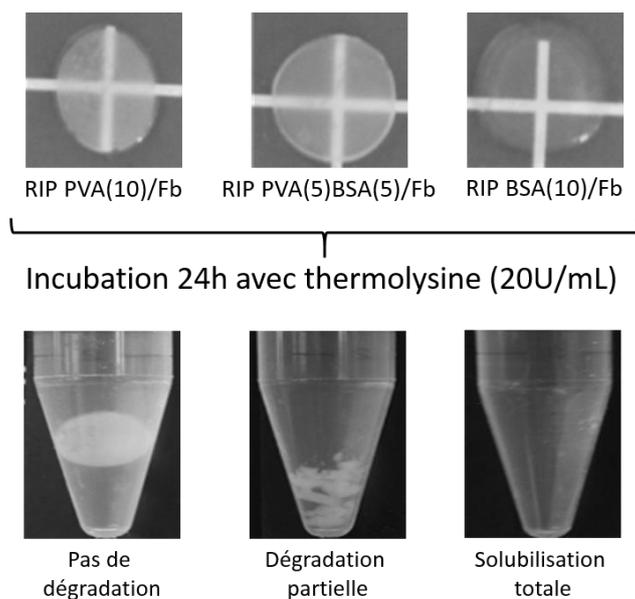


Figure 48 : évolution des RIP PVA(10)/Fb, PVA(5)BSA(5)/Fb et BSA(10)/Fb après 24 h d'incubation dans une solution de thermolysine à 20 U.mL⁻¹ à 37°C.

Conformément à ce qui était attendu, le RIP PVA(10)/Fb ne semble pas être dégradé par la protéase dans ces conditions. La thermolysine peut dégrader le réseau de fibrine contenu au sein de ces RIPS, mais comme il représente un peu moins de 5% (5 mg sur 105 mg total) de la masse sèche du RIP, sa protéolyse par la thermolysine n'induit pas la dislocation du RIP PVA(10)/Fb (Figure 48). Cette expérience permet de conclure quant à la répartition du PVA dans l'architecture RIP car la forme ronde de ce matériau n'est pas affectée par la fibrinolyse. Cela illustre une propriété particulièrement remarquable de ces RIPS : leur forme demeure constante, même en présence d'enzymes protéolytiques.

Lorsque l'albumine est incorporée au réseau de PVA, le RIP PVA(5)BSA(5)/Fb est partiellement hydrolysé par l'action enzymatique puisque après son immersion dans la solution de thermolysine, il se décompose en nombreux fragments. Ce résultat indique que l'albumine peut être dégradée au sein du RIP et qu'elle est bien répartie au sein du matériau.

Enfin, le RIP BSA(10)/Fb est logiquement complètement dégradé par la protéase puisqu'il ne contient que des protéines.

2.2. Evolution des propriétés viscoélastiques

Pour vérifier l'hydrolyse des protéines à l'intérieur de ces RIP, leurs modules de stockage ont été mesurés juste après synthèse (matériaux gonflés de tampon) puis après 1h d'incubation dans une solution de thermolysine, à 10 U.mL⁻¹ (Figure 49). En effet, l'évolution des modules viscoélastiques au cours du temps peut permettre d'étudier, en temps réel, la dégradation d'hydrogels. Ainsi, Metters et al ont largement

étudié l'évolution du module de compression de gels de PLA-*b*-PEG lors de leur dégradation et un modèle mathématique décrivant l'augmentation de la taille de maille a été proposé⁸⁴⁻⁸⁶. L'évolution du module de stockage des hydrogels de Dextran⁸⁷, de PLGA²¹⁸ ou de RIP PEG/acide hyaluronique⁸⁸ a également été étudiée au cours de leur dégradation.

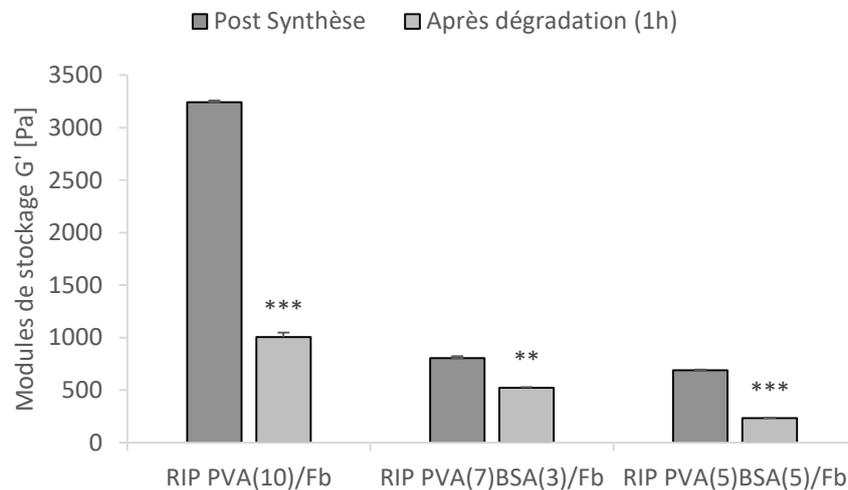


Figure 49 : modules de stockage des RIP à base de PVA en sortie de synthèse et après 1h de d'immersion dans une solution de thermolysine à 10 U.mL⁻¹. Les tests statistiques sont effectués par rapport aux modules de stockage mesurés post-synthèse. ** p<0,01 et *** p<0,001.

Quelle que soit la composition du RIP, les valeurs des modules de stockage (G') sont réduites après immersion dans la solution d'enzymes, donc après l'hydrolyse, partielle ou totale, de la partie protéique. Notre équipe avait précédemment montré que l'addition de seulement 5% de fibrine à un réseau de PVA permet d'augmenter d'un facteur 4 son module de stockage²¹⁴. Il n'est donc pas surprenant constater une diminution d'un facteur 3 (correspondant à 2240 Pa) même si le matériau ne se déforme pas. Ce résultat confirme l'idée de la répartition homogène du réseau de fibrine au sein du RIP PVA(10)/Fb. Une diminution des valeurs du G' est également observée sur les RIPs PVA(7)BSA(3)/Fb et PVA(5)BSA(5)/Fb. Elle est d'autant plus importante que la proportion en albumine dans le matériau est élevée. Ainsi, le module du RIP PVA(7)BSA(3)/Fb diminue de 35% après 1h d'hydrolyse, alors que celui du RIP PVA(5)BSA(5)/Fb diminue de 66%. Ces résultats sont cohérents avec l'hypothèse d'une dégradation simultanée de la fibrine et de l'albumine par la thermolysine dans ces matériaux.

2.3. Suivi du relargage des fragments protéiques

Afin de mieux caractériser la dégradation enzymatique, les hydrolyses des 4 RIPs BSA(10)/Fb, PVA(3)BSA(7)/Fb, PVA(5)BSA(5)/Fb et PVA(10)/Fb ont été suivies en mesurant l'absorbance des protéines et des fragments protéiques relargués hors du gel au cours du temps d'immersion (Figure 50).

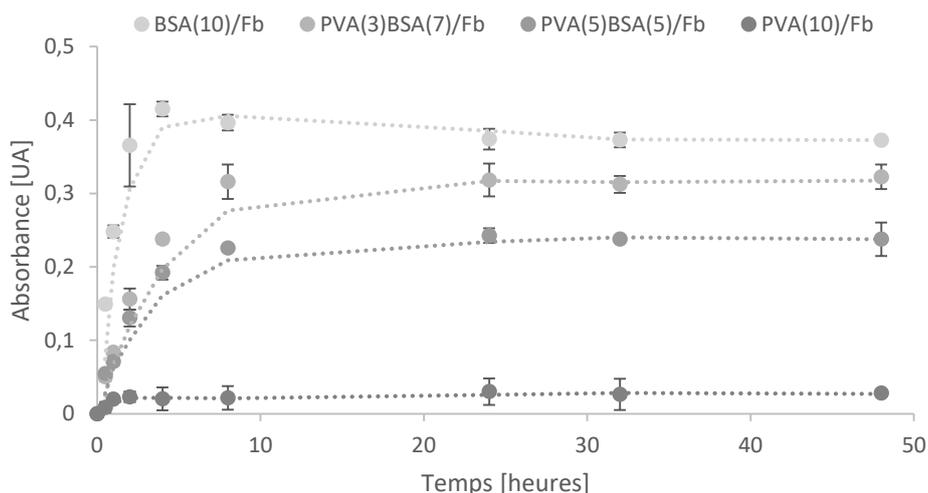


Figure 50 : absorbance à 280 nm de la solution de Termolysine à 10 U.mL⁻¹ en fonction du temps d'immersion des RIPS à base de PVA.

L'absorbance à 280 nm de la solution dans laquelle est immergé le RIP PVA(10)/Fb est légèrement supérieur à 0, ce qui traduit le fait que le réseau de fibrine est dégradé. Cependant, ce matériau conserve son aspect homogène macroscopique (Figure 48). Le réseau de PVA est donc réparti de façon homogène dans l'ensemble du matériau.

Après 24h à 37°C, l'hydrolyse des RIPS contenant l'albumine cesse puisque l'absorbance atteint un plateau. Il semble qu'alors la totalité de la fraction protéique est relarguée hors du matériau. En effet, l'absorbance au plateau est proportionnelle à la concentration en protéine introduite dans les matériaux selon l'équation:

$$Absorbance_{280} = 0,038 [protéine]_{totale} + 0,01 \text{ avec } R^2 = 0,991$$

Ce résultat montre que la fibrine et l'albumine sont toutes deux accessibles à la protéase à l'intérieur du matériau, et qu'elles sont sensibles à l'hydrolyse en dépit de leur réticulation, qui est pourtant connue comme un facteur limitant la protéolyse^{219,220}.

La vitesse initiale d'hydrolyse dépend également de la concentration en protéines (fibrine et albumine) dans le matériau. Ainsi, la vitesse initiale a été évaluée à partir de la quantité de protéines relarguée après 2h d'immersion dans la solution enzymatique, durée sur laquelle la variation d'absorbance en fonction du temps est constante. A partir de ces mesures, une représentation graphique de Lineweaver-Burk ($1/v = f(1/[S])$) est réalisée sur la Figure 51, [S] étant la concentration totale en protéines.

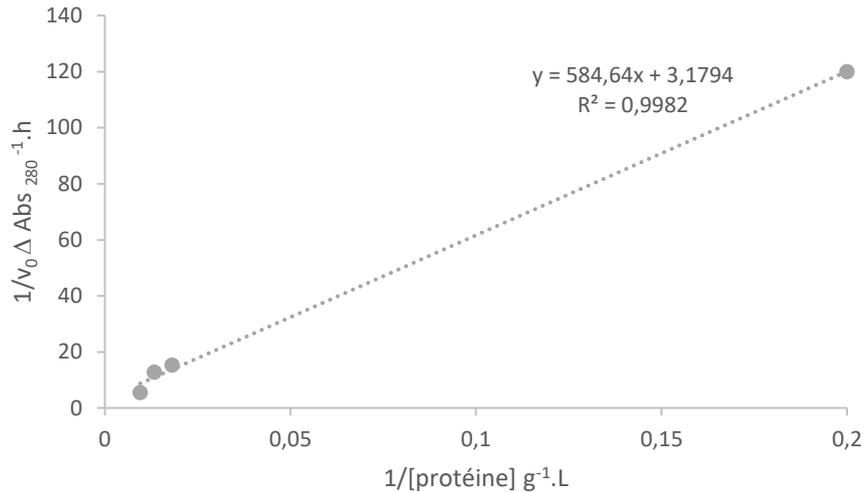


Figure 51 : représentation de Lineweaver-Burk entre la vitesse initiale d'hydrolyse des différents RIP par la TL et la concentration totale en protéines (Fibrine + Albumine en g.L⁻¹). La vitesse est calculée à partir de l'absorbance à 280 nm de la solution enzymatique après 2h d'immersion des matériaux.

La bonne corrélation ($1/v = f(1/[S])$) obtenue montre que le processus d'hydrolyse suit globalement une cinétique de Michaelis-Menten malgré la nécessaire diffusion de la protéase à l'intérieur du matériau. Pour confirmer cette hypothèse, il faudrait faire varier la concentration en enzyme, ce qui n'a pas été réalisé. Les constantes cinétiques peuvent être calculées à partir de la pente et de l'ordonnée à l'origine de cette droite. La valeur du K_M est très élevée à 225 g.L⁻¹ et la vitesse maximale v_{max} est de 9.7 g.protéine.L⁻¹.h⁻¹. La valeur élevée de K_M est certainement due à la présence du réseau de polymère, qui perturbe l'accessibilité des substrats protéiques aux sites actifs de l'enzyme. La rigidité de l'albumine (la structure tridimensionnelle de l'albumine est stabilisée par 17 ponts disulfure, et sa réticulation covalente au sein du matériau lui confère une rigidité encore augmentée) et l'obstruction du milieu réactionnel par une phase solide doivent conduire à une mauvaise adaptation entre l'enzyme et son substrat, donc à une diminution de l'affinité apparente soit à une valeur élevée de K_M .

Le signal à 280 nm du RIP PVA(10)/Fb est légèrement supérieur à 0, ce qui traduit le fait que le réseau de fibrine est dégradé. Cependant, comme montré sur la Figure 48, ce matériau conserve son aspect homogène macroscopique : le réseau de PVA est donc réparti de façon homogène dans l'ensemble du matériau.

Ces expériences montrent que l'albumine est accessible à la protéase et peut être hydrolysée au sein de l'architecture RIP. La dégradation complète des RIPS n'est possible que si l'albumine est répartie de façon homogène dans l'ensemble du matériau. Enfin, ces résultats montrent qu'il est possible, en contrôlant la concentration totale en protéines dans les RIPS, de régler la vitesse de dégradation des RIPS à base de PVA

Ces travaux sont novateurs, car c'est à ce jour le premier RIP qui a été décrit comme pouvant être dégradé par voie enzymatique, par le clivage protéolytique de deux réseaux, d'une part le réseau de fibrine, dont la dégradation intervient probablement en premier lieu, et, d'autre part, le coréseau formé du polymère synthétique et de l'albumine. La vitesse de dégradation pouvant être contrôlée, cela représente un potentiel très intéressant pour différents types d'applications : un matériau plus ou moins riche en PVA peut être utilisé en fonction du temps souhaité entre son implantation et sa dégradation.

3. Variabilité entre lots et stérilisation du PVAm

Afin d'être réticulé de façon covalente par polymérisation radicalaire, une partie des fonctions alcool de l'alcool polyvinylique doivent être modifiées par des groupements méthacrylate. Cette modification, décrite en Annexe B, a été mise au point par L. Bidault et ce protocole a ensuite été mis en œuvre par plusieurs expérimentateurs au sein du laboratoire. Le taux de fonctionnalisation théorique est fixé à 4,1%, mais dans la pratique, le taux moyen est situé aux alentours de 2%. Lors des premières fonctionnalisations effectuées par un nouvel expérimentateur, ce taux est en général plus faible (environ 1%) car les gestes techniques ne sont pas entièrement maîtrisés. Or, le nombre de fonctions réactives effectivement greffées sur le PVA a une incidence sur la qualité de la réticulation des matériaux (extractibles synthétiques, propriétés viscoélastiques...) et une telle variabilité n'est pas souhaitable pour des applications cliniques. La production à plus grande échelle par le biais d'un prestataire a été envisagée mais aucune des sociétés potentielles n'a été en mesure de répondre à notre demande.

Une fois modifié, le PVAm, obtenu sous forme de poudre, doit être conservé. Or, solubilisé dans du tampon Tris, le PVAm s'est avéré instable : une agrégation est observée au bout d'une semaine, rendant le polymère inutilisable.

Au-delà de ce problème de reproductibilité et de conservation, la question de la stérilisation du PVAm s'est rapidement posée. En effet, la fonctionnalisation est effectuée dans des conditions non stériles (hotte aspirante). Le matériel utilisé est systématiquement nettoyé à l'éthanol, les surfaces sont passées à l'hypochlorite de sodium (eau de Javel), et les manipulations sont réalisées dans les conditions les plus propres possibles. Malgré cela, plusieurs lots de PVAm se sont avérés contaminés (par des microorganismes de type bactérie et levure), donc inutilisables pour la synthèse de matériau. La stérilisation du polymère après sa modification a donc été testée. Il s'avère impossible de filtrer la solution de PVAm car sa viscosité est trop importante. Le polymère solubilisé à 20% (w/v) a alors été autoclavé pendant 15 min à 121°C (Figure 52).

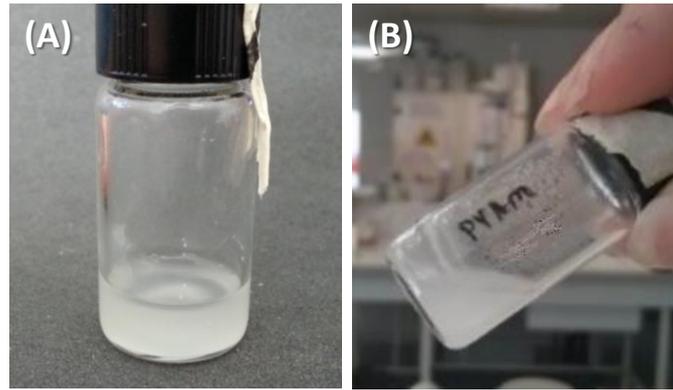


Figure 52 : photographies d'aliqots de PVAm (A) avant stérilisation par autoclave et (B) après 15 min à 121°C.

Après autoclave, le PVAm reste sous forme de suspension (Figure 52B) mais un anneau de PVAm gélifié est cependant observé sur les bords du pilulier. Les pressions et températures élevées pendant ce traitement de stérilisation ont probablement provoqué une gélification partielle du polymère. De plus, le taux de fonctionnalisation du PVAm après autoclave est divisé par deux par rapport au taux initial. Cela confirme la réaction des fonctions méthacrylate lors du traitement par autoclave. Il n'est donc pas possible de stériliser le PVAm par des moyens disponibles dans nos laboratoires.

4. Conclusion

Pour l'utilisation de matériaux développés en ingénierie tissulaire, un point crucial à vérifier est qu'il n'engendre pas de réaction inflammatoire au contact du corps humain. Dans le cadre de l'ANR Fibriderm, des études seront menées par nos collaborateurs sur des matériaux implantés *in vivo* afin de vérifier qu'effectivement, ces hydrogels n'engendrent aucune réaction de ce type. Préalablement, nous avons vérifié que la synthèse de ces RIP PVA-BSA/Fb est possible à partir de protéines humaines sans qu'ils soient nécessaires de modifier le protocole de synthèse de ces matériaux (cf Annexe A). Ces RIPS à base de protéines humaines présentent des propriétés équivalentes à ceux qui sont synthétisés à partir des protéines bovines.

La synthèse du PVAm est un processus long, délicat à maîtriser. Ce polymère ne peut pas être produit de façon complètement stérile, et l'impossibilité de le stériliser après sa solubilisation est un vrai obstacle à son utilisation. Bien qu'il permette d'obtenir des matériaux ayant des propriétés viscoélastiques très satisfaisantes et dont la biodégradabilité enzymatique est contrôlable, une solution alternative a donc dû être envisagée.

Pour ne plus rencontrer ce genre de verrous techniques, le partenaire synthétique du gel de fibrine doit être disponible commercialement, et être peu coûteux. Il doit pouvoir être stérilisé de façon simple, et permettre d'obtenir des matériaux possédant des propriétés équivalentes à celles des RIPS PVA-BSA/Fb. Il

est impératif que ces matériaux soient biodégradables, et biocompatibles. C'est pour répondre à ce cahier des charge que des matériaux associant l'albumine au poly(éthylène glycol) ont été mis au point. Ils sont présentés dans le chapitre suivant.

Chapitre 3 : Matériaux POE-BSA/Fb

Les travaux présentés au chapitre précédent ont montré qu'il est possible de synthétiser un réseau interpénétré de polymères à base d'alcool polyvinylique modifié par des fonctions méthacrylate (PVAm), et de copolymériser celui-ci avec de l'albumine, elle aussi préalablement modifiée avec ces mêmes fonctions. De cette façon, le réseau de structure obtenu possède des segments synthétiques et des segments protéiques ; ceux-ci peuvent donc être clivés par les enzymes protéolytiques sécrétées de manière abondante dans le corps humain, en particulier lors des processus de cicatrisation. Cependant, le PVAm n'est pas disponible commercialement, et sa fonctionnalisation doit être effectuée préalablement à la synthèse des matériaux. La modification du PVA n'est pas toujours reproductible et elle est chronophage. Par ailleurs, l'impossibilité d'obtenir du PVAm parfaitement stérile est un élément rédhibitoire des applications cliniques.

Au vu de ces limites, nous avons donc choisi de développer une nouvelle série de matériaux élaborés à partir d'un oligomère synthétique commercial simple d'utilisation, en remplacement du PVA. L'objectif reste de mettre au point des matériaux à base de fibrine, présentant les propriétés d'un hydrogel, à la fois manipulable, biodégradable, et non-cytotoxique.

1. Choix du remplaçant du PVAm

Comme nous l'avons mentionné dans le chapitre 1 (cf.§ 6.1.3), le poly(éthylène glycol) (PEG) est un matériau adapté aux applications biologiques car il ne provoque généralement pas de réponse immunitaire. Il est utilisé comme hydrogel pour la culture cellulaire.

Pour élaborer ces hydrogels, des macromères de PEG de masse molaire variant de 300 à 20 000 g.mol⁻¹ avec une faible polydispersité peuvent être utilisés. Des oligomères de PEG avec des groupements terminaux tels que des acrylate, méthacrylate, allyle éther, maléimide, vinyle sulfone, NHS ester et vinyle éther (Tableau 2) sont disponibles commercialement. Ces groupements terminaux en réagissant permettent la formation des hydrogels chimiques de PEG.

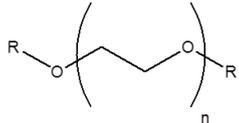
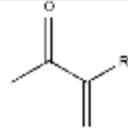
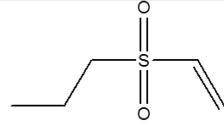
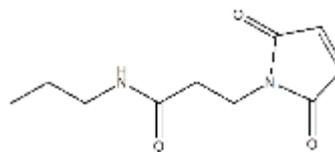
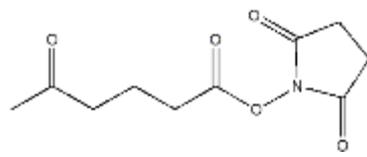
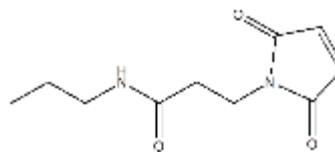
PEG			
			
R :		R' = -H acrylate	
		R' = -CH ₃ méthacrylate	
		Allyle éther	
		Maléimide	

Tableau 2 : groupements réactifs terminaux des différents macromères de PEG disponibles commercialement

Ces macromères peuvent être homobifonctionnels ou hétérobifonctionnels. Les PEG homobifonctionnels sont le plus couramment utilisés pour former des réseaux, tandis que les PEG hétérobifonctionnels sont plutôt utilisés pour greffer des molécules thérapeutiques sur des hydrogels.

Le mécanisme de réticulation dépend de la nature des groupements réactifs. Pour nos travaux, le macromère PEG choisi porte des groupements méthacrylate à chacune de ses extrémités (PEGDM), identiques au groupement réactif du PVAm étudié précédemment, mais surtout à ceux de la BSA_m, avec lesquels ils pourront copolymériser. Le PEGDM peut également former un hydrogel s'il est utilisé seul (Figure 53).

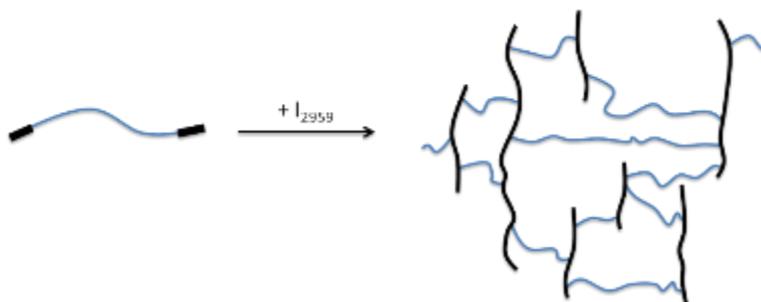


Figure 53 : schéma présentant la formation d'un réseau de POE à partir de macromères de PEGDM.

Des oligomères de PEGDM sont disponibles commercialement avec différentes masses molaires, variant de 330 g.mol⁻¹ jusqu'à 20 000 g.mol⁻¹. Les oligomères dont la masse molaire est supérieure à 3000 g.mol⁻¹ sont cristallins, ce qui n'est pas souhaité pour une réticulation optimale des matériaux. L'effet de la

densité de réticulation du PEG sur les propriétés de l'hydrogel pourra donc être étudié. En effet, les travaux d'Edefia Akpalo ont montré qu'il est possible de former des réseaux interpénétrés de polymères POE/Fibrine à partir de PEGDM de différentes masses molaires de 550 et 750 g.mol⁻¹ et de modifier la concentration en fibrine⁴. Laurent Bidault avait montré par la suite que les RIP formés à partir du PEGDM750 présentaient à la fois les meilleures propriétés viscoélastiques. Nous avons donc choisi de travailler uniquement avec du PEGDM750.

Le composé hydrolysable inclus dans le réseau POE est, comme précédemment, l'albumine de sérum bovin modifiée avec des groupements méthacrylate (BSAm). La réaction des groupements méthacrylate de la BSA avec ceux du PEGDM devrait donc permettre de former un réseau hybride contenant des segments protéiques et des segments synthétiques, ce que nous avons ensuite vérifié.

2. Synthèse et caractérisation des coréseaux POE-BSA

Dans un premier temps, des coréseaux POE-BSA de différentes compositions ont été synthétisés. Dans tous les cas, la concentration massique totale en précurseurs polymérisables (PEGDM + BSA) est de 100 mg.mL⁻¹ dans le tampon de synthèse. Au sein de ces 100 mg.mL⁻¹, les concentrations de PEGDM et de BSA ont été modifiées ; elles varient, respectivement, de 20 à 50 mg.mL⁻¹ pour le PEGDM et de 80 à 50 mg.mL⁻¹ pour la BSA. Les coréseaux seront appelés POE(x)coSA(y) où x et y désignent les pourcentages massiques du composé dans la solution de synthèse. Le pourcentage de POE « x » varie entre 2 et 5%, et le pourcentage de BSA « y » est tel que $x + y = 10 \%$ (P/V). L'Irgacure 2959 a été conservé comme amorceur radicalaire et le rapport molaire (amorceur : méthacrylate) a été fixé à (1 : 16). Le temps d'irradiation est d'une heure à 365 nm. Le réseau simple de POE a également été synthétisé dans les mêmes conditions pour être utilisé comme référence. Par contre, dans ces conditions, le réseau simple de BSA forme un gel très fragile et difficilement manipulable. Certaines caractérisations de ce matériau n'ont donc pas pu être effectuées.

Les coréseaux POE-BSA sont tous autosupportés et résistent à la déformation. Ils sont transparents et parfaitement homogènes (Figure 54).

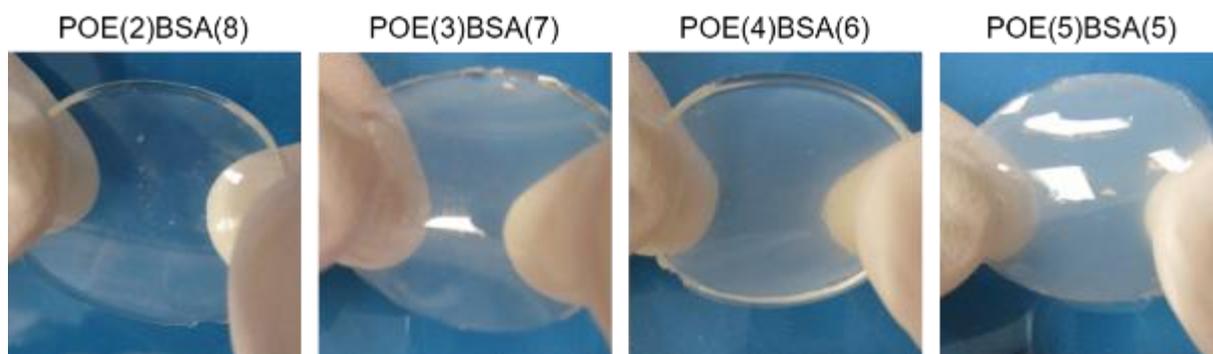


Figure 54 : photos des différents coréseaux POE-BSA synthétisés par copolymérisation du PEGDM avec la BSA en différentes proportions.

Les extractibles synthétiques ont été mesurés par extraction solide/liquide avec du dichlorométhane. Puisque les protéines y sont très peu solubles ($< 0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$), seul le PEGDM et ses oligomères non réticulés sont alors extraits des matériaux. Les fractions solubles protéiques ont été quantifiées en incubant les matériaux à 37°C dans du tampon de synthèse. Un dosage protéique (Bradford) sur les surnageants permet ensuite de quantifier la proportion de protéines non réticulées (Figure 55).

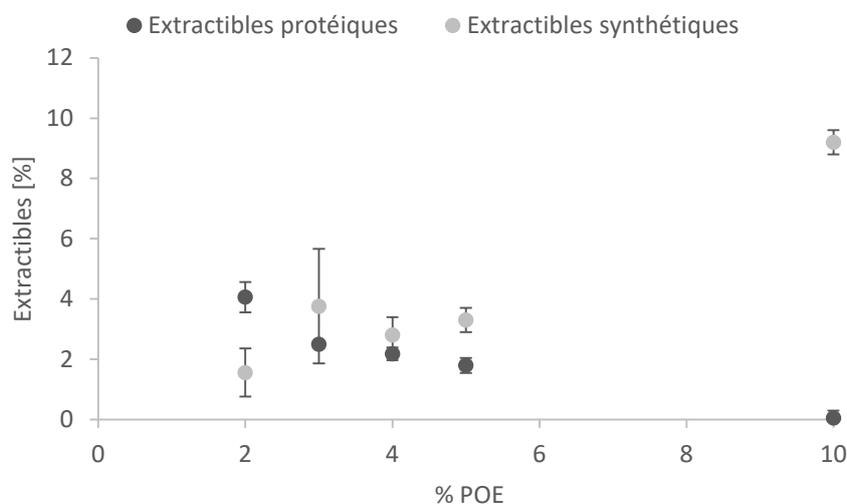


Figure 55 : fractions solubles protéiques (●) et synthétiques (●) contenues dans les coréseaux POE-BSA en fonction de la proportion en PEGDM.

Plus la proportion de POE introduite dans le réseau est importante, plus la fraction soluble en BSA est faible. Ainsi, la présence du PEGDM permet une meilleure copolymérisation des deux partenaires. Pour toutes les formulations, les fractions solubles protéiques sont inférieures ou égales à 4% (par rapport à la concentration totale en protéines dans le matériau), ce qui indique que l'albumine est correctement réticulée dans le matériau. La quantification de la fraction soluble synthétique a également été réalisée pour vérifier

que le PEGDM est correctement réticulé. Elle est inférieure à 5% pour tous les coréseaux et de l'ordre de 10% pour le réseau simple POE(10). Ces valeurs sont faibles et traduisent la bonne réticulation du polymère synthétique, en présence de l'albumine modifiée pour les coréseaux.

Ces matériaux, qui sont autosupportés, présentent des modules de stockage de l'ordre de 1000 à 2000 Pa, alors que les G'' sont de l'ordre de 300 Pa (Figure 56).

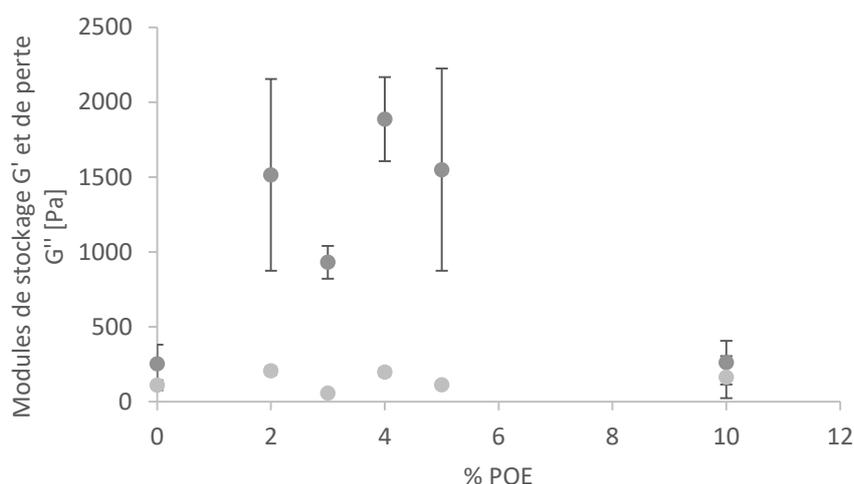


Figure 56 : modules viscoélastiques G' (●) et G'' (●) des coréseaux POE-BSA gonflés d'eau en fonction de leur proportion en POE.

Les modules de réseaux simples BSA et POE sont respectivement de 250 et 260 Pa, donc 10 fois plus faibles que ceux des coréseaux. La copolymérisation du PEGDM et de la BSAm permet donc d'obtenir des matériaux avec des modules plus élevés, traduisant une synergie des propriétés des deux composés. Cela indique donc que le PEGDM et la BSAm réticulent différemment en présence l'un de l'autre et dans le réseau simple. Il est donc très vraisemblable qu'ils soient effectivement bien copolymérisés *via* leurs groupements méthacrylate et non homopolymérisés côte-à-côte.

L'étape suivante est donc l'obtention des RIPs à base de fibrine intégrant ce coréseau POE-BSA.

3. Synthèse des RIPs POE-BSA/Fb

Les coréseaux POE-BSA ont ensuite été associés à un réseau de fibrine formé par clivage enzymatique du fibrinogène par la thrombine. Dans un premier temps, nous avons vérifié que la synthèse de ces RIPs est possible. Le principe de la synthèse est le même que celui qui a été utilisé pour la synthèse des RIPs PVA-BSA/Fb (cf. Chapitre 3). L'ensemble des précurseurs est mélangé dans la même solution, ensuite coulée dans

le moule décrit en Annexe B. Le moule est placé sous UV, à 37°C, pendant 1h. Un schéma récapitulatif de la synthèse est présenté sur la Figure 57.

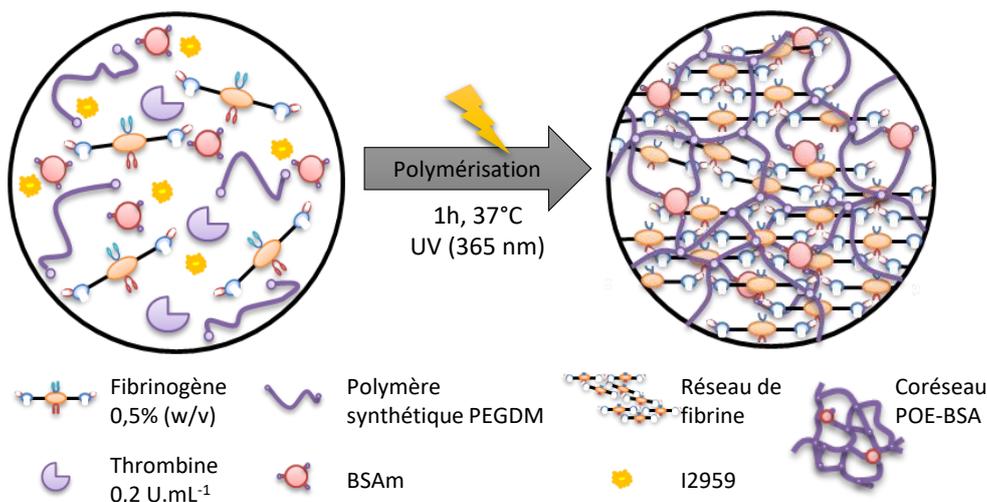


Figure 57 : schéma de la synthèse des RIPs coréseaux.

Pour toutes les formulations, la concentration en fibrine a été fixée à 5 mg.mL⁻¹, c'est-à-dire 0,5%, donc proche de la concentration physiologique de fibrine dans le sang. Le rapport thrombine(Tb)/fibrinogène(Fg) est fixé à 0,04 U.mg⁻¹ de Fg. Le coréseau POE-BSA représente 10% (P/V) du matériau, et comme précédemment, les 89,5% restants au moment de la synthèse sont constituées par le tampon aqueux et les sels nécessaires à la synthèse. Différentes proportions de PEGDM (de 2 à 8%) ont été étudiées et la BSA complète le mélange de façon à atteindre une proportion de 10%. Les matériaux seront par la suite désignés de la façon suivante : RIP POE(x)BSA(y)/Fb, où x est un chiffre compris entre 2 et 5 et x+y =10. Des RIPs BSA(10)/Fb et POE(10)/Fb ont également été synthétisés et seront utilisés comme référence.

3.1. Optimisation de la proportion d'amorceur

L'amorceur de polymérisation utilisé est l'Irgacure 2959 (I₂₉₅₉). Afin d'optimiser la réticulation des matériaux, l'impact de la proportion d'amorceur, sur les fractions solubles, d'une part, et sur les valeurs de module de stockage des matériaux, d'autre part, a été étudié. Dans un premier temps, deux séries de matériaux ont été synthétisées avec des concentrations différentes (0,042 et 0,21% (w/v)) mais constantes d'amorceur pour toutes les compositions PEGDM/BSAm. Les rapports molaires amorceur/méthacrylate étaient donc différents pour chaque composition de RIP (Tableau 3), mais aussi les proportions de POE.

Composition	Moles méthacrylate	Mole I ₂₉₅₉	Rapport méthacrylate:I ₂₉₅₉	Mole I ₂₉₅₉	Rapport méthacrylate:I ₂₉₅₉
BSA(10)/Fb	$7,25 \cdot 10^{-5}$	$1,9 \cdot 10^{-6}$	38	$9,5 \cdot 10^{-6}$	8
POE(2)BSA(8)/Fb	$1,17 \cdot 10^{-4}$		62		12
POE(3)BSA(7)/Fb	$1,40 \cdot 10^{-4}$		73		15
POE(4)BSA(6)/Fb	$1,62 \cdot 10^{-4}$		85		17
POE(5)BSA(5)/Fb	$1,84 \cdot 10^{-4}$		97		19
POE(10)/Fb	$2,94 \cdot 10^{-4}$		155		31

Tableau 3 : moles de méthacrylate, d'I₂₉₅₉, et rapport méthacrylate:I₂₉₅₉ pour les deux séries de RIP POE-BSA/Fb synthétisées avec une masse d'I₂₉₅₉ constante.

Les deux séries de matériaux ont ensuite été caractérisées, en mesurant leurs extractibles protéiques d'abord et puis leurs extractibles synthétiques (Figure 58).

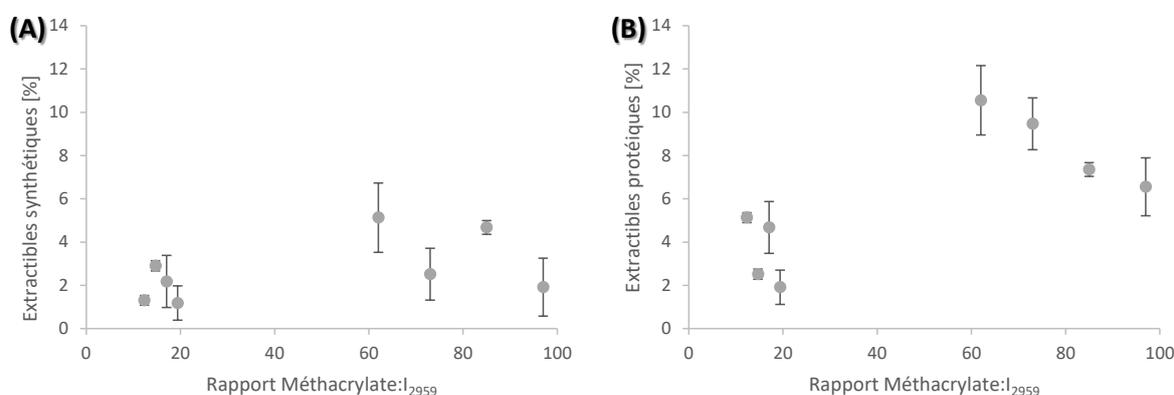


Figure 58 : Extractibles (A) synthétiques et (B) protéiques en fonction du rapport méthacrylate/I₂₉₅₉.

Les valeurs d'extractibles synthétiques sont inférieures à 6% quel que soit le rapport molaire méthacrylate/I₂₉₅₉. Bien que faible, cette valeur traduit le fait qu'une petite proportion de dérivés du PEG (PEGDM, oligomère de PEGDM, ...) peut être extraite des RIPs avec un solvant organique. La réticulation du PEGDM est toutefois correcte.

Parallèlement, sans tenir compte de la nature des composés extraits, plus la quantité d'amorceur introduite est importante, plus la proportion d'extractibles protéiques est faible. Les valeurs des extractibles protéiques sont comprises entre 6 et 15% lorsque le rapport molaire est supérieur à 30. Elles restent inférieures à 15% quand le rapport molaire méthacrylate/Irgacure est inférieur à 20. L'augmentation de la concentration d'amorceur permet donc aussi de diminuer significativement la quantité d'extractibles protéiques contenue dans les RIPs POE-BSA/Fb.

Pour une proportion de POE (ou de BSA) donnée dans le RIP POE-BSA/Fb, les extractibles protéique ou synthétique diminuent systématiquement lorsque le rapport méthacrylate /I₂₉₅₉ augmente.

Ces premiers résultats ont été complétés par une évaluation des modules viscoélastiques des précédents RIPs POE-BSA/Fb gonflés dans du tampon Tris (Figure 59).

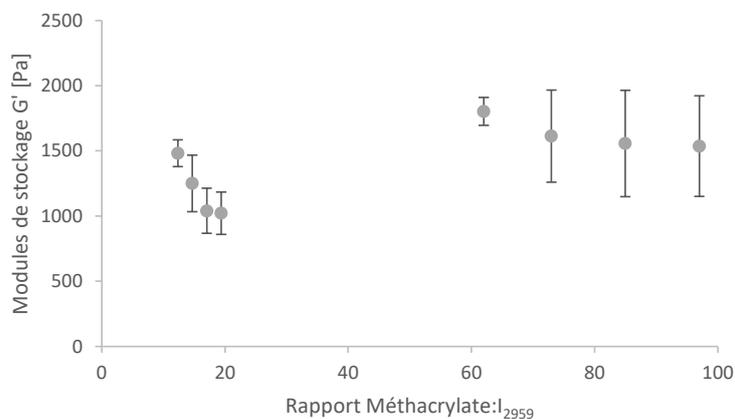


Figure 59 : modules de stockage des RIPs POE-BSA/Fb en fonction du rapport méthacrylate/Irgacure utilisé pour leur synthèse.

L'effet de l'augmentation de la concentration d'amorceur sur les modules de stockage des RIPs POE-BSA/Fb est difficile à évaluer. Le module passe de 1000 à plus de 1800 Pa lorsque le rapport molaire méthacrylate/Irgacure diminue de 31 à 12 et simultanément la proportion de POE de 10 à 2 et de 500 à 1500 Pa s'il varie de 40 à 100. L'augmentation de la proportion d'I₂₉₅₉ a donc une légère influence sur l'architecture du réseau. Une quantité d'amorceur plus élevée semble conduire à des modules viscoélastiques légèrement plus faibles, ce qui se traduirait par une densité de réticulation du coréseau plus faible.

L'augmentation de la concentration d'amorceur permet, d'une part, de diminuer les extractibles (tant protéiques que synthétiques) mais semble n'avoir qu'un effet modéré sur les propriétés viscoélastiques. Pour la suite de ce travail, nous avons décidé de travailler avec un rapport de 1 mole d'I₂₉₅₉ pour 16 moles de méthacrylate.

3.1. Influence du temps de polymérisation

Nous avons ensuite cherché à optimiser le temps de photopolymérisation nécessaire à la synthèse des RIPs POE-BSA/Fb. En effet, si l'on souhaite ensuite encapsuler des cellules dans ces RIPs, il est préférable que le temps d'exposition aux UV soit minimal. De plus, dans la littérature, les temps d'exposition aux UV des hydrogels formés par photopolymérisation excèdent rarement 15 min ^{31,58,59,78,197,198,221}. Nous avons donc réduit ce temps d'exposition aux UV à 5, 15 ou 30 min (au lieu d'une heure). Ensuite, les matériaux sont

placés à 37°C dans une étuve, pendant le temps restant pour atteindre 1h. Les fractions solubles ainsi que les propriétés viscoélastiques de ces différents matériaux ont été évaluées.

Il faut noter que le RIP POE(10)/Fb ne se forme pas correctement pour des temps d'exposition aux UV inférieurs à 20 min (le temps de gel de cet échantillon - cf.§ 3.2).

Dans un premier temps, les fractions solubles synthétiques et protéiques ont été quantifiées en fonction du temps d'exposition aux UV (Figure 60).

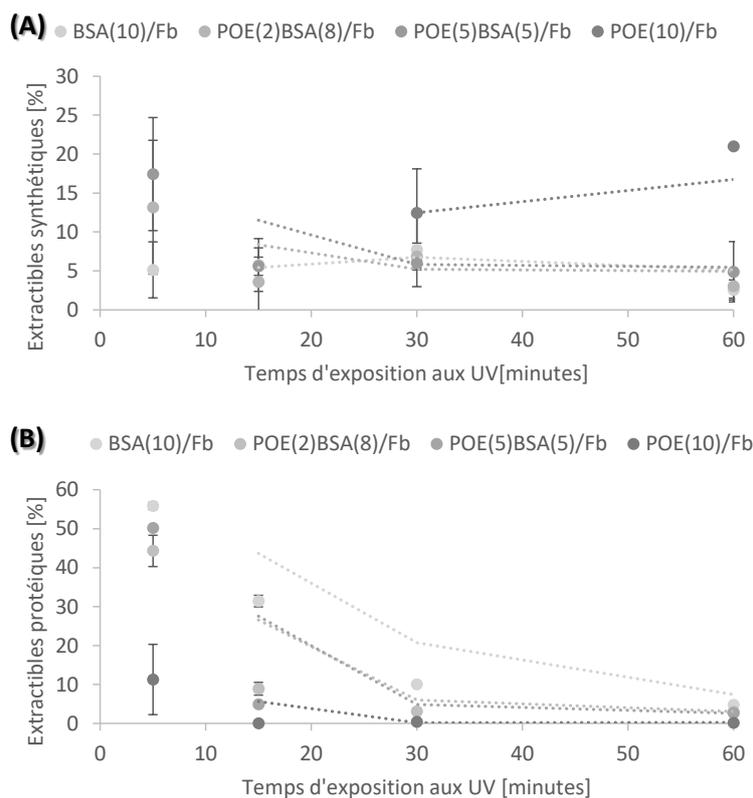


Figure 60 : extractibles (A) synthétiques et (B) protéiques contenus dans les RIPs POE-BSA/Fb en fonction du temps d'exposition aux UV (365 nm) au cours de leur synthèse à 37°C pendant 1h.

Quelle que soit la composition des RIPs, les extractibles synthétiques et protéiques augmentent lorsque la durée d'exposition aux UV diminue, notamment en dessous de 30 min. La polymérisation radicalaire ne pouvant se dérouler qu'en présence des UV, elle n'a pas le temps nécessaire pour conduire à une réticulation correcte de tous les macromères sur un temps court. Les molécules de PEGDM ou ses oligomères, d'une part (extractibles synthétiques) et la BSA, d'autre part (extractibles protéiques), peuvent être extraites des matériaux. Même si les temps de gel des RIPs sont de l'ordre de 3 à 6 min (cf.§ 3.2 Figure 63), cette durée n'est pas suffisante pour assurer une réticulation complète du coréseau POE-BSA.

Si l'on souhaite encapsuler des cellules dans ces matériaux, il peut donc être envisagé de réduire le temps d'irradiation à 30 min au lieu d'une heure sans augmenter significativement les extractibles synthétiques et protéiques, mais il ne semble pas judicieux de diminuer en-deçà de 30 min la durée d'exposition.

Les modules de stockage de ces matériaux gonflés de tampon Tris ont été mesurés (Figure 61).

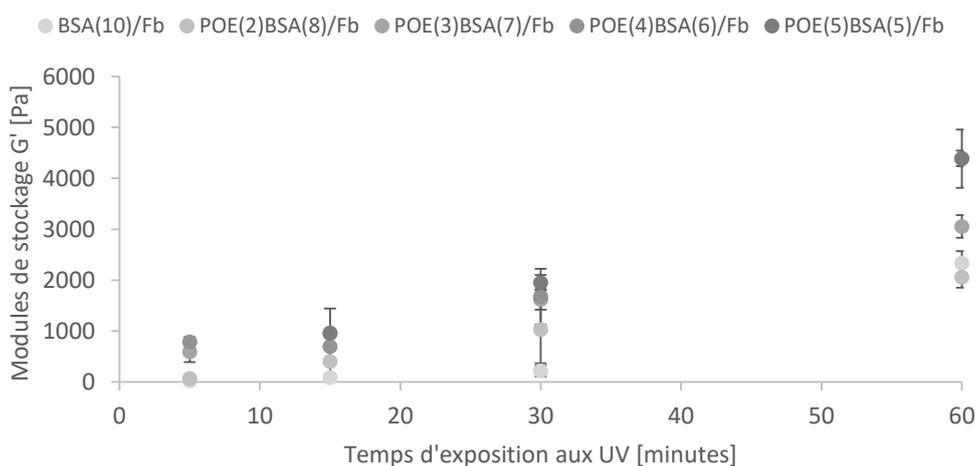


Figure 61 : modules de stockage dans les RIPs POE-BSA/Fb en fonction du temps d'exposition aux UV (365 nm) au cours de leur synthèse à 37°C pendant 1h.

Il est clair que plus le temps d'exposition aux UV est long, plus les modules de stockage des RIPs sont élevés. Les modules les plus élevés sont obtenus pour les matériaux exposés 1 h aux UV, ce qui est logique puisque ces matériaux sont alors correctement réticulés (extractibles synthétiques et protéiques moins élevés). En effet, une augmentation de la densité de réticulation se traduit généralement par des modules de stockage plus élevés.

Une durée d'exposition aux UV d'une heure permet donc d'obtenir les matériaux avec les modules de stockage les plus élevés et des taux de fractions solubles plus faibles. La Figure 61 pourrait laisser penser que des temps d'exposition aux UV encore plus longs permettraient d'atteindre des valeurs de module plus élevées. Des matériaux ont donc été synthétisés en leur imposant, à 37°C, une exposition aux UV de 2h (Figure 62).

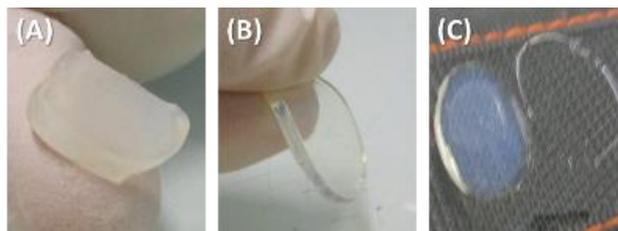


Figure 62 : photos de matériaux exposés aux UV (365 nm) pendant 2h à 37°C: (A) POE(5)BSA(5)/Fb (B) BSA(10)/Fb et (C) trace d'assèchement sur la partie supérieure du moule.

En sortie de synthèse, le RIP POE(5)BSA(5)/Fb a un aspect similaire à celui qui a été exposé 1h aux UV. Une différence notable est cependant observée lors de sa manipulation : il est bien plus rigide et cassant. Par ailleurs, la partie supérieure du moule présente une trace de matière asséchée et collée, correspondant au contour du matériau : cela est particulièrement visible pour le RIP BSA(10)/Fb (Figure 62C). L'exposition aux UV pendant plus d'une heure induit donc un assèchement du matériau, ainsi qu'une augmentation de sa rigidité et de sa fragilité.

La durée de polymérisation a donc été fixée à 1h, puisque cette durée permet de minimiser les fractions solubles tout en limitant l'assèchement du matériau. Ce temps est long par rapport à ce qui est pratiqué pour la synthèse d'hydrogels par photopolymérisation, mais la puissance de la lampe utilisée est faible ($1,16 \text{ mW.cm}^{-2}$, alors que les lampes utilisées pour les photopolymérisations ont généralement des puissances 3 à 5 fois plus élevées ^{77,81,178,205}).

Ayant fixé la proportion d'amorceur ainsi que la durée d'exposition aux UV, la caractérisation de ces RIPs POE-BSA/Fb a été entreprise.

3.2. Suivi de la formation des matériaux

La formation des hydrogels a ensuite été suivie par rhéologie. Pour cela, la solution de précurseurs est placée dans le rhéomètre. Elle est exposée aux UV (365 nm) par le dessous (cf Annexe B, partie expérimentale, Figure 141) et thermostatée à 37°C de sorte que la polymérisation radicalaire, d'une part, et la réaction enzymatique, d'autre part, se déroulent de façon concomitante. L'instant initial correspond au moment où la lampe UV est allumée. Les modules de stockage (G') et de perte (G'') sont mesurés au cours du temps (Figure 63A).

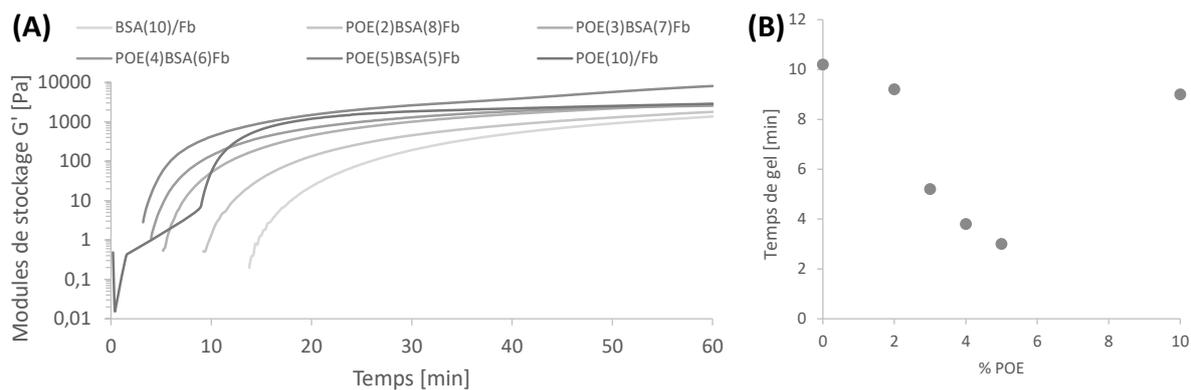


Figure 63 : (A) Allure des courbes de G' au cours du temps ; (B) Temps de gel des différents matériaux en fonction de leur proportion massique en POE.

Trois phases peuvent être distinguées pour toutes ces cinétiques de gélification. Dans un premier temps, les modules de stockage G' sont extrêmement faibles voir nuls. Cette grandeur caractérise la rigidité d'un matériau viscoélastique et, lorsqu'elle est faible, mais surtout inférieure au module de perte, l'échantillon n'a pas encore franchi la transition sol-gel. La deuxième phase correspond à un accroissement rapide du module de stockage qui passe de 1 à plus de 1 000 Pa en moins de 15 minutes ; le module G' devient alors supérieur au module G'' et le matériau gélifie. Le nombre de nœuds de réticulation s'accroît et engendre une augmentation de la rigidité du matériau. Enfin, dans la dernière partie de la courbe, la croissance du G' ralentit. Cette stabilisation correspond à la fin de la réticulation, la plupart des fonctions réactives ayant réagi, la densité de réticulation augmente peu et le gel acquiert sa morphologie finale. Ces 3 phases sont observées quelle que soit la formulation. De légères différences existent cependant : la valeur du module de stockage atteinte au bout d'une heure est d'autant plus élevée que la proportion de POE est élevée dans les RIPs POE-BSA/Fb. Ainsi, le module G' du RIP POE(2)BSA(8)/Fb en fin de synthèse est de 1790 Pa et de 8060 Pa pour le RIP POE(5)BSA(5)/Fb.

La Figure 63C présente les temps de gel mesurés lorsque $G' = G''$, donc au moment où l'amas percolant est suffisamment étendu dans la solution pour former un gel insoluble. Le point de gel est atteint après 3 min d'exposition aux UV pour le RIP POE(5)BSA(5)/Fb, le RIP contenant le plus de POE. Le temps de gel augmente lorsque la proportion de POE diminue jusqu'à atteindre une valeur de 10 min pour un RIP BSA(10)/Fb. Par contre, le RIP POE(10)/Fb ne gélifie qu'après 10 min d'irradiation. Une augmentation des modules est toujours observée, même après 60 min sous les UV, ce qui traduit le fait que les polymérisations ne sont pas encore terminées. Ceci est en accord avec les modules de stockage mesurés ex-situ (cf. § 4.1.3). Cependant, les modules mesurés *in situ* sont différents de ceux mesurés sur des matériaux gonflés, car l'épaisseur n'est pas la même (105 μm pour les matériaux gélifiés *in situ* et plus de 1,5 mm pour un matériau

gonflé). De plus, un flux d'air circule dans le rhéomètre et, malgré l'utilisation d'un dispositif anti-évaporation, les matériaux se dessèchent au cours de leur synthèse dans le rhéomètre.

Ces mesures confirment qu'une heure d'irradiation est bien la durée minimale pour la synthèse de matériaux correctement réticulés.

4. Caractérisation des RIPs

Les hydrogels obtenus après 1h de polymérisation sous UV à 37°C sont présentés sur la Figure 64.

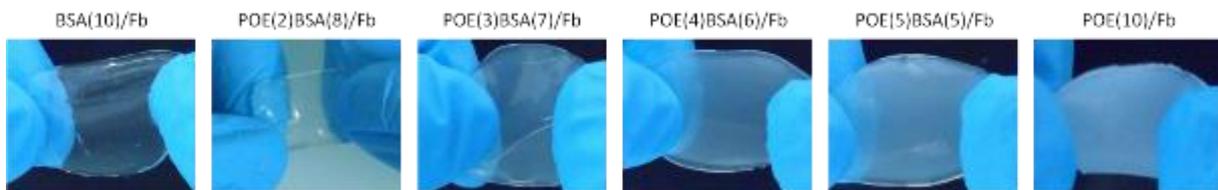


Figure 64 : aspect des matériaux en sortie de synthèse.

Tous ces matériaux ont correctement gélifié, et sont aisément manipulables. Ils sont translucides voire transparents et résistent bien à des sollicitations manuelles. Le RIP BSA(10)/Fb est assez souple mais moins résistant à la déchirure que les autres. Le RIP POE(10)/Fb est, quant à lui, résistant, mais il supporte mal la courbure : il tend à se déchirer lorsqu'on le replie sur lui-même. Par contre, les différents RIPs POE(x)BSA(y)/Fb peuvent être déformés de façon réversible.

4.1. Caractérisation de l'architecture RIP

4.1.1. Formation du réseau de fibrine

La première étape de caractérisation de l'architecture RIP consiste à vérifier que le réseau de fibrine s'est correctement formé dans le matériau. Pour cela, les gels sont placés dans un tampon de dégradation chimique pendant 72h à 37°C. Les surnageants sont ensuite analysés en électrophorèse SDS-PAGE puis les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Un Western Blot contre le Fibrinogène est enfin effectué (Figure 65).

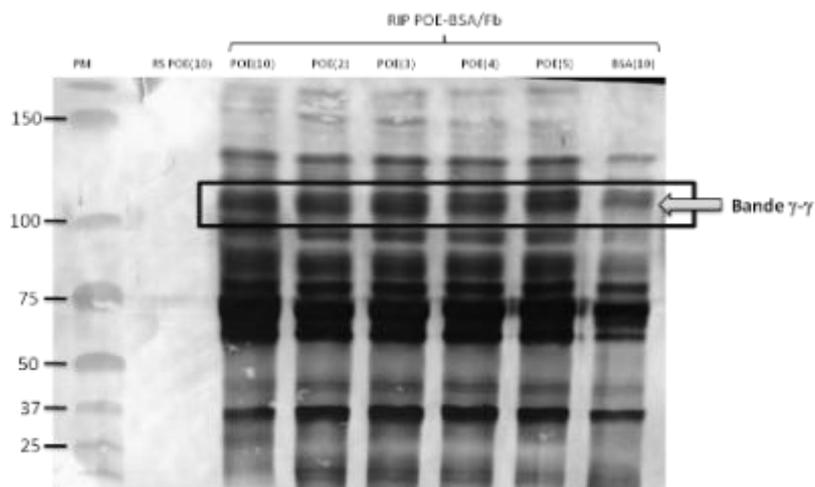


Figure 65 : Membrane de nitrocellulose après révélation au kit AP color des surnageants de dégradation chimique d'un réseau simple de POE, d'un RIP POE(10)/Fb, des différents RIPs POE(x)BSA(y)/Fb et d'un RIP BSA(10)/Fb.

Après la révélation, la bande dite « bande γ - γ », spécifique de l'action de la thrombine sur le fibrinogène conduisant à l'appariement des molécules de fibrine, est détectée à 105 kDa environ²²². Cette bande est observée pour tous les RIPs POE-BSA/Fb, alors qu'elle est absente des surnageants du réseau simple POE(10). Cela nous confirme que l'action enzymatique de la thrombine est efficace sur le fibrinogène lors de la synthèse de ces matériaux. La présence du PEGDM et de la BSA n'empêche donc pas la formation du réseau de Fibrine.

4.1.2. Formation du coréseau POE-BSA

Afin de vérifier que les coréseaux sont correctement formés, les fractions solubles synthétiques et protéiques ont été quantifiées (Tableau 4).

	Extractibles protéiques (%)	Extractibles synthétiques (%)
BSA(10)/Fb	4,77 ± 0,18	2,56 ± 1,28
POE(2)BSA(8)/Fb	2,98 ± 0,26	3,04 ± 1,55
POE(3)BSA(7)/Fb	3,18 ± 0,16	1,22 ± 0,82
POE(4)BSA(6)/Fb	2,82 ± 0,56	0,70 ± 0,11
POE(5)BSA(5)/Fb	2,62 ± 0,50	4,88 ± 3,87
POE(8)BSA(2)/Fb	6,54 ± 2,84	-
POE(10)/Fb	0,14 ± 0,20	20,85 ± 0,18

Tableau 4 : Fractions solubles protéiques et synthétiques contenues dans les différents RIPs.

La quantité d'extractibles protéiques diminue significativement lorsque la proportion de PEGDM introduite augmente. Les protéines semblent donc davantage retenues dans le réseau. Cela tend à prouver que les méthacrylates du PEGDM et de la BSA copolymérisent, formant le coréseau souhaité. L'albumine

étant une protéine très volumineuse de 650 kDa, il lui est peut-être difficile d'établir des liaisons covalentes via les méthacrylates avec d'autres molécules d'albumine. La présence du PEGDM de masse molaire 750 g.mol⁻¹, doit faciliter la réticulation en formant des chaînes de polymère entre les molécules d'albumine.

Quant aux fractions solubles synthétiques, les valeurs sont très similaires et très faibles, quelle que soit la proportion de PEGDM introduite. Elles représentent moins de 5% de masse sèche du matériau. Le PEGDM est donc bien réticulé dans ces hydrogels et la présence de la BSAm ne l'empêche pas de former des liaisons covalentes. Par contre, une valeur assez élevée (20%) est mesurée pour le RIP POE(10)/Fb, alors que cette valeur n'est que de 4,5% lorsque la proportion en Irgacure est plus faible (1 mole d'Irgacure pour 86 moles de méthacrylate)²¹³. De plus, nous avons vérifié que les proportions de fractions solubles ne sont pas liées à la concentration en fonctions réactives. En effet, leurs valeurs sont sensiblement les mêmes, quelle que soit la concentration en fonctions méthacrylate

La quantification des fractions solubles n'est pas systématiquement décrite dans la littérature. Pour des hydrogels de protéines réticulés avec du glutaraldéhyde, elles sont de l'ordre de 5 à 9%^{223,224}. Pour des hydrogels formés par photopolymérisation, les valeurs sont, en général, plus élevées (18% pour des gels de PVA modifié par des groupements méthacrylate²²⁵ et entre 40 et 70% pour des gels de PVA avec des segments d'acide lactique²²⁶). Les valeurs obtenues pour nos RIPs POE-BSA/Fb sont donc faibles. La diffusion de composés de faible masse molaire hors des hydrogels doit être limitée au maximum pour l'utilisation *in vivo*⁶⁷, ce qui est le cas pour ces matériaux.

4.1.3. Propriétés viscoélastiques

4.1.3.1. Formation du coréseau POE-BSA

Les propriétés viscoélastiques des différents RIPs gonflés en sortie de synthèse dans un tampon Tris 50mM ont également été étudiées (Figure 66).

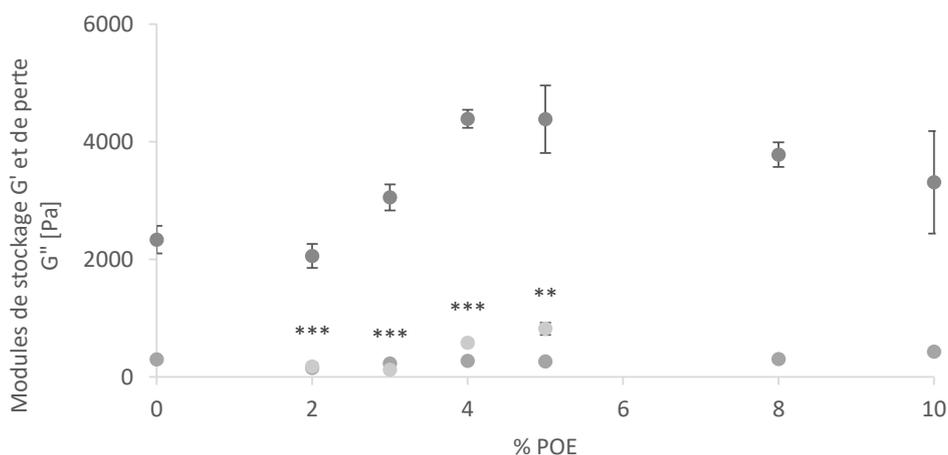


Figure 66 : Modules de stockage G' (●) et de perte G'' (●) des différents RIPs POE-BSA/Fb gonflés en tampon Tris 50 mM, mesurés en cisaillement, avec $f = 1$ Hz et $\gamma = 1\%$, ainsi que les modules de stockage pour certaines formulations de matériaux synthétisés avec de l'albumine non modifiée (●).

Le module de stockage G' de tous les RIPs est supérieur à 2 kPa, ce qui est cohérent avec le caractère autosupporté et manipulable des matériaux. Il faut rappeler que le module de stockage d'un gel de fibrine est compris entre 30 et 80 Pa^{164,213}. Son module est donc multiplié par un facteur 25, ce qui est considérable. Comme nous l'avons montré préalablement avec le PVA (cf. Chapitre 2), incorporer le gel de fibrine au sein d'une architecture RIP permet d'obtenir un matériau aisément manipulable et résistant à la déformation. Comme attendu, le module de stockage de ces matériaux augmente avec leur proportion de POE. Ainsi, le RIP POE(2)BSA(8)/Fb a un module de 2060 Pa alors que le RIP POE(5)BSA(5)/Fb a un module de 4400 Pa, soit près du double. Curieusement, le RIP POE(10)/Fb présente un module viscoélastique légèrement plus faible (3300 Pa) que celui des RIPs. Macroscopiquement, comme cela été dit précédemment, ces matériaux RIP POE(10)/Fb sont plus cassants lors de la courbure. Les modules de stockage des RIPs POE-BSA/Fb contenant plus de 2% de POE sont supérieurs aux modules des RIPs ne contenant pas ce réseau (RIP POE(10)/Fb et RIP BSA(10)/Fb). Comme cela été observé sur les propriétés viscoélastiques des coréseaux POE-BSA (cf. § 2), nous retrouvons ici une légère synergie apportée par le coréseau dans les RIPs. La copolymérisation du PEGDM et de la BSA_m est donc bien conservée dans ces conditions.

Afin de confirmer ces résultats, des RIPs similaires ont été synthétisés avec de l'albumine non modifiée (sans fonction méthacrylate). Leurs modules augmentent alors de 120 à 800 Pa lorsque la proportion en POE augmente de 3 à 5%. Ils sont donc 5 à 10 fois faibles lorsque la BSA ne peut pas copolymériser avec le PEGDM. Ces résultats confirment donc bien la copolymérisation de la BSA_m avec le PEGDM lors de la synthèse des RIPs POE-BSA/Fb.

Cette copolymérisation du PEGDM et de la BSA_m dans les RIP POE-BSA/Fb se traduit aussi sur les modules mécaniques des matériaux à l'état sec. Les évolutions des modules de stockage (E') et de perte (E'') ont été mesurées en fonction de la température par analyse thermomécanique en mode tension (DMTA). Le facteur de perte $\tan\delta$ ($= E''/E'$ caractéristique de l'amortissement) est calculé à partir de ces mesures. Pour réaliser ce type de mesure, les matériaux doivent préalablement être séchés. Le RIP BSA(10)/Fb n'a pas pu être analysé car, après séchage, il devient très fragile et cassant et sa mise en place dans les mors provoque son éclatement en fragments.

Les échantillons subissent une rampe de température allant de -70°C à 200°C ($3^{\circ}\text{C}/\text{min}$) au cours de laquelle ils sont soumis à une déformation de 0,05% à une fréquence de 1Hz. Pour comparer les matériaux entre eux, leurs modules de stockage ont tous été normalisés à 3000 MPa à basse température lorsqu'ils sont dans un état vitreux.

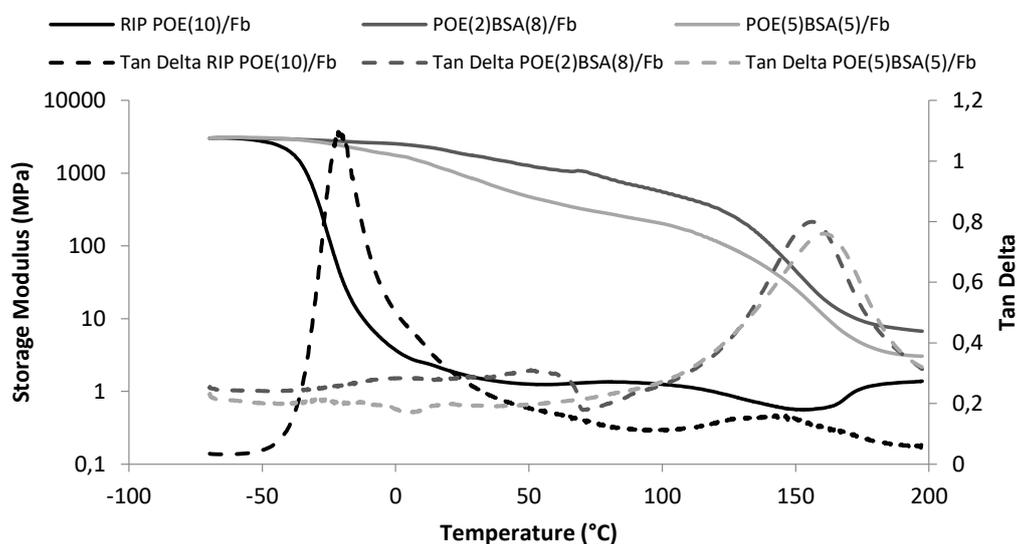


Figure 67 : Module de stockage (courbes pleines) and $\tan\delta$ (courbes pointillées) de RIPs POE-BSA/Fb secs.

Le module de stockage du RIP POE(10)/Fb décroît de 3000 à 0,3MPa entre -45 et 25°C . Cette diminution correspond à une relaxation mécanique par l'apparition de mouvements coopératifs des chaînes de POE. Simultanément un pic de $\tan\delta$ est détecté avec un maximum à $T_{\alpha} = -22^{\circ}\text{C}$, température qui correspond à la relaxation mécanique de ce polymère. Au-delà de cette relaxation, le RIP POE(10)/Fb est alors dans un état caoutchoutique. Ces résultats sont en accord avec le comportement déjà observé précédemment de ce matériau⁴.

Les comportements mécaniques des RIPs POE(2)BSA(8)/Fb et POE(5)BSA(5)/Fb ont également été étudiés. Leurs modules de stockage diminuent légèrement à partir de -20°C et jusqu'à 130°C . Ils passent

alors de 3000 à 180 MPa pour le RIP POE(2)BSA(8)/Fb et de 3000 à 80 MPa pour le RIP POE(5)BSA(5)/Fb. Aucune $\tan \delta$ n'est donc visible sur cette plage de température car la relaxation mécanique des chaînes de POE détectée dans le RIP POE(10)/Fb a disparu dans ces RIPs. Ces analyses confirment que la phase riche en POE ne se comporte pas comme s'il s'agissait d'une phase pure et que le PEGDM a donc copolymérisé avec l'albumine. Pour des températures supérieures à 100°C, les valeurs des modules des deux RIPs chutent significativement et un pic de $\tan \delta$, situé à $T\alpha = 160^\circ\text{C}$, est détecté. Cette relaxation mécanique n'est pas observée pour le RIP POE/Fb. Elle correspond donc probablement à l'albumine qui aurait subi des modifications conformationnelles importantes à haute température.

4.1.3.2. Effet de la présence du réseau de fibrine

L'influence du réseau de fibrine sur les modules mécaniques peut également être évaluée en comparant les valeurs de coréseau POE-BSA (cf. § 2) et celles des RIPs POE-BSA/Fb (Figure 68).

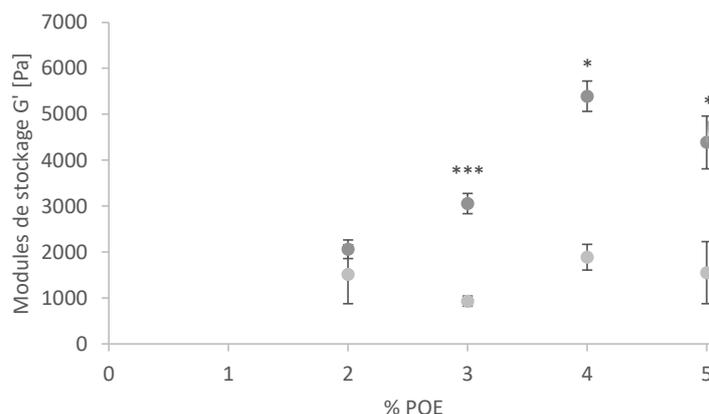


Figure 68 : comparaison des modules de stockage des coréseaux POE-BSA (●) et des RIPs POE-BSA/Fb (●).

Il n'y a pas de différence significative entre les modules de stockage du coréseau POE(2)BSA(8) et celui du RIP POE(2)BSA(8)/Fb correspondant. Cependant, pour des proportions plus élevées en POE, la différence est importante. La présence du réseau de fibrine augmente d'un facteur 2,5 en moyenne les modules de stockage. Cela reflète la présence de deux réseaux au sein du matériau, chacun apportant une contribution aux propriétés viscoélastiques. Cela ne peut être accompli qu'au moyen d'une architecture RIP.

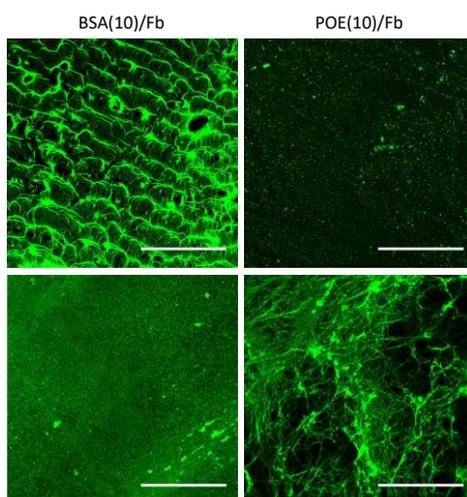
L'influence de la rigidité d'un substrat sur le comportement cellulaire est bien connue²²⁷⁻²³¹. La rigidité des tissus *in vivo* varie de quelques centaines de Pa dans le tissu adipeux et le cerveau jusqu'à plusieurs MPa et GPa dans les os (Figure 21)²³¹. La rigidité de la matrice détermine à quel point la cellule peut déformer son environnement. Elle joue donc un rôle important dans la capacité de migration des cellules et l'efficacité de ce processus²²⁷. La variation des proportions de POE (et simultanément d'albumine) dans les

RIPs POE-BSA/Fb permet de modifier aisément leurs modules viscoélastiques. Des résultats similaires ont été observés pour des hydrogels synthétiques de POE⁵⁶ ou naturels d'acide hyaluronique et collagène associés en RIP⁷⁹. Les propriétés viscoélastiques de RIPs POE-BSA/Fb pourront donc être modulées en fonction du type cellulaire cultivé à leur surface, donc de l'application souhaitée. Les valeurs de modules disponibles, variant de 2 à 5 kPa, sont fréquemment retrouvées dans la littérature pour des matériaux synthétisés à partir de macromolécules de la matrice extracellulaire en architecture RIP^{80,201,202,205}.

4.1.4. Morphologie des phases dans les matériaux

4.1.4.1. Répartition de la phase protéique

Dans le but de vérifier que la répartition du réseau de fibrine dans les matériaux est bien homogène, un immunomarquage a été réalisé. En raison de notre procédé de synthèse, les matériaux sont produits en irradiant uniquement une de leurs faces. Les échantillons devant être suffisamment épais pour être manipulés (1mm), il est possible que la polymérisation des méthacrylates ne soit pas identique sur les deux faces du matériau final. Nous avons donc imagé les deux faces afin d'évaluer cette éventuelle différence (Figure 69).



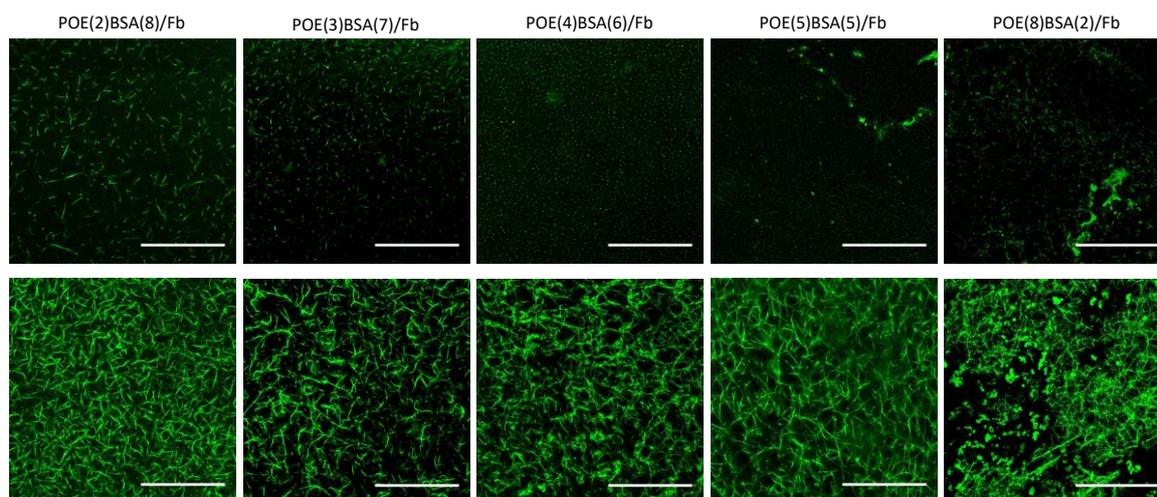


Figure 69 : immunomarquage du réseau de fibrine au sein des RIPs POE-BSA/Fb. La ligne du haut rassemble les clichés de la face « exposée aux UV » et la ligne du bas regroupe les clichés de la face « côté Téflon ».

Note : la face nommée « côté Téflon » est la face inférieure du matériau non directement exposée aux UV et en contact avec la pastille de Téflon délimitant la taille et la forme de l'échantillon.

La morphologie du réseau de fibrine n'est pas la même sur les deux faces des matériaux. « Côté Téflon », on observe la morphologie classique c'est-à-dire un ensemble de mailles régulièrement disposées et formant un réseau continu. La taille des fibres de fibrine varie en fonction de la composition du RIP. Pour résumer, plus la proportion en POE dans le matériau est importante, plus la taille des fibres augmente. À la surface immédiate de la face exposée aux UV, le réseau de fibrine dans les RIPs POE-BSA/Fb ne ressemble pas à celui qui est observé « côté Téflon ». En effet, la fibrine prend plutôt un aspect punctiforme, et bien que régulièrement répartie, elle ne semble pas former un réseau à proprement parler. En revanche, quelques microns en-dessous de la surface, le réseau de fibrine ressemble fortement à celui qui est visualisé sur le côté « Téflon ». Enfin, la morphologie du réseau de fibrine, qualifiée de structure « en nid d'abeille », observée du côté exposé aux UV du RIP BSA(10)/Fb ressemble fortement à ce qui avait été observée par L. Bidault ²³². Il n'avait toutefois pas différencié les faces des matériaux lors de son étude.

La différence de la morphologie des faces peut être expliquée par le fait que seule l'une des faces du matériau est exposée aux UV. De ce côté-là, la décomposition de l'amorceur libre des radicaux libres qui amorcent la copolymérisation du PEGDM et de la BSA_m. Cette copolymérisation se propage ensuite, à partir de cette face, à l'ensemble du matériau. Il est donc possible que ce côté du matériau soit plus riche en coréseau POE-BSA que l'autre face. « Côté Téflon », la formation du réseau de fibrine a vraisemblablement lieu en premier, conduisant à la formation d'une face riche en fibrine. Le matériau serait donc constitué d'une face plus riche en coréseau POE-BSA et d'une face plus riche en fibrine, un gradient de composition existant certainement entre les deux faces.

4.1.4.2. Morphologie générale

L'étude de la morphologie des différents matériaux a été complétée par des images de microscopie électronique à balayage (Figure 70 et Figure 71). Les échantillons sont immergés dans l'azote liquide avant d'être imagés sous vide. Même s'il a été prouvé que cette méthode permet de conserver la morphologie intacte ²³³, il faut garder à l'esprit que des artefacts liés à la déshydratation sont possibles.

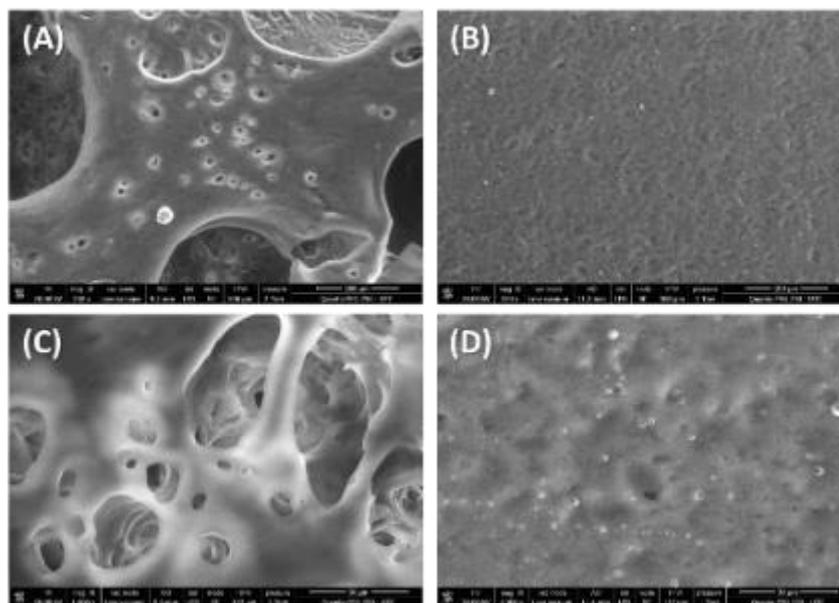


Figure 70 : images en microscopie électronique à balayage de (A) et (C) le RIP BSA(10)/Fb et (B) et (D) le RIP POE(10)/Fb. Pour les images (A) et (B) la barre correspond à 300 μm et à 30 μm pour les images (C) et (D). Ces échantillons ont subi une congélation-flash dans du N_2 liquide avant d'être placés dans l'enceinte sous vide du MEB.

Le RIP BSA(10)/Fb a une morphologie poreuse où semblent coexister des pores assez larges (environ 500 μm) et des micropores (entre 10 et 35 μm). Un tel matériau pourrait être aisément colonisé par des cellules, puisque la taille des grands pores sont bien supérieure à 100 μm , taille minimale permettant la colonisation cellulaire ^{234,235}. Le RIP POE(10)/Fb présente une structure beaucoup plus compacte, sans pores détectés. À cette concentration de POE, le matériau semble très dense. Dans la littérature, des hydrogels à 25% de PEG, bien que préparés par une autre méthode (fixation par glutaraldéhyde et déshydratation dans l'éthanol), présentent une morphologie très similaire, sans porosité visible ²³⁶. Ce type de morphologie est peu propice à la colonisation cellulaire en raison de l'absence de porosité, et de la nature du polymère, le POE, connu pour limiter l'adhérence cellulaire ¹¹⁵.

La morphologie des RIPs POE-BSA/Fb a ensuite été imagée (Figure 71).

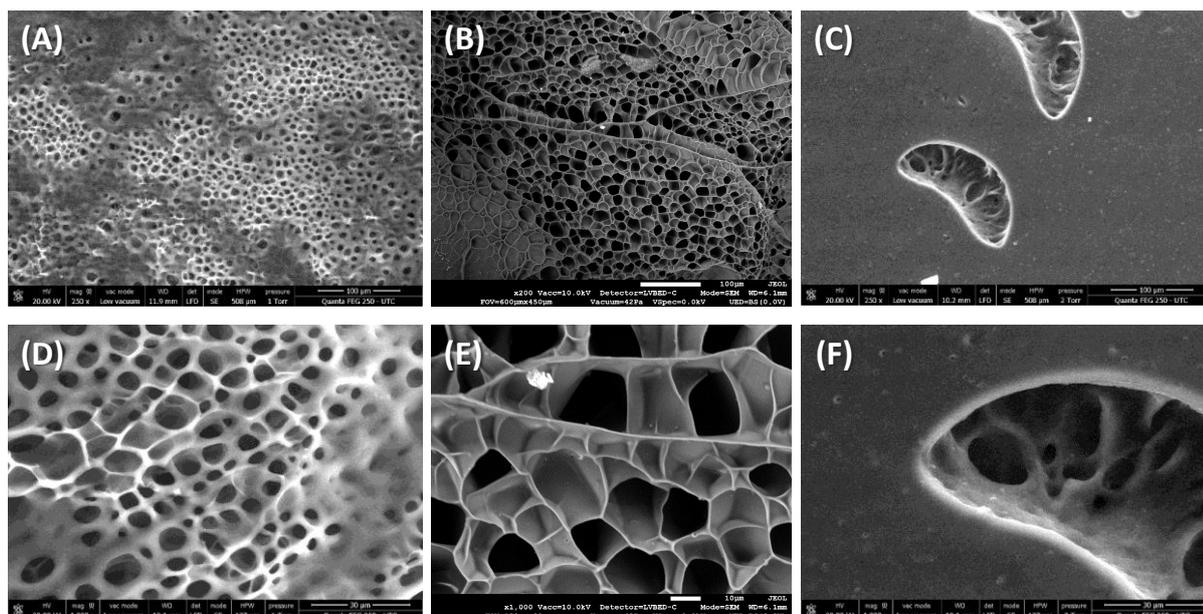


Figure 71 : images en microscopie électronique à balayage de (A) et (D) RIP POE(2)BSA(8)/Fb ; (B) et (E) le RIP POE(5)BSA(5)/Fb ; (C) et (F) RIP POE(8)BSA(2)/Fb. Pour les images (A) à (C) la barre correspond à 300 µm, ; elle représente 30µm pour les images (D) à (F). Ces échantillons ont subi une congélation-flash dans du N₂ liquide avant d’être placés dans l’enceinte sous vide du MEB. NB : les images (B) et (E) ont été réalisées avec un MEB JEOL JSM 7200.

Le RIP POE(2)BSA(8)/Fb présente une architecture microporeuse assez homogène sur l’ensemble du matériau. Certaines zones sont assez denses, mais globalement, de nombreux pores sont observés. Leur diamètre moyen est de $7 \pm 2 \mu\text{m}$. Ces pores, bien que de taille assez faible, sont autant de canaux par lesquels les échanges peuvent être facilités. Ainsi, des nutriments et des messagers biochimiques pourraient diffuser au travers de la matrice. Ce RIP étant riche en albumine, il devrait pouvoir être partiellement hydrolysé par les métalloprotéases sécrétées par les cellules et la migration cellulaire deviendrait alors possible au travers de cette matrice.

Le RIP POE(5)BSA(5)/Fb a également une structure très poreuse, mais son allure est assez différente de celle du RIP POE(2)BSA(8)/Fb. La taille moyenne des pores est de $22 \pm 5 \mu\text{m}$, donc sensiblement plus élevée. De plus, les parois des pores sont plus fines. Ces différences morphologiques peuvent être mises en corrélation aux différences de propriétés viscoélastiques précédemment observées entre ces deux formulations.

Enfin, le RIP POE(8)BSA(2)/Fb (Figure 71C et F) a une surface qui semble très dense. Celui-ci forme ainsi une couche épaisse. Cependant, certaines zones du matériau présentent des défauts qui laissent entrevoir la structure dans la masse. De nombreux pores, dont la taille moyenne est de $10 \pm 5 \mu\text{m}$, sont observés. La concentration élevée en POE dans ce matériau conduit à l’apparition d’une morphologie plus compacte et à des pores de plus petite taille que celle des pores des RIPs POE(5)BSA(5)/Fb. La présence de

cette couche superficielle de polymère pourrait être liée à une copolymérisation privilégiée du PEGDM et de la BSA_m du côté exposé aux UV. Cependant, les faces n'ont pas été distinguées au moment d'enregistrer ces images.

4.1.5. Réversibilité lors de cycle de séchage / hydratation

Comme nous l'avons déjà mentionné dans le chapitre 2 (cf.§ 1), il peut être intéressant, pour certaines applications, de stocker les RIPs à l'état sec. Nous avons donc vérifié la capacité de ces RIPs POE-BSA/Fb à se réhydrater après un séchage en suivant leur masse. Il faut rappeler qu'un gel de fibrine seul possède des taux de gonflement initiaux (SR_1) très élevés, de l'ordre 60 à 70²¹² (de même que pour les gels constitués de fibrinogène PEGylé⁸²) mais il n'est pas possible de les réhydrater à plus de 6%⁵ alors qu'une réhydratation complète de 100% serait souhaitable. Dans sa thèse, Laurent Bidault a démontré que les RIPs PVA/Fb pouvaient se réhydrater complètement pendant 2 cycles. Au cours du 3^{ème} cycle, la réversibilité diminuait à 93%. Le POE étant moins hydrophile que le PVA, nous avons mesuré les taux de gonflement des différents matériaux sur un cycle (Figure 72) et calculé la réversibilité à l'hydratation (Figure 73).

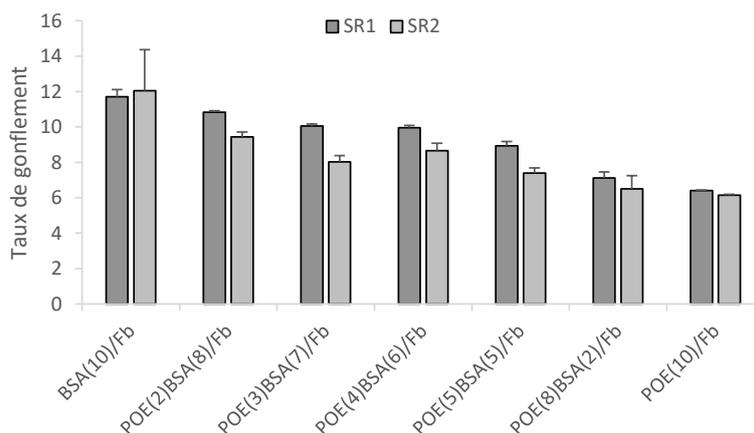


Figure 72 : Taux de gonflement des différents matériaux après synthèse (SR1) et après 1 cycle de séchage/hydratation (SR2).

Le taux de gonflement diminue lorsque la proportion en POE dans le matériau augmente. Ainsi, le taux de gonflement du RIP BSA(10)/Fb après synthèse est de 12 alors qu'il n'est que de 6 pour le RIP POE(10)/Fb. Les valeurs mesurées sur les RIPs POE-BSA/Fb sont comprises entre ces deux bornes. Il peut également être noté que le taux de gonflement après un cycle est toujours légèrement inférieur à celui que l'on mesure post-synthèse, ce qui traduit une réhydratation partielle, hormis pour le RIP BSA(10)/Fb. Ces taux de gonflement sont cohérents avec ceux qui ont été présentés dans la littérature. Par exemple, des gels chimiques de BSA à des concentrations de l'ordre de 30%, donc très supérieures à celles utilisées dans ce travail, ont des taux de gonflement de 6 à 10 à pH 7,4²³⁷. Les RIPs contenant le réseau de fibrine ont donc un

gonflement beaucoup plus faible que celui d'un gel de fibrine, mais après séchage, ils sont capables de gonfler à nouveau.

Afin de comparer le comportement des matériaux, leurs réversibilités à l'hydratation sont comparées sur la Figure 73.

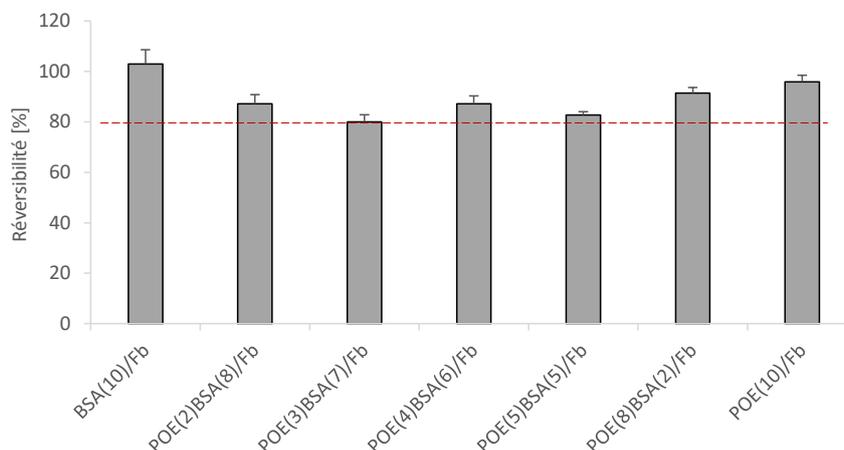


Figure 73 : réversibilité à l'hydratation des différentes formulations de RIPs POE-BSA/Fb.

Quelle que soit leur composition, la réversibilité est supérieure à 80%. Le RIP BSA(10)/Fb présente la réversibilité la plus élevée, à 100%. La réversibilité du RIP POE(10)/Fb est légèrement plus faible, à 95%. Il est donc possible de réhydrater un réseau de fibrine à concentration physiologique dans une architecture RIP. Les RIPs POE-BSA/Fb ont une réversibilité comprise entre 80 et 90%, ce qui est satisfaisant pour les applications visées.

Il faudrait vérifier qu'après ce cycle d'hydratation et de déshydratation, les matériaux conservent leur morphologie (en particulier celle du réseau de fibrine) et que leurs propriétés viscoélastiques ne sont pas affectées. Faut de temps, cette étude n'a pas pu être menée. Les premiers résultats permettent néanmoins de conclure que ces RIPs POE-BSA/Fb ont une réhydratation supérieure à 80% après un premier cycle de séchage/réhydratation. Ainsi, ces matériaux peuvent être facilement stockés à l'état sec et être réhydratés avant utilisation.

4.2. Biodégradabilité

4.2.1. Dégradation macroscopique

Dans un premier temps, la biodégradabilité a été étudiée macroscopiquement. Pour cela, les matériaux sont incubés immédiatement après leur synthèse dans une solution de thermolysine à 2 U.mL^{-1} ,

pendant 24h, à 37°C dans des conditions statiques. En l'absence de gonflement préalable, la diffusion de l'enzyme dans le gel est donc facilitée.

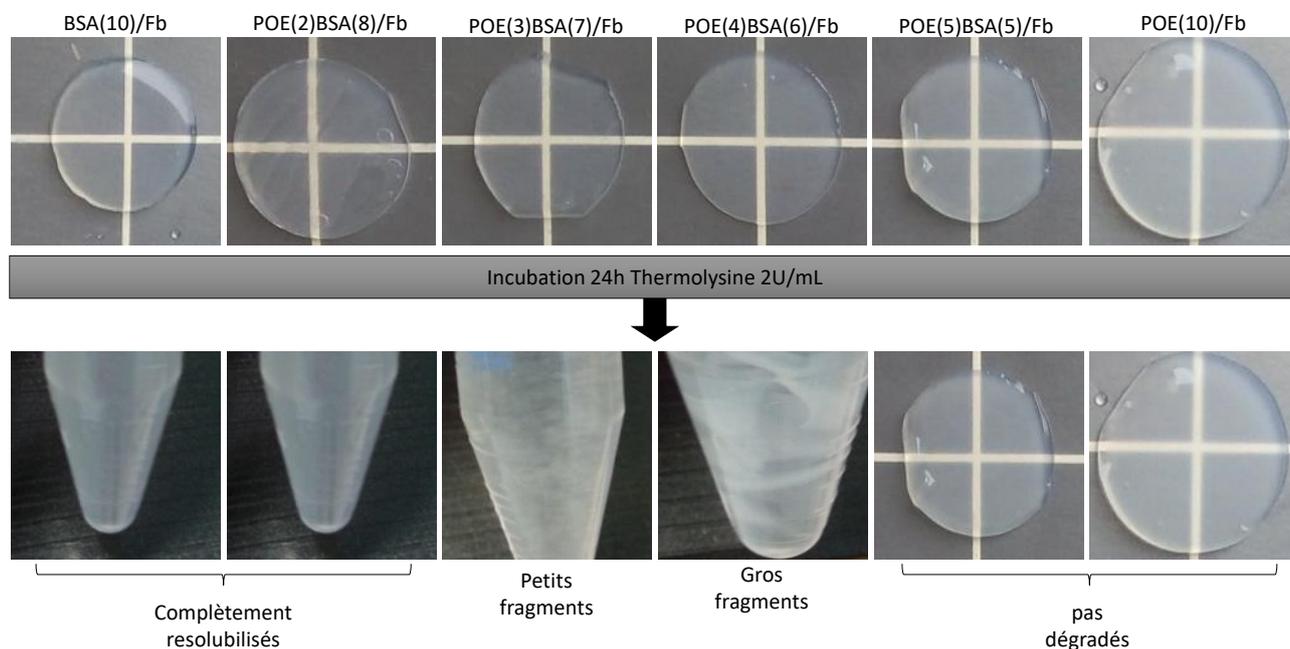


Figure 74 : photos des différents matériaux (haut) en sortie de synthèse et (bas) incubés dans une solution de thermolysine à $2\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ pendant 24h et à 37°C.

Après 24h d'incubation en présence de l'enzyme protéolytique, différents comportements sont observés selon la composition des matériaux. Les RIPs BSA(10)/Fb et POE(2)BSA(8)/Fb sont complètement solubilisés. Le coréseau POE-BSA a donc été intégralement dégradé. Les RIPs POE(3)BSA(7)/Fb et POE(4)BSA(6)/Fb sont, quant à eux, partiellement dégradés et la taille des fragments semble proportionnelle à la proportion de POE dans le RIP. Enfin, les RIPs POE(5)BSA(5)/Fb et POE(10)/Fb ne subissent pas de changement détectable à l'œil : leur surface et leur volume semblent inchangés après ce traitement. Ainsi, il apparaît clairement que la dégradation des RIPs est liée à la proportion de POE qu'il contient : plus il y a de POE, moins la dégradation semble rapide. Cela est cohérent avec le fait que le PEGDM et la BSA copolymérisent puisque seule l'albumine possède des sites clivables par la thermolysine. Si la protéine est le constituant majoritaire du matériau, de nombreux nœuds de réticulation peuvent être coupés, fragilisant ainsi le coréseau POE-BSA et aboutissant à sa destruction complète. Lorsque la proportion de protéine diminue mais que celle-ci reste majoritaire, certaines zones du coréseau doivent être plus riches en POE et demeurent inertes par rapport à l'attaque par l'enzyme, alors que d'autres peuvent être clivées et des fragments sont donc obtenus. Enfin, quand la protéine devient minoritaire, le coréseau POE-BSA n'est pas dégradé macroscopiquement sur l'échelle de temps considérée (24h).

4.2.2. Suivi de l'apparition des fragments protéiques

Ensuite, de la même manière que pour les matériaux à base de PVA (cf. Chapitre 2 § 2.3), les RIPs POE-BSA/Fb ont été incubés dans un grand volume de solution de thermolysine, avec une agitation circulaire. À intervalles réguliers, l'absorbance du surnageant à 280 nm, caractéristique des fragments protéiques, est mesurée (Figure 75).

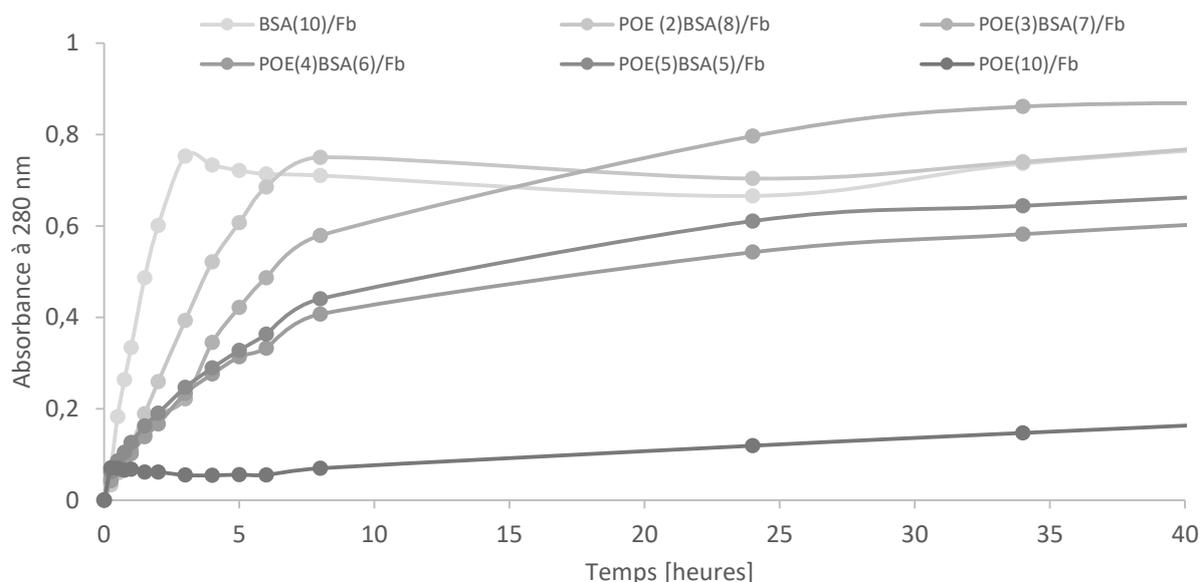


Figure 75 : cinétique de dégradation des RIPs POE-BSA/Fb : absorbance à 280 nm du surnageant en fonction du temps d'incubation – 37°C – Thermolysine = 2 U.mL⁻¹.

Quelle que soit la composition des matériaux, l'absorbance augmente fortement au cours des premières heures puis atteint un plateau.

Pour un RIP BSA(10)/Fb, elle atteint une valeur de 0,7 en 3 h de dégradation. Au-delà de 3 h, elle n'évolue que très peu, ce qui indique que l'ensemble des fragments clivables par la thermolysine dans le matériau ont été dégradés. Cela intervient parallèlement à la solubilisation complète du matériau qui se fragmente dès 2h d'incubation ; les fragments sont trop petits pour être vus à l'œil nu après 3 h.

Cependant, les valeurs d'absorbance mesurées sur la solution contenant ce RIP BSA(10)/Fb sont environ le double de celles qui ont été mesurées pour le matériau équivalent lors de la série d'expériences sur les RIPs PVA-BSA/Fb (Chapitre 3 § 2.3 et Figure 76A). Or, entre ces deux séries, seule la quantité d'amorceur a changé (1 mole d'I₂₉₅₉ pour 86 moles de méthacrylate dans la série des matériaux à base de PVAm et 1 mole d'I₂₉₅₉ pour 16 moles de méthacrylate dans la série des RIPs à base de POE). Le réseau est donc mieux formé, et comporte moins d'hétérogénéités dans le cas du rapport molaire 1 :16, et cela se traduit par une dégradation plus complète du réseau.

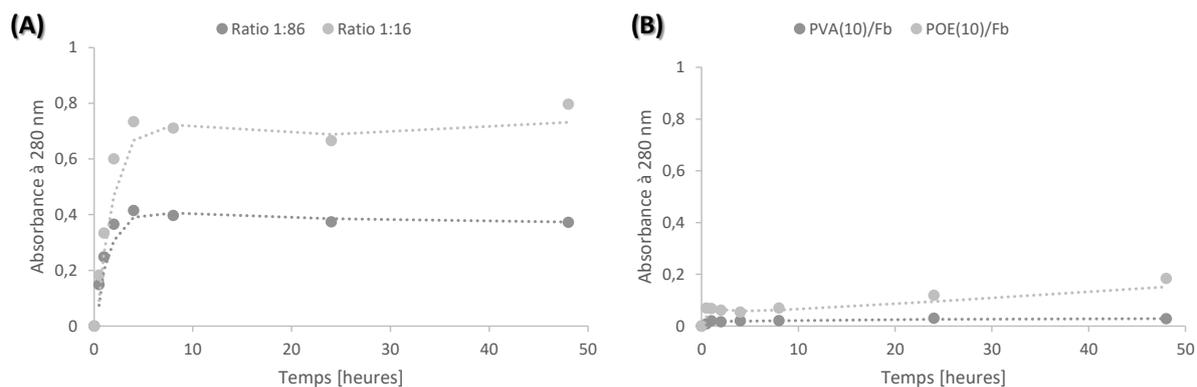


Figure 76 : comparaison des valeurs d'absorbance du surnageant pour (A) les RIPs BSA(10)/Fb synthétisés avec 1 mole d'I2959 pour 86 (●) et 16 (●) moles de méthacrylate différents taux d'amorceur et (B) d'un RIP PVA(10)/Fb et d'un RIP POE(10)/Fb.

Le RIP POE(10)/Fb présente un comportement très différent de celui du RIP BSA(10)/Fb (Figure 76B). L'absorbance augmente dans les premières minutes d'incubation mais l'amplitude est bien moins importante. Cette valeur reste constante à 0,2 et inférieure pendant les 40h qui suivent. Ainsi, le réseau de fibrine est dégradé rapidement par la thermolysine (il n'y a plus d'évolution après 2h) alors que le réseau de POE, comme attendu, n'est pas affecté par la protéase. La valeur de l'absorbance au plateau pour le RIP POE(10)/Fb est d'environ 0,18 alors qu'elle n'est que de 0,03 pour le RIP PVA(10)/Fb PVA (Figure 76B). Le réseau de PVA semble donc moins favorable à la diffusion de l'enzyme, ce qui se traduit par une dégradation du réseau de fibrine plus lente que dans le RIP POE(10)/Fb.

En ce qui concerne la cinétique de dégradation des RIPs POE-BSA/Fb, il est intéressant de noter que, conformément aux lois de l'enzymologie, plus le matériau est riche en albumine (substrat de l'enzyme), plus sa dégradation intervient rapidement et ce malgré la complexité du réseau dans lequel l'albumine est impliquée. Cela avait déjà été observé pour les matériaux à base de PVA. Ainsi, les vitesses de dégradation des RIP POE-BSA/Fb sont proches de celles des RIPs à base de PVA correspondants (cf Chapitre 3, § 2.3). Parallèlement, l'absorbance finale de la solution dans laquelle est immergé le RIP POE(5)BSA(5)/Fb est deux fois plus faible que celle contenant le RIP BSA(10)/Fb. Cela traduit le fait que plus un matériau est riche en albumine, plus il est susceptible d'être dégradé par la protéase. Les fragments ainsi créés participent au signal à 280 nm. Pour évaluer si toutes les protéines des RIPs étaient hydrolysées, nous avons calculé l'absorbance maximale correspondante à partir de l'absorbance de solutions de PEGDM, de BSA et de Fg à $1\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ (Tableau 5).

	Absorbance à 280 nm
PEGDM	0,088
BSAm	0,099
Fg	0,003

Tableau 5 : absorbance des solutions de PEGDM, BSA et Fg à 1 mg.mL⁻¹.

L'absorbance théorique des solutions dans lesquelles chaque matériau a été immergé, peut être calculée de la façon suivante :

$$DO_{théorique} = (0,088 \times x) + (0,099 \times y) + (0,003 \times 5)$$

où x est la concentration massique en POE et y la concentration massique en BSA.

Les valeurs théoriques ainsi calculées sont comparées aux valeurs mesurées au plateau sur la Figure 77.

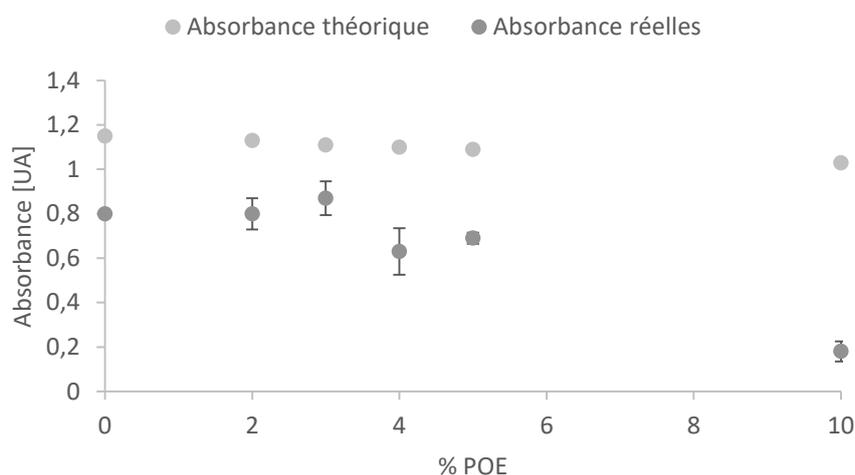


Figure 77 : comparaison des valeurs de l'absorbance du surnageant après 48h de dégradation des RIPs POE-BSA/Fb exprimés en fonction du pourcentage en POE qu'ils contiennent et des valeurs d'absorbance théoriques.

Quelle que soit la composition des RIPs, la valeur mesurée est inférieure à la valeur théorique (approximativement 70% de la valeur attendue) et ce d'autant plus que la fraction de POE est importante. Cela indique que les coréseaux riches en POE ($\geq 40\%$) ne sont pas ou peu hydrolysés par l'enzyme dans le temps imparti pour la réaction. Cette hypothèse est confortée par les observations visuelles qui montrent que les matériaux riches en POE ne se dissolvent pas voire ne se fragmentent pas, dans une solution concentrée de protéases.

Pour vérifier ce point, nous avons représenté, à partir des vitesses initiales calculées à 2h, la linéarisation de Lineweaver-Burk, c'est-à-dire $1/v_{initiale}$ en fonction de $1/[S]$ ($[S]$ étant ici la concentration

totale en protéines) (Figure 78). Cette représentation permet habituellement de déterminer les constantes cinétiques de la réaction comme cela a été fait dans le chapitre 2 (cf § 2.3).

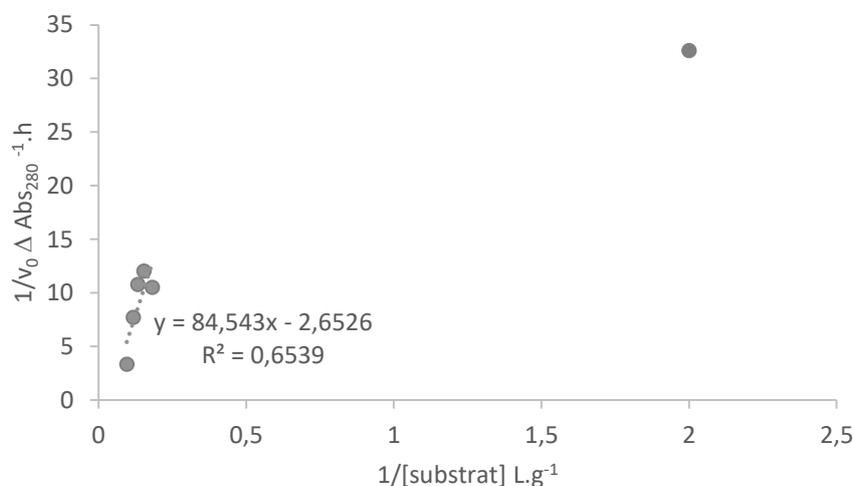


Figure 78 : linéarisation de Lineweaver-Burk pour la dégradation des RIPs POE-BSA/Fb avec les vitesses initiales calculées à t = 2h.

Il s'avère que les points ne sont pas alignés pour toutes les compositions. Nous en concluons que dans les RIPs POE-BSA/Fb, la diffusion de l'enzyme est limitée au moins partiellement. L'enzyme n'accède donc pas immédiatement à tous les sites qui peuvent être clivés, et il est délicat de déterminer des constantes cinétiques dans ces conditions.

4.2.3. Suivi des propriétés mécaniques.

Parallèlement au suivi de l'absorbance à 280 nm, des mesures rhéologiques ont été réalisées à des intervalles réguliers d'incubation des matériaux dans la solution de thermolysine à 2U.mL⁻¹.

Les valeurs de modules de stockage en fonction du temps d'immersion des hydrogels dans la solution de thermolysine sont présentées dans le Tableau 6. Ces valeurs ont ensuite été normalisées par rapport à leur valeur initiale, et la Figure 79 présente l'évolution des modules viscoélastiques de chaque matériau au cours de sa dégradation.

Temps (h)	BSA(10)/Fb	POE(2)BSA(8)/Fb	POE(3)BSA(7)/Fb	POE(4)BSA(6)/Fb	POE(5)BSA(5)/Fb
0	1605	2984	2388	2288	1765
0,25	1750	1500	850	1392	882
0,5	422	910	563	819	543
1	11	219	527	497	508
1,5		51	294	445	405
2		98	278	440	403
3		37	274	353	312
4,5		30	150	149	380
7		27	190	337	604
9		14	193		559

Tableau 6 : valeurs des modules de stockage des RIPs POE-BSA/Fb en fonction du temps d'incubation à 37°C dans la solution de thermolysine à 2U.mL⁻¹.

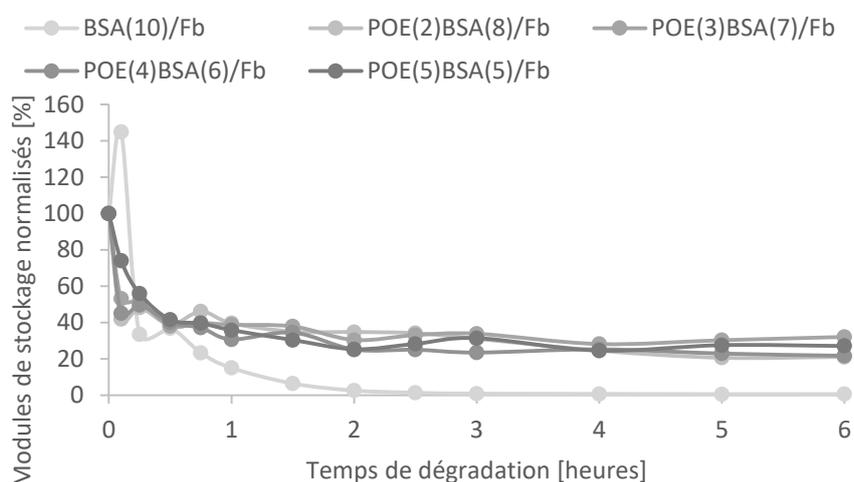


Figure 79 : valeurs normalisées des modules de stockage en fonction du temps d'immersion dans une solution de thermolysine à 2 U.mL⁻¹. T = 37°C.

Comme cela avait été observé lors des expériences de dégradation précédentes, le RIP BSA(10)/Fb est complètement dégradé par la thermolysine, après un peu plus d'une heure. Le matériau est alors trop fragile pour être manipulé, il se fragmente et aucune mesure ne peut plus être réalisée. Le RIP POE(2)BSA(8)/Fb subit un sort similaire et se casse après 9h de mesure. Les autres matériaux conservent leur aspect bien qu'ils deviennent beaucoup plus fragiles. Ils sont donc manipulés avec précaution lors des mesures.

La diminution des modules intervient très rapidement. En effet, quel que soit le matériau, ils chutent de 60% environ en 30 min. Ainsi après 1h d'incubation, tous les modules de stockage sont inférieurs à 500

Pa. Cette diminution est ensuite ralentie et atteint un plateau. Il est intéressant de noter que les valeurs de G' mesurées au plateau augmentent avec la proportion de POE dans le RIP (Figure 80). La dégradation enzymatique par la thermolysine est donc limitée par la concentration en POE. Le coréseau POE-BSA se déstructure moins vite et conserve des propriétés mécaniques qui le rendent manipulable, du moins sur les échelles de temps ici considérées.

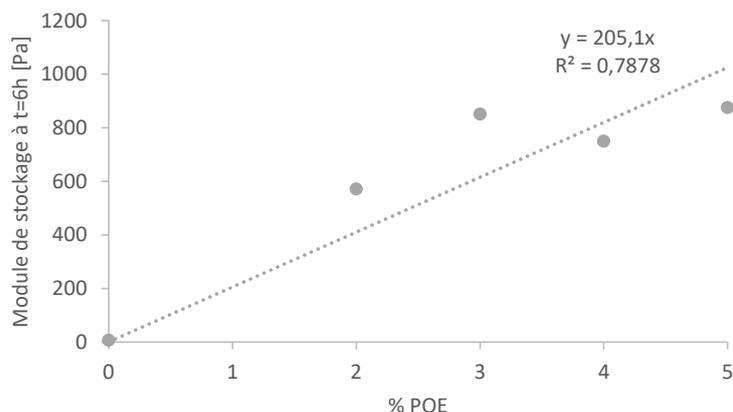


Figure 80 : modules de stockage après 7h de dégradation en fonction de la proportion en POE dans le RIP POE-BSA/Fb.

Par rapport aux données de la littérature, un RIP PEG-DA/acide hyaluronique subit une chute drastique de son module de stockage plus rapidement (de l'ordre de 10 min)⁸⁸. En revanche, l'évolution est beaucoup plus lente sur un gel de Dextran (environ 2 et 5 jours pour une diminution de moitié de son module de stockage)⁸⁷. Ainsi, les RIPs POE-BSA/Fb que nous avons développés, subissent une diminution rapide de leurs propriétés mécaniques. Mais il faut garder à l'esprit que, ces cinétiques seraient fortement ralenties *in vivo*, bien qu'il soit difficile d'établir le lien précis entre les temps de dégradation mesurés *in vitro* et *in vivo*.

4.2.4. Comparaison entre fragmentation et diminution du module rhéologique

Ces deux méthodes complémentaires nous ont permis de mieux comprendre la dégradation des RIPs POE-BSA/Fb. D'une part, l'absorbance à 280 nm permet de suivre l'apparition de fragments protéiques libres dans le surnageant. D'autre part, la rhéologie donne l'évolution des propriétés viscoélastiques de l'hydrogel. Or, dès que la thermolysine est mise en présence des matériaux, elle commence à couper des liaisons peptidiques. Cela a une influence directe sur la taille des mailles du coréseau POE-BSA, qui, à son tour, affecte les modules de stockage des RIPs dès la première heure d'incubation. En revanche, pour qu'un fragment protéique puisse être libéré hors du matériau, il faut statistiquement, au minimum deux coupures, de part et d'autre de celui-ci. En réalité, il en faut bien davantage car le matériau a une maille relativement serrée (environ 10 nm pour 4500 Pa, ce qui représente environ 30 acides aminés, ou 80 liaisons C-X) et cela limite

fortement la diffusion des fragments du réseau jusque dans le surnageant. Ainsi, il est normal de constater un décalage dans le temps entre les résultats obtenus par ces deux méthodes. La dégradation a donc rapidement un impact sur les propriétés mécaniques des RIPs avant de permettre la libération de fragments protéiques.

4.2.5. Morphologie des matériaux après leur dégradation

Afin de visualiser l'impact de la dégradation sur la morphologie des RIPs POE-BSA/Fb, les matériaux ont été incubés dans une solution de TL à 2 U.mL^{-1} pendant 24h à 37°C avant d'être imagés. Le RIP BSA(10)/Fb étant totalement dégradé par ce traitement, il n'a pas pu être imagé. Afin d'éliminer l'enzyme, les matériaux encore intacts ont été rincés à 3 reprises dans un volume 50 fois supérieur de tampon Tris. Ils subissent ensuite une congélation flash dans l'azote liquide et sont imagés en microscopie électronique à balayage. La Figure 81 présente la morphologie du RIP POE(10)/Fb avant et après ce traitement protéolytique.

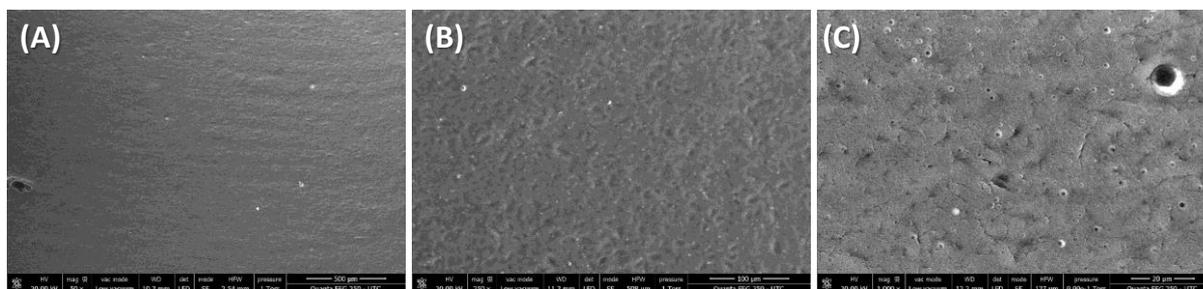


Figure 81 : images en microscopie électronique à balayage du RIP POE(10)/Fb avant (A) et après (B) et (C) 24h d'incubation dans une solution de TL à 2 U.mL^{-1} . La barre correspond à $300 \mu\text{m}$ sur l'image (A) et à $30 \mu\text{m}$ sur les images (B) et (C). Ces échantillons ont subi une congélation-flash dans du N_2 liquide avant d'être placés dans l'enceinte sous vide du MEB.

La surface du RIP POE(10)/Fb est légèrement modifiée par le traitement protéolytique. À la place d'une surface parfaitement lisse et homogène (Figure 81A), de nombreuses irrégularités apparaissent (Figure 81B et C). Le matériau ne devient pas poreux pour autant. Cela n'est pas surprenant, car la fibrine ne représente que 0,5% de l'hydrogel, et 5% de sa masse sèche. Sa dégradation, même si elle est complète, ne suffit pas à altérer profondément la structure du RIP. Cela confirme donc les mesures d'absorbance à 280 nm : le RIP POE(10)/Fb est un matériau non biodégradable à l'échelle macroscopique et, à l'échelle microscopique, les modifications de la structure sont ténues.

L'architecture des RIPs POE-BSA/Fb dégradés a ensuite été observée (Figure 82).

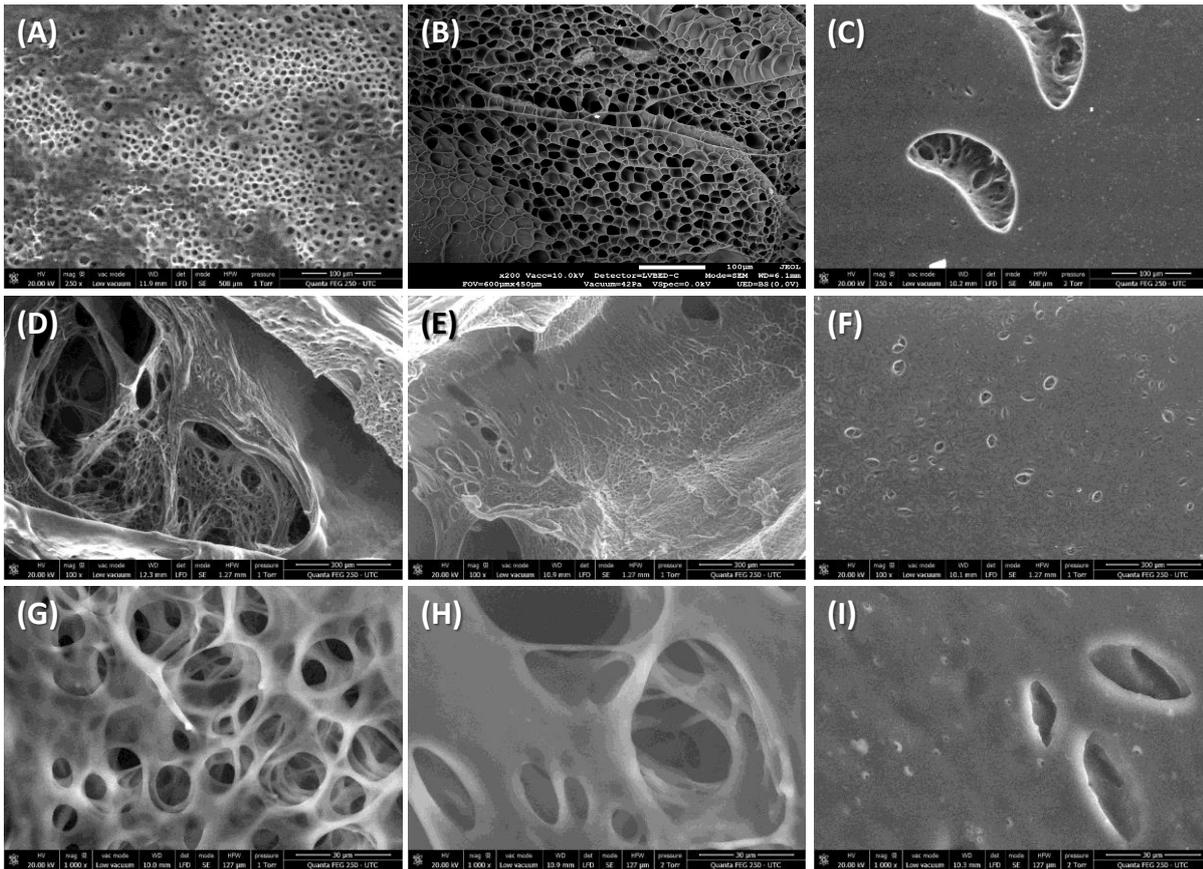


Figure 82 : images en microscopie électronique à balayage des RIPs POE-BSA/Fb avant (A) à (C) et après (D) à (I) 24h d'incubation dans une solution de TL à 2 U.mL^{-1} (A), (D) et (G) RIP POE(2)BSA(8)/Fb ; (B), (E) et (H) RIP POE(5)BSA(5)/Fb ; (C), (F) et (I) RIP POE(8)BSA(2)/Fb. Pour les images (A) à (F) la barre correspond à $300 \mu\text{m}$, et à $30 \mu\text{m}$ pour les images (G) à (I). Ces échantillons ont subi une congélation-flash dans du N_2 liquide avant d'être placés dans l'enceinte sous vide du MEB.

La morphologie du RIP POE(2)BSA(8)/Fb est fortement modifiée par le traitement à la TL. Sa structure initiale homogène avec des pores de taille régulière devient très hétérogène. Certaines zones sont lacunaires, alors que d'autres apparaissent encore denses, avec un maillage régulier (Figure 82D et G). Dans ces zones, la taille moyenne des pores est de $13 \pm 4 \mu\text{m}$, soit le double de la taille moyenne mesurée avant son incubation dans la TL (cf.§ 4.1.4.2). L'enzyme protéolytique attaque donc le matériau dans son ensemble, mais certaines zones, contenant sans doute davantage de POE, semblent mieux résister, bien que la taille moyenne des pores augmente.

Le RIP POE(5)BSA(5)/Fb subit lui aussi d'importants changements morphologiques au cours de sa dégradation (Figure 82E et H). Les images du RIP dégradé révèlent une structure poreuse. La taille moyenne des pores augmente un peu (28 contre $22 \mu\text{m}$) mais comme pour le RIP POE(2)BSA(8)/Fb, certaines zones semblent être davantage affectées. Cela correspondrait à un matériau qui n'est pas parfaitement homogène, certaines zones étant plus riches en POE et d'autres en BSA ce qui souvent le cas lors d'une synthèse par polymérisation radicalaire ²³⁸.

Logiquement, le RIP POE(8)BSA(2)/Fb est peu modifié par le traitement par la TL (Figure 82F et I). Comme le RIP POE(10)/Fb, sa surface est moins lisse et homogène, un grand nombre d'irrégularités sont apparues. Certaines zones laissent entrevoir des pores, dont la taille moyenne est de 25 μm , contre 10 μm avant dégradation. La dégradation induit donc une légère augmentation de la taille des pores, mais le réseau est très riche en POE et cela limite probablement la diffusion de l'enzyme protéolytique. Ce résultat est en accord avec ce qui a été observé pour le suivi de la dégradation par absorbance.

L'ensemble de ces résultats concernant la dégradation nous permet de conclure que les RIPs POE-BSA/Fb sont bien biodégradables, ce qui était le but en introduisant l'albumine. La composition du matériau peut être modifiée, et cela altère sa vitesse de dégradation. En effet, l'enzyme protéolytique dégrade rapidement et de manière complète un RIP contenant majoritairement des protéines (POE(2)BSA(8)/Fb) alors qu'un RIP POE(5)BSA(5)/Fb demeure résistant à la protéolyse sur de longues durées, bien que ses propriétés viscoélastiques soient divisées par 2 et sa morphologie au niveau microscopique modifiée.

Ces RIPs à base de fibrine sont donc des matériaux manipulables, dont les propriétés viscoélastiques peuvent être modulées en fonction de la composition. La réticulation est satisfaisante, car de faibles fractions solubles peuvent être extraites (< 10% total). Ces hydrogels sont biodégradables, et la cinétique de dégradation peut être modifiée en ajustant les proportions en polymère et en albumine. Nous avons donc vérifié que ces matériaux sont biocompatibles par une approche en deux dimensions.

5. Biocompatibilité des RIPs POE(x)BSA(y)/Fb

Laurent Bidault avait démontré que les RIPs contenant de la BSA, seule ou associée à du PVA, sont capables de soutenir la croissance cellulaire à leur surface. Les fibroblastes recouvrent l'intégralité du matériau après 2 semaines de culture et montrent un fort taux de survie. De plus, les cellules sécrètent les macromolécules clef de la matrice extracellulaire du derme humain et elles sont capables de les structurer en forme de fibres comme cela a pu être observé pour la fibronectine. Ces différents matériaux ont donc été qualifiés de biocompatibles. Nous avons donc vérifié si ce comportement était également observé sur les RIPs à base de POE.

Des fibroblastes de derme humain (BJ, ATCC CRL-2522) ont été utilisés en tant que modèle cellulaire. Les fibroblastes (FB-BJ) ont été isolés à partir d'un derme de prépuce de nouveau-né et immortalisés. Leur temps de division est court (environ 22h) et leur prolifération ne peut commencer qu'après adhérence. La morphologie de cette lignée évolue en fonction de la densité cellulaire : quand la densité cellulaire est faible et sur des temps courts, ces cellules ont une forme « d'œuf au plat ». Après un temps plus long, elles

présentent un étalement plus important avec de nombreux prolongements cytoplasmiques tels que des pseudopodes. A concentration cellulaire élevée, les fibroblastes se polarisent, adoptent un phénotype très allongé et forment des organisations en « vague ». La confluence de cette lignée se situe aux alentours de 50 000 cellules.cm⁻². Ce type cellulaire est capable d'adhérer très rapidement.

5.1. Approche en deux dimensions

L'étude de la toxicité potentielle des matériaux a, dans un premier temps, été menée en deux dimensions. En sortie de synthèse, les matériaux sont immergés pendant 24h dans du milieu minimum. Cela permet d'éliminer les sels de Tris qui ont un effet néfaste sur la croissance cellulaire. Les matériaux sont ensuite recouverts d'une suspension cellulaire de sorte à être à une concentration de 50 000 cellules par matériau, c'est-à-dire à confluence. Les cellules sont imagées à différents temps de culture (1, 3, 7, 14 et 21 jours). Deux types d'expérience sont menés sur chaque matériau. D'une part, un test de viabilité (Live/Dead) qui permet de quantifier la survie cellulaire, et, d'autre part, les cellules sont imagées par microscopie confocale après fixation dans du para-formaldéhyde 3%, et un immunomarquage.

5.1.1. Viabilité cellulaire des fibroblastes BJ.

La survie des cellules a été quantifiée à l'aide d'un kit Live/Dead. Le principe de ce test repose sur l'utilisation de la calcéine AM et du Bromure d'Ethidium Homodimère. Ces deux composés pénètrent sans distinction dans toutes les cellules, mais les cellules vivantes rejettent le Bromure d'Ethidium Homodimère. Ainsi, les cellules vivantes sont colorées par la calcéine (vert) alors que les cellules mortes prennent une coloration rouge.

Un grand nombre de champs représentatifs de l'échantillon a ensuite été photographié par microscopie confocale. Sur chaque champ, des comptages ont été effectués, afin de quantifier les cellules vivantes et mortes et cela sur chaque face du matériau. Pour rappel, l'une des faces du matériau a été exposée directement aux UV alors que la face «côté Téflon » ne les subit pas directement.

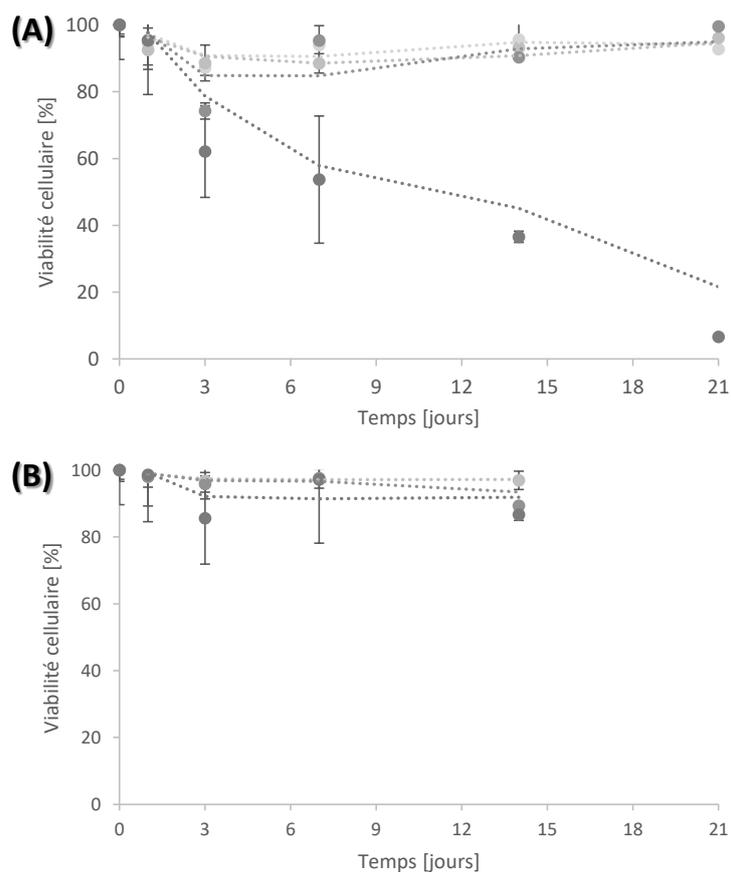


Figure 83 : viabilité cellulaire à la surface des RIPs BSA(10)/Fb (●), POE(2)BSA(8)/Fb (●), POE(5)BSA(5)/Fb (●) et POE(10)/Fb (●) en fonction du temps de culture : (A) Face exposée aux UV ; (B) Face «côté Téflon».

Sur la face des RIPs qui a été exposée aux UV, pour des temps d'incubation de 1 jour, aucune différence n'est observée quel que soit le matériau étudié. La viabilité cellulaire est supérieure à 85%. Par contre, des différences sont observées après 3 jours de culture. La viabilité des cellules cultivées en surface du RIP POE(10)/Fb chute à 60%, et cette diminution se poursuit pour atteindre 5% après 21 jours d'incubation. La quasi-totalité des cellules sont alors mortes. En revanche, la viabilité cellulaire reste comprise entre 90 et 95%, même après 21 jours de culture, en surface de tous les autres échantillons (RIPs BSA(10)/Fb, POE(2)BSA(8)/Fb et POE(5)BSA(5)/Fb). Ainsi, les cellules se comportent différemment selon la nature du matériau sur lequel elles sont cultivées.

Sur face «côté Téflon», le comportement cellulaire est identique pour toutes les compositions. La viabilité cellulaire demeure supérieure à 90% même après 14 jours de culture (des problèmes expérimentaux nous ont empêché de mener l'expérience jusqu'à 21 jours). Cette valeur très élevée traduit le fait que les cellules survivent très bien en surface de ce type d'échantillon, et qu'elles ne sont pas affectées par la proportion de POE qu'il contient.

Comme cela a été montré précédemment (cf.§ 4.1.4.1), les deux faces des matériaux ne présentent pas les mêmes caractéristiques. La face «côté Téflon » est riche en protéines et le réseau de Fibrine y est dense et homogène, présentant une structuration proche de celle qui peut être observée pour un réseau de fibrine à concentration physiologique. Il est donc logique que la viabilité cellulaire y soit très bonne (supérieure à 90%). Une telle observation est très encourageante quant à des applications futures : la survie cellulaire étant proche de 100%.

En revanche, bien qu'il ait été détecté en profondeur, le réseau de fibrine est absent de la surface immédiate de la face qui a été exposée aux UV (cf.§ 4.1.4.1) ce qui est cohérent avec le comportement cellulaire sur cette face, en accord avec les interprétations des marquages du réseau de fibrine. Les cellules cultivées en surface de la face exposée aux UV du RIP POE(10)/Fb présentent une mortalité élevée, probablement parce qu'elles ne sont pas capables d'adhérer correctement sur le réseau formé, et meurent, vraisemblablement, par anoïkis comme cela a été rapporté dans la littérature ^{100,114,115}. Cependant, la présence de 5%, par exemple, d'albumine dans le matériau, limite fortement cette mortalité et la survie cellulaire est excellente même sur des temps plus longs. Ainsi, l'incorporation d'une partie protéique permet de s'affranchir de l'effet délétère du POE sur la survie cellulaire.

Ces résultats montrent tout l'intérêt des RIPs à base de réseaux POE-BSA par rapport aux RIPs à base uniquement de POE. La survie cellulaire à leur surface, quelle que soit la face utilisée, sera de l'ordre de 90% alors que, selon sa face, le RIP POE(10)/Fb n'induirait pas la même réponse des cellules.

5.1.2. Morphologie cellulaire et sécrétion de protéines matricielles.

La morphologie des cellules sur les matériaux a également été observée au microscope confocal après 1, 7 et 21 jours d'incubation. D'une part, les cellules peuvent être, en effet, encore vivantes en surface du matériau, mais dans l'incapacité de sécréter des protéines de la matrice extracellulaire. Il est donc primordial de vérifier que la morphologie correspond au phénotype caractéristique des fibroblastes, c'est-à-dire une morphologie étalée, avec de nombreuses extensions cytoplasmiques. Ainsi, les noyaux ont été marqués au DAPI (en bleu) et le cytosquelette à la phalloïdine-Alexa 532 (en vert).

D'autre part, lors de la cicatrisation, la fibronectine est rapidement synthétisée et excrétée par les fibroblastes lors de leur arrivée sur la plaie. La présence de fibronectine a donc été recherchée par immunohistochimie. Plus tard, lors du processus cicatriciel, du collagène de type III est sécrété, puis ces fibres sont remaniées et remplacées par du collagène de type I. Nous avons donc également imagé le collagène de type I, qui prouve l'avancement de la cicatrisation vers des étapes de maturation.

Les matériaux ainsi marqués ont été ensuite imagés en différenciant leurs deux faces, comme cela a été fait lors des expériences de viabilité cellulaire. La Figure 84 présente les résultats obtenus pour les cellules cultivées sur la face « côté Téflon », et la Figure 86 présente les résultats pour la face exposée aux UV.

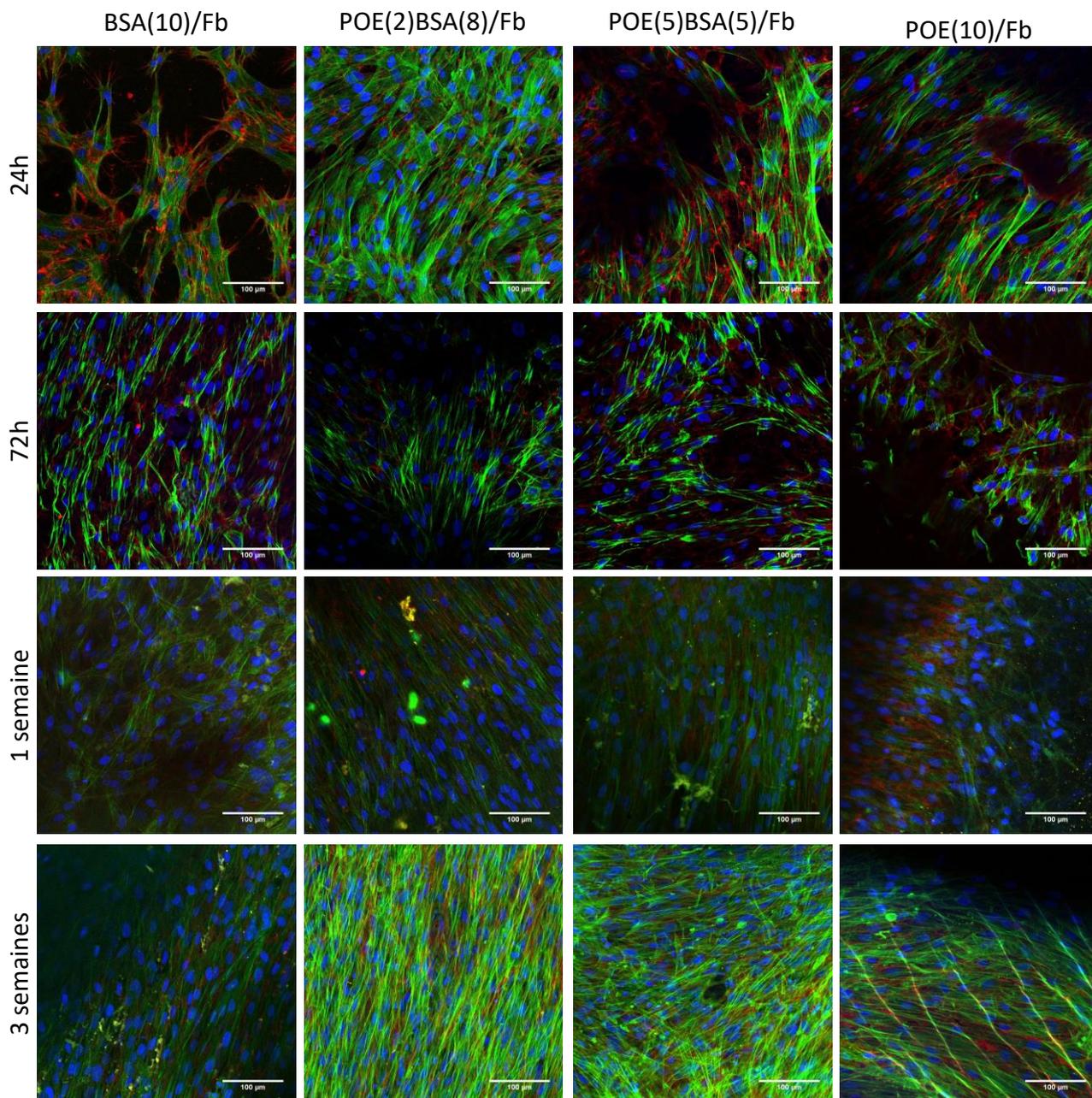


Figure 84 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la morphologie cellulaire à 24, 72h, 1 et 3 semaines à la surface « côté Téflon » des RIPs BSA(10)/Fb, POE(2)BSA(8)/Fb, POE(5)BSA(5)/Fb et POE(10)/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI), le cytosquelette des fibroblastes est en vert (phalloïdine Alexa 532) et la fibronectine est rouge (anticorps secondaire Alexa 633). Le collagène est marqué en en jaune (anticorps secondaire Alexa 488) mais n'apparaît pas ici car le marquage n'est pas assez intense par rapport aux autres molécules. La barre représente 100 µm.

Sur la face « coté Téflon », où le réseau de fibrine est abondant et bien formé, une intense prolifération cellulaire est observée sur la période de culture étudiée. Après 24h, la densité cellulaire est déjà

importante, et les fibroblastes présentent une morphologie caractéristique : ils sont étalés et présentent des extensions cytoplasmiques par lesquelles ils s'attachent au support. Les cellules sont un peu moins nombreuses sur le RIP BSA(10)/Fb que sur les autres formulations, cependant une grande quantité de fibronectine est observée en périphérie cellulaire. Cela atteste d'un métabolisme actif des cellules qui sécrètent une certaine quantité de protéines matricielles. Sur le RIP POE(5)BSA(5)/Fb, la répartition cellulaire apparaît peu homogène mais cela est lié à la topographie de surface irrégulière du matériau. La fibronectine est bien visible autour des cellules pour ces différentes compositions (Figure 85). Les cellules semblent donc adhérer fortement au matériau et commencer à synthétiser un réseau de fibronectine pour faciliter la prolifération en surface. Après 3 jours de culture, les cellules ont proliféré et recouvrent l'ensemble des champs, laissant peu de zones vides. Bien qu'elle soit moins visible sur ces clichés, la fibronectine est abondante et bien répartie sur la surface des échantillons. Cependant, les cellules ne présentent pas d'organisation particulière, elles ont proliféré mais ne sont pas encore suffisamment nombreuses pour adopter une structuration les unes par rapport aux autres. Cela apparaît clairement après 1 semaine, lorsque la densité cellulaire a encore augmenté, et que les cellules commencent à s'aligner les unes par rapport aux autres.

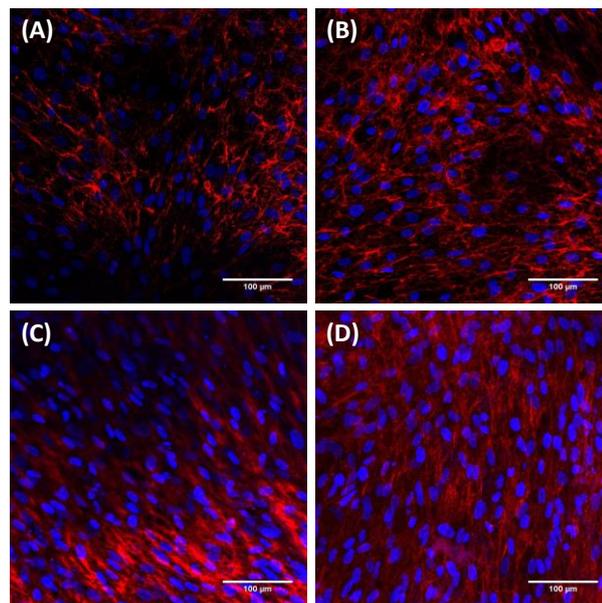


Figure 85 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de la fibronectine à la surface « côté Téflon » à 72h (A-B) et à 3 semaines de culture pour le RIP POE(2)BSA(8)/Fb (A) et (C) et le RIP POE(5)BSA(5)/Fb (B) et (D). Les noyaux sont en bleu (DAPI) et la fibronectine est rouge (anticorps secondaire Alexa 633).

Le tapis de fibronectine est également très dense et homogène (Figure 85). Les cellules sont probablement à confluence car il n'y a pas de différences entre le nombre de noyaux après 1 ou 3 semaines.

Ainsi, sur la face Téflon, les cellules prolifèrent très rapidement et recouvrent complètement la surface du matériau en moins d'une semaine.

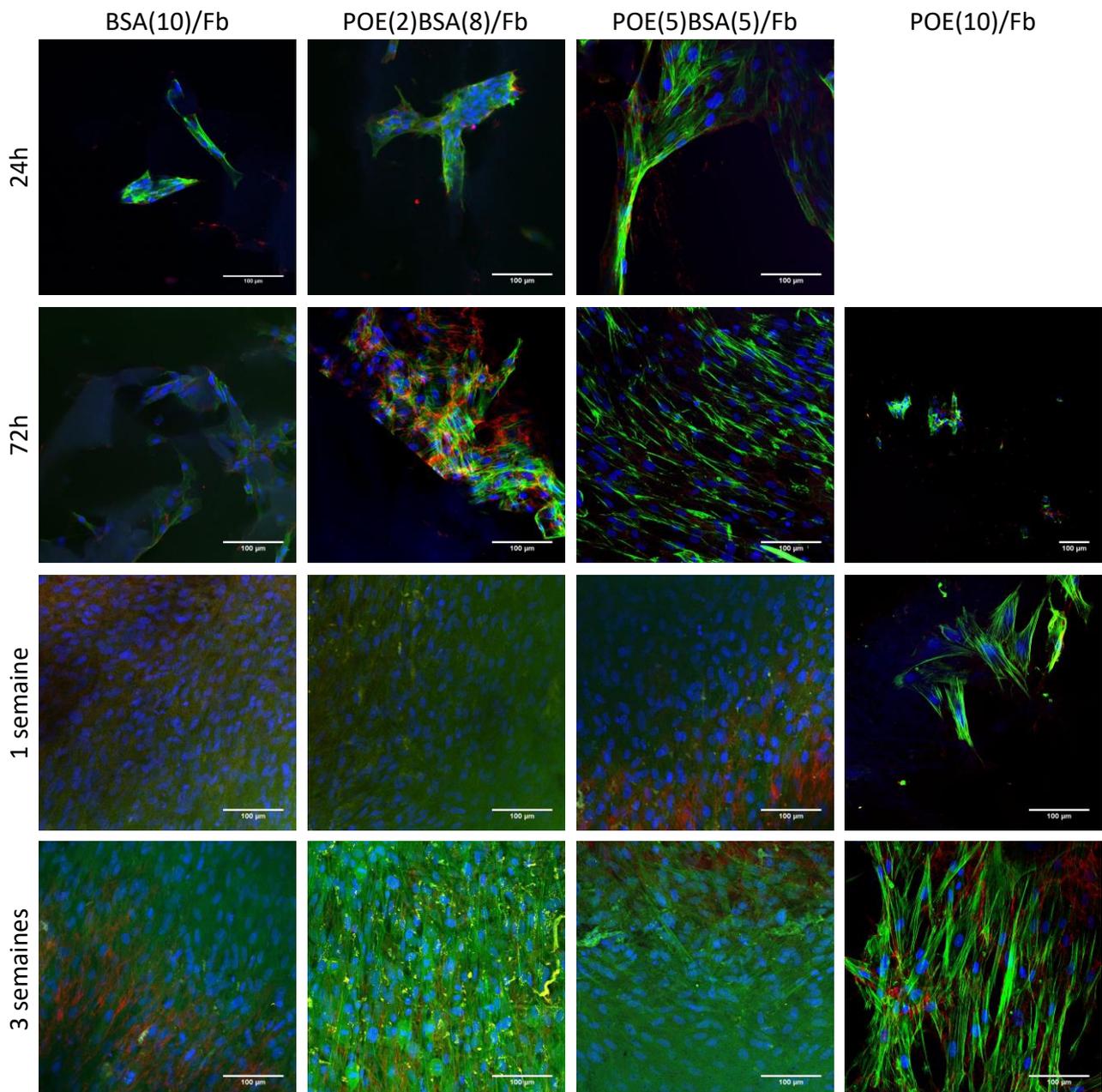


Figure 86 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la morphologie cellulaire à 24h, 72h, 1 et 3 semaines à la surface exposée aux UV des RIPs BSA(10)/Fb, POE(2)BSA(8)/Fb, POE(5)BSA(5)/Fb et POE(10)/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI), le cytosquelette des fibroblastes est en vert (phalloïdine Alexa 532) et la fibronectine est rouge (anticorps secondaire Alexa 633). Le collagène est marqué en jaune (anticorps secondaire Alexa 488) mais n'apparaît pas ici car le marquage n'est pas assez intense par rapport aux autres molécules. La barre représente 100 µm.

Les résultats enregistrés sur les faces exposées aux UV lors des premiers temps de culture sont assez différents de ceux observés pour les cellules cultivées « côté Téflon ». En effet, dans les premiers temps de culture, les cellules sont très peu nombreuses et sont regroupées en agrégats compacts, et cela quel que soit le matériau. Il n'y a pas (ou du moins très peu) de fibronectine (Figure 87A et B), ce qui est cohérent avec l'hypothèse que les cellules sont seulement en train de s'acclimater à la surface de l'échantillon. Elles n'ont pas encore établi suffisamment de liaisons avec le support pour commencer à sécréter des protéines matricielles. Aucune cellule n'a été détectée sur le RIP POE(10)/Fb ce qui explique l'absence de cliché.

Le nombre de cellules augmente significativement après 3 jours de culture, en particulier sur les RIPs contenant de la BSA. Sur le RIP BSA(10)/Fb, les cellules sont moins nombreuses, mais la surface de l'échantillon n'est pas homogène. Sur le RIP POE(2)BSA(8)/Fb, la fibronectine est bien visible et forme un réseau dense et réparti sur toute la surface (Figure 87C et D). Le RIP POE(10)/Fb présente seulement quelques rares cellules dispersées dont la morphologie est ronde. En effet, elles sont sur une surface très riche en POE ce qui est cohérent avec le fait que le réseau de POE n'est pas propice à l'attachement et à la prolifération cellulaire ¹¹⁵.

Après une semaine de culture, les différences de comportement des cellules cultivées sur les deux faces se réduisent nettement. La densité cellulaire est similaire, et le réseau de fibronectine est aussi très dense. Seules les cellules sur la face du RIP POE(10)/Fb qui a été exposée aux UV restent moins nombreuses. Les fibroblastes ont une morphologie bien caractéristique, étalés et émettant de nombreux prolongements cytoplasmiques. Même après 3 semaines de culture, la densité cellulaire sur la face de ce RIP est moins importante, mais les cellules se sont, tout de même, multipliées jusqu'à recouvrir presque totalement la surface de l'échantillon. La densité cellulaire sur les autres matériaux n'évolue plus car les cellules sont à confluence.

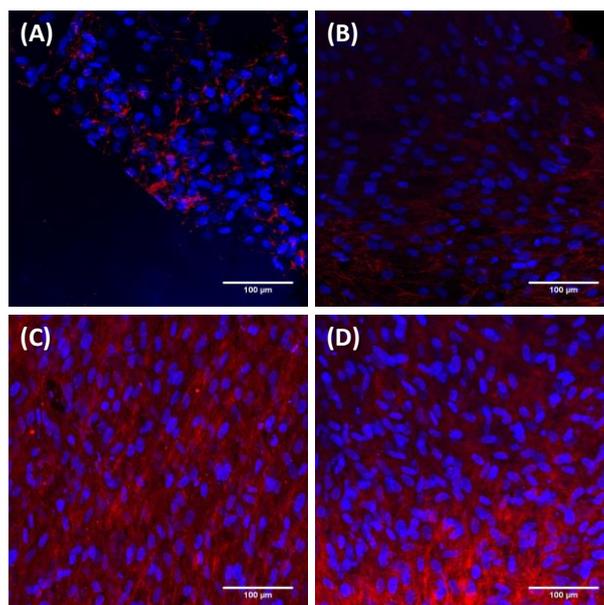


Figure 87 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de la fibronectine à la surface exposée aux UV à 72h (A-B) et à 3 semaines de culture pour le RIP POE(2)BSA(8)/Fb (A) et (C) et le RIP POE(5)BSA(5)/Fb (B) et (D). Les noyaux sont en bleu (DAPI) et la fibronectine est rouge (anticorps secondaire Alexa 633).

Ainsi, la différence de comportement des cellules sur les deux faces des matériaux est principalement observée aux temps de culture assez courts, de l'ordre de 1 à 3 jours. Les cellules cultivées ont du mal à adhérer sur la face qui a été exposée aux UV en raison de forte quantité de POE. Après une semaine, la prolifération cellulaire est suffisante pour que les clichés pris sur les deux faces donnent des résultats très similaires, sauf pour le RIP POE(10)/Fb.

5.2. Cytotoxicité de l'Irgacure 2959

En vue des applications potentielles de tels matériaux chez l'humain, la première étape de validation a été d'étudier la cytotoxicité de l'amorceur de photopolymérisation UV envers les cellules du derme, c'est-à-dire des fibroblastes. L'amorceur choisi (I₂₉₅₉) avait été identifié comme étant le moins cytotoxique parmi les 3 photoamorceurs couramment utilisés en ingénierie tissulaire : Irgacure 2959, Irgacure 651 et Irgacure 184⁵⁸. Des travaux récents sur l'encapsulation de cellules musculaires lisses au sein d'hydrogels réticulés par photopolymérisation radicalaire en présence de ces 3 mêmes amorceurs ont confirmé ces résultats⁵⁹. La viabilité cellulaire est supérieure à 80% pour des doses de 0,2% de cet amorceur.

Lors de notre étude, la proportion d'amorceur a été optimisée (cf § 3.1) et fixée à 1 mole d'I₂₉₅₉ pour 16 moles de méthacrylate. La concentration massique en amorceur est donc différente dans chaque matériau.

	Concentration en I ₂₉₅₉ (% w/v)
BSA(10)/Fb	0,1
POE(2)BSA(8)/Fb	0,16
POE(3)BSA(7)/Fb	0,19
POE(4)BSA(6)/Fb	0,23
POE(5)BSA(5)/Fb	0,25
POE(8)BSA(2)/Fb	0,34
POE(10)/Fb	0,40

Tableau 7 : concentrations finales en I₂₉₅₉ introduites lors de la synthèse des différents RIPs POE-BSA/Fb.

La concentration d'Irgacure 2959 introduite lors de la synthèse des différents RIPs POE-BSA/Fb est donc inférieure à 0,2% pour seulement les formulations contenant moins de 4% de POE.

Pour évaluer les dommages qui pourraient être infligés aux cellules par la décomposition de l'Irgacure 2959, les conditions les plus drastiques ont donc été choisies. Pour cela, les cellules ont, dans un premier temps, étéensemencées au fond d'une plaque de culture pendant 24h. Le milieu de culture est ensuite remplacé par 1mL de différentes solutions (Tableau 8), préparée dans du milieu de culture complet.

Condition n°	Contenu du puits
1	Milieu de culture
2	Milieu de culture + I ₂₉₅₉ 0,042 % (P/V)
3	Milieu de culture + I ₂₉₅₉ 0,21 % (P/V)
4	Milieu de culture + I ₂₉₅₉ 0,21 % (P/V) + PEGDM 5% (P/V) + BSA _m 5% (P/V)
5	Milieu de culture + Staurosporine
6	Milieu de culture + Fibrine 0,5 % (P/V)

Tableau 8 : solutions mises en présence des fibroblastes BJ en présence ou en absence d'UV.

Les cellules adhérentes sont alors mises en contact avec l'amorceur en présence ou non d'un mélange PEGDM(5) BSA_m(5), ou de fibrine (0,5%). Deux doses sont testées : un rapport molaire I₂₉₅₉ :méthacrylate de 1 :77, c'est-à-dire 0,042% (correspondant au ratio employé pour les matériaux non optimisés – cf § 3.1) et un rapport molaire de 1 :13 soit 0,21%. Les différents puits sont ensuite exposés ou non aux UV pendant 1 h, à 37°C. Le témoin négatif correspond à des cellules qui ont été mises en contact avec de la staurosporine (composé ayant une activité inhibitrice des protéines kinases qui induit l'apoptose) et le témoin positif correspond au puits qui ne contient pas de composé additionnel, mais qui est ou pas exposé aux UV. La viabilité des cellules est ensuite mesurée et les résultats sont présentés sur la Figure 88.

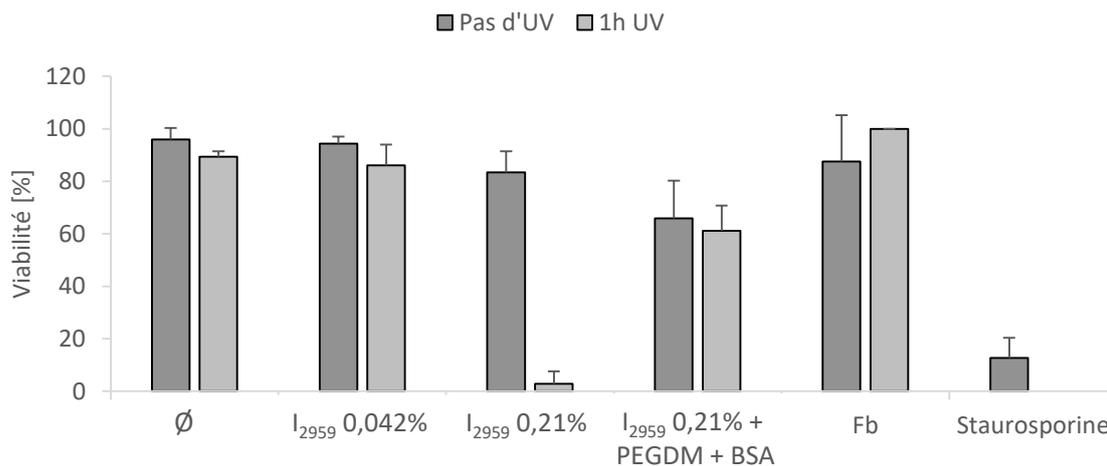


Figure 88 : cytotoxicité de l'I₂₉₅₉ sur des fibroblastes BJ. Les cellules adhérentes sont incubées en présence de différentes doses d'amorceur, de précurseurs PEGDM et BSA, de fibrine ou de staurosporine ou sans rien, avec ou sans UV, pendant 1 heure.

Les résultats sont exprimés en pourcentage de viabilité cellulaire. En présence de staurosporine (témoin négatif), 90% des cellules incubées meurent (taux de viabilité de 10%). Lorsque les cellules ne sont pas exposées à un composé exogène (témoin positif), après 1h, plus de 95% de viabilité cellulaire est mesurée en absence d'UV, et environ 90% en présence d'UV. L'exposition aux UV pendant 1h, dans ces conditions, ne semble donc pas induire une forte mortalité cellulaire. La mortalité cellulaire en présence de fibrine, avec ou sans UV, est donc négligeable.

En présence de 0,042% d'Irgacure 2959 et sans UV, une viabilité cellulaire excellente, de l'ordre de 95%, est conservée. En présence d'UV, cette valeur est réduite à 85%. Une dose plus élevée d'amorceur (0,21%) en présence d'UV a des effets très délétères sur la viabilité cellulaire qui chute à 5%. En revanche, même à cette forte concentration, en l'absence d'UV, la viabilité cellulaire demeure supérieure à 80%. Ces résultats permettent de conclure que l'Irgacure est une molécule relativement stable et peu cytotoxique en l'absence de stimulus extérieur. Si l'amorceur est exposé aux UV, sa décomposition commence, libérant des radicaux libres qui induisent une mortalité cellulaire bien plus importante.

Nous nous sommes demandé si la présence de groupements méthacrylate, qui sont très réactifs vis-à-vis de ces radicaux libres, permettrait d'améliorer la survie cellulaire. C'est l'objet de la dernière condition qui a été testée ; c'est-à-dire que les cellules sont en présence d'Irgacure et de PEGDM et de BSA portant des fonctions méthacrylate. On observe une viabilité de l'ordre de 60% que les cellules aient été exposées aux UV ou non. L'introduction de PEGDM et de BSA induit donc une mortalité cellulaire plus importante. Il est possible qu'elle soit liée à la présence des groupements méthacrylate qui sont connus pour avoir un effet cytotoxique sur les cellules eucaryotes²³⁹. Cependant, après l'exposition aux UV de ce même mélange, la

viabilité cellulaire est très supérieure (60%) à celle observée lors de l'incubation sans le PEGDM et la BSA_m (5%). Cela signifie donc que la présence de groupements méthacrylate qui réagissent avec les radicaux libres générés par la décomposition de l'amorceur, permet de diminuer significativement la mortalité cellulaire.

6. Conclusion

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il est possible de synthétiser des RIPs à base de fibrine et d'un oligomère synthétique commercial, le PEGDM. Sa copolymérisation avec la BSA modifiée par des groupements méthacrylate permet d'obtenir un coréseau dégradé. Les hydrogels sont synthétisés par polymérisation radicalaire. La proportion d'amorceur a été optimisée pour obtenir la meilleure réticulation possible, afin de réduire la fuite de monomères non réticulés hors du matériau lors de son utilisation *in vivo*. Plusieurs formulations, dans lesquelles le pourcentage de PEGDM et de BSA_m varient, ont été testées. Les propriétés viscoélastiques et la biodégradabilité peuvent être modulées par ce biais : plus le RIP est riche en POE, plus son module de stockage est élevé, et plus sa dégradation sera ralentie.

Nous avons également montré que ces matériaux ne sont pas cytotoxiques : la viabilité de fibroblastes cultivés à leur surface demeure supérieure à 90% même après 3 semaines de culture, et la prolifération cellulaire y est très importante, de même que la sécrétion de protéines matricielles. Dans le cadre de l'ANR FibriDerm, des expériences d'organotypie (culture d'explants de tissus différenciés d'origine animale, norme AFNOR NFS 11-146) ont également été réalisées sur le RIP POE(5)BSA(5)/Fb. Ce matériau favorise l'adhérence cellulaire pour des cellules issues d'explants de peau, d'intestin, de gonades, de cerveau, de cornée et de vaisseaux. Le RIP à base de fibrine pourrait donc être utilisé pour des applications diverses en ingénierie tissulaire, au contact de différents organes.

Les essais de cytotoxicité de l'amorceur ont révélé que lors de la photopolymérisation, les radicaux libres peuvent avoir un effet néfaste sur la viabilité cellulaire, comme rapporté dans la littérature^{59,240,241}. Cependant, la viabilité cellulaire est maintenue supérieure à 65% en présence du PEGDM et de l'albumine. Il est donc envisageable d'encapsuler des cellules dans ces RIPs. Afin de limiter l'effet néfaste des rayonnements UV et de l'amorceur, il serait envisageable de diminuer la concentration en amorceur et de réduire le temps de polymérisation à 30 min. Les fractions solubles seraient alors plus élevées mais inférieures à 22% et les propriétés viscoélastiques moins importantes. L'oligomère synthétique pourrait également être purifié préalablement pour éliminer l'inhibiteur de polymérisation qu'il contient. Cela permettrait également de réduire le temps d'exposition aux UV.

Nous avons également montré que ces RIP peuvent être également synthétisés à partir d'un mélange PEGDM/PEGM. Le poly(éthylène glycol) méthacrylate, n'ayant qu'une seule fonction réactive, forme donc des chaînes pendantes au sein du réseau. Cela modifie la taille de la maille et donc les propriétés

viscoélastiques des RIPs, ainsi que son volume libre. Les caractérisations de ces RIP n'étant pas complètes, nous ne les présentons pas dans ce manuscrit. Ces matériaux pourraient être intéressants pour l'encapsulation cellulaire car un réseau plus lâche permettrait un remodelage plus important par les cellules.

Chapitre 4 : Greffage et délivrance de molécules à activité bactéricide

Dans le chapitre précédent, la mise au point de la synthèse et la caractérisation d'une première série de RIPs POE-BSA/Fb ont été présentées. Leurs propriétés viscoélastiques, leur vitesse de dégradation et le comportement cellulaire à leur surface peuvent être modifiés en fonction de la proportion de de BSA qu'ils contiennent. À ce stade, nous disposons donc d'un ensemble de matériaux qui peuvent être utilisés pour différentes applications.

Dans ce nouveau chapitre, nous avons cherché à augmenter les modules mécaniques de ces RIPs et à ralentir leur vitesse de dégradation enzymatique, tout en cherchant à limiter l'attachement de bactéries à leur surface qui est souvent suivi de l'implantation d'un biofilm bactérien. En effet, même si d'importants progrès ont été faits dans le développement des biomatériaux et des dispositifs médicaux, certains obstacles limitent encore considérablement leur utilisation *in vivo*. Parmi eux, la colonisation des biomatériaux implantés par des micro-organismes est, à l'heure actuelle, la principale complication. Lorsque des infections se développent, le dispositif médical doit alors être intégralement retiré, ce qui peut être difficile à mettre en œuvre et peut engendrer des complications sérieuses pour la santé du patient.

La première partie de chapitre est consacrée à une présentation succincte des problèmes de colonisation des biomatériaux par les bactéries et des solutions qui permettent de lutter contre ce phénomène. Des composés bactéricides seront ensuite choisis et incorporés dans les matériaux, puis les propriétés de ces nouveaux RIPs (réticulation, propriétés viscoélastiques et effet sur la croissance microbienne) sont étudiées.

1. Colonisation bactérienne et biomatériaux antibactériens

1.1. Colonisation bactérienne des surfaces

Les biofilms sont décrits comme une communauté d'origine microbienne, caractérisée par des cellules. Celles-ci sont attachées de façon irréversible à un support ou à une interface ; elles sont englobées dans leur propre matrice de polymères extracellulaire (EPS = ExtraPolymeric Substances), laquelle représente

jusqu'à 90% de la masse du biofilm ²⁴². Ils constituent le moyen de croissance bactérienne le plus répandu dans la nature. La formation d'un biofilm (Figure 89) est initiée par l'attachement de bactéries planctoniques sur une surface, *via* des interactions non spécifiques (forces électrostatiques et de Van der Waals). Sur les biomatériaux implantés, la surface est rapidement modifiée par l'adsorption de protéines provenant de l'hôte (protéines de la MEC et produits de la coagulation). Cette étape, appelée « conditionnement », facilite l'attachement des bactéries sur la surface du matériau. Ces dernières s'attachent alors de manière irréversible et forment des microcolonies. Elles produisent une matrice extracellulaire constituée de polysaccharides, de protéines, d'acides nucléiques et de lipides ²⁴³. Le biofilm mature peut ensuite se rompre et permettre la libération de bactéries qui se répandent dans le milieu environnant et donc dans le corps du patient dans le cas des dispositifs médicaux. Ces bactéries sont à l'origine d'infections dites chroniques.

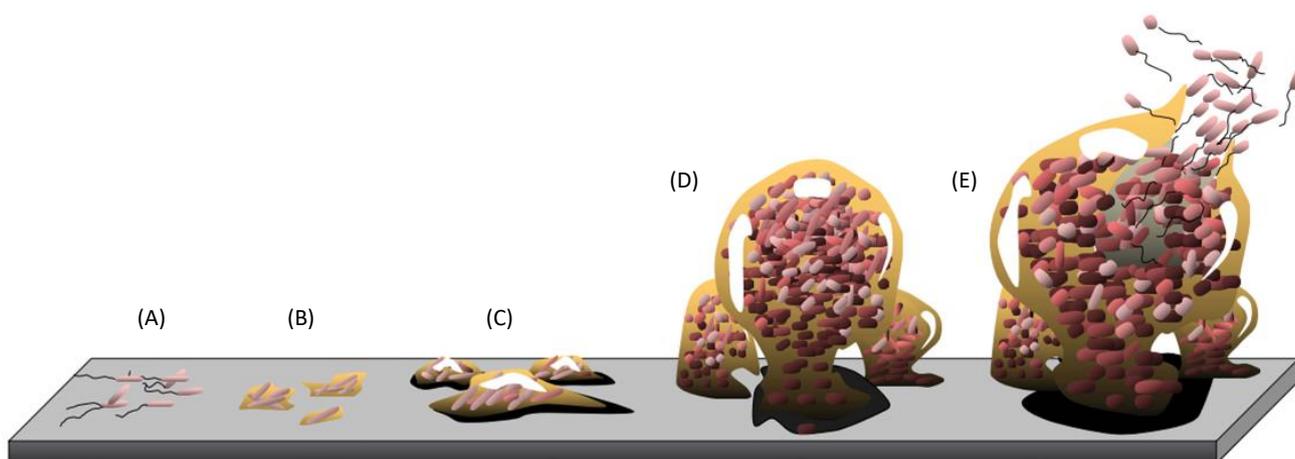


Figure 89 : formation d'un biofilm. (A) attachement initial (B) attachement irréversible (C) et (D) maturation du biofilm (E) dispersion. D'après Monroe *et al* ²⁴⁴.

De nombreuses études ont montré que les bactéries qui se trouvent dans les biofilms sont plus résistantes aux stress environnementaux (déshydratation, toxicité des métaux, exposition aux UV, ...) que les bactéries planctoniques. Ainsi, des doses d'antibiotiques jusqu'à 1000 fois supérieures à celles qui sont utilisées pour leurs équivalents planctoniques sont nécessaires pour les éradiquer ²⁴⁵. Une fois qu'il est établi, il est très difficile d'éliminer le biofilm. Il est donc primordial d'empêcher en amont l'attachement des bactéries à la surface des matériaux, afin que le biofilm ne puisse pas se mettre en place.

1.2. Stratégie pour limiter le développement bactérien

Il existe un certain nombre de stratégies visant à limiter l'attachement et à entraîner la destruction des bactéries à la surface des biomatériaux. Nous distinguerons ici 5 méthodes employées dans le cadre de l'ingénierie tissulaire pour conférer un caractère antimicrobien à des hydrogels.

1.2.1. Incorporation d'antibiotiques dans les hydrogels

Les antibiotiques, substances naturelles plutôt que synthétiques, sont des composés antimicrobiens. Ils sont produits par un large éventail de micro-organismes fongiques et bactériens. Ils sont caractérisés par une action spécifique sur une cible microbienne précise, leur efficacité à faible dose et une faible toxicité pour les cellules eucaryotes. Ils ont un large spectre d'action, avec un effet qui peut être bactériostatique (inhibition de la croissance) ou bactéricide (destruction d'autres micro-organismes) ²⁴⁶. Les antibiotiques identifiés en milieu naturel sont très nombreux, mais moins de 1% d'entre eux sont médicalement utiles. Dans la littérature, on trouve un peu plus d'une trentaine d'hydrogels, souvent à base de chitosane, permettant le relargage contrôlé de différents antibiotiques. Parmi eux, environ 15 gels d'architecture RIP ou semi RIP ont été décrits ²⁴⁷. Les antibiotiques relargués sont alors multiples (gentamicine, amoxicilline, vancomycine, ...). Les principales applications de ces hydrogels gonflés d'antibiotique sont, d'une part, les lentilles de contact et, d'autre part, les pansements, pour les plaies chroniques et les brûlures ²⁴⁸. Cependant, le mauvais usage des antibiotiques (non-respect des doses et des durées prescrites, utilisation abusive) a favorisé l'émergence de souches résistantes aux antibiotiques. Ces problèmes ont conduit à la recherche d'autres solutions pour empêcher l'adhérence et la croissance bactériennes.

1.2.2. Incorporation d'agents inorganiques antimicrobiens

Les sels d'argent (le plus souvent sous forme de nanoparticules) sont probablement les agents antimicrobiens le plus fréquemment utilisés au sein d'hydrogels ²⁴⁹. Ils jouissent d'une réputation de grande efficacité envers des souches bactériennes variées, des champignons et des virus. Plusieurs mécanismes d'action des sels d'argent ont été proposés. Ainsi, les ions Ag⁺ interagiraient avec les thiols des enzymes de la chaîne respiratoire, en rompant les liaisons hydrogène au sein de l'ADN microbien et en causant des dommages membranaires ²⁵⁰.

Deux problèmes sont fréquemment rencontrés lors de l'utilisation de nanoparticules de ce type. Il faut s'assurer que leur dispersion est homogène et qu'elles demeurent stables au sein de l'hydrogel. De plus, les nanoparticules d'argent induisent également l'apoptose et la nécrose des cellules des mammifères ²⁴⁸. S'ils sont ingérés, les sels d'argent provoquent l'argyrie, une pathologie qui cause une coloration du derme dans des tons bleu/gris. Des particules de cuivre, moins étudiées que celles d'argent, possèdent également un effet bactéricide ²⁵¹. Leur utilisation a toutefois été associée à des allergies ou à la maladie de Wilson ²⁵². Une certaine prudence est donc de rigueur dans l'utilisation de ces composés.

1.2.3. Utilisation de peptides antimicrobiens

Ces molécules sont produites par une grande variété de bactéries, champignons, plantes et animaux (batraciens en particulier). Elles font partie du système de défense contre les pathogènes chez les organismes supérieurs. Ces peptides ou protéines de petite taille peuvent induire la mort ou inhiber la croissance des micro-organismes, sans que cela relève d'une action enzymatique. Ils peuvent également posséder une activité antivirale, moduler la réponse immunitaire et avoir un effet cytotoxique vis-à-vis des cellules cancéreuses²⁵³. Leur large spectre d'activité les rend particulièrement attractifs dans le contexte du déclin de l'efficacité des antibiotiques. Ils peuvent agir sur la paroi des micro-organismes mais certains ciblent également des fonctions intracellulaires. Ils sont efficaces à de faibles concentrations (de l'ordre du nM et du μ M). Leur nature peptidique les rend biocompatibles et ils sont susceptibles d'être dégradés *in vivo*. Les peptides antimicrobiens identifiés dans la nature sont généralement constitués d'une cinquantaine d'acides aminés. De nature cationique, ils ont tendance à former des structures amphipatiques en raison de leur forte proportion en acides aminés hydrophobes. Parmi eux, les magainines, initialement isolées de la peau de la grenouille *Xenopus laevis*²⁵³, adoptent une structure en hélice α ²⁵⁴. Les défensines, d'origine humaine, se structurent en feuillet β ²⁵⁵. Les bactéries ont développé plusieurs systèmes pour résister à ces peptides : des pompes à efflux, telles que QacA de *S. aureus*²⁵⁶ et MtrCE de *N. gonorrhoeae*²⁵⁷ mais aussi la modification de la composition lipidique de leurs membranes²⁵⁸. Le coût élevé, la complexité de leur synthèse, leur toxicité potentielle et leur rapide dégradation dans le sérum sont autant d'inconvénients qui ont limité leur utilisation dans des essais cliniques. En 2014, aucun peptide antimicrobien n'avait reçu l'agrément de la FDA pour une utilisation clinique²⁵⁵.

1.2.4. Synthèse d'hydrogels à partir de polymères antimicrobiens

Ces polymères peuvent être d'origine naturelle, comme le chitosane qui a été présenté dans le chapitre 1 (cf § 6.2.1.2). Son action antibactérienne est liée à des interactions électrostatiques, hydrophobes et par chélation²⁴⁹ (en fonction du poids moléculaire). La poly- ϵ -lysine (Figure 90A) est un homopolymère naturel de lysine (avec un nombre de motifs compris entre 25 et 20) qui interagit de manière électrostatique avec la surface microbienne et induit des dommages cellulaires. Les polymères cationiques synthétiques peuvent aussi être utilisés à des fins antimicrobiennes. Les plus fréquemment utilisés sont le polyéthylèneimine (PEI) et les polyguanidines. Le PEI (Figure 90B) est un polymère non biodégradable contenant des fonctions amine primaire, secondaire et tertiaire, sur lesquelles un grand nombre de modifications chimiques peuvent être faites. La viabilité bactérienne est inférieure à 10% en contact avec des hydrogels contenant 5,2 et 6,9% P/V de PEI, tant pour *E. coli* que pour *S. aureus*, sans pour autant induire la lyse des globules rouges²⁵⁹.

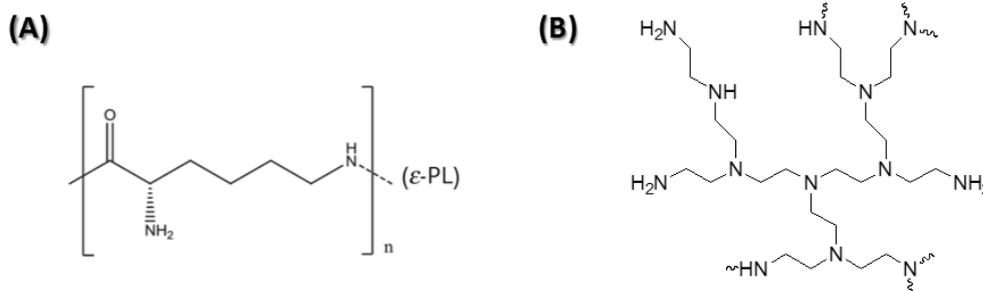


Figure 90 : structure chimique du polymère (A) poly- ϵ -lysine ; (B) polyéthylèneimine.

1.2.5. Incorporation de sels d'ammonium ou de phosphonium (QAS ou QPS)

L'efficacité bactéricide de ces sels a été découverte dans les années 1930²⁶⁰. Plusieurs générations de QAS/QPS avec des structures variées, ont été élaborées (Figure 91). Les groupes QAS/QPS peuvent être polymérisés directement au sein des hydrogels, ou greffés de manière covalente sur des polymères synthétiques ou naturels. Le principal avantage de ces sels d'ammonium et de phosphonium est leur grande versatilité. Le monomère peut contenir différentes fonctions chimiques permettant une polymérisation. Les plus fréquentes sont les vinyles et les acrylates²⁶⁰. En général, le groupement cationique est attaché à une chaîne alkyle (donc hydrophobe), dont la longueur varie entre 6 et 12 carbones. Ils peuvent être immobilisés au sein d'hydrogels à base d'alcool poly(vinyle), de polyacrylate, de polyuréthane ou de polyéthylèneimine²⁶¹. Leur coût est très faible en comparaison de celui des peptides antimicrobiens, et leur synthèse peut être adaptée pour influencer certaines propriétés, notamment les propriétés mécaniques du matériau auquel ils sont incorporés.

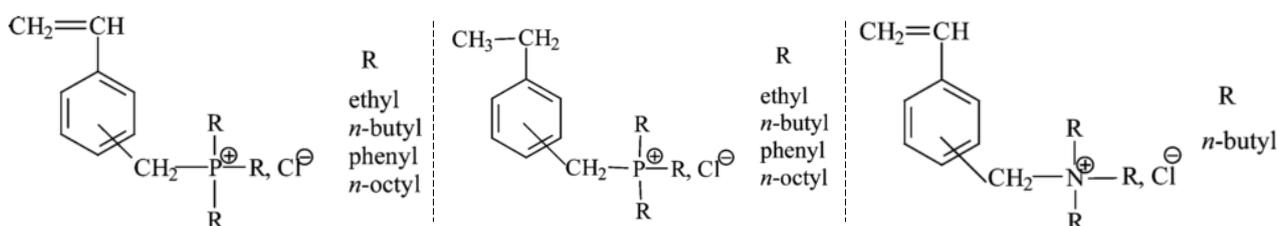


Figure 91: structure de quelques sels d'ammonium et de phosphoniums quaternaires connus pour leur activité antimicrobienne²⁶².

Nous avons choisi de travailler avec un groupement de type ammonium quaternaire en raison des avantages présentés ci-dessus. Ces composés ont été ajoutés aux RIP POE-BSA/Fb précédemment mis au point. En effet, le remplacement total du POE par un polymère possédant une activité antimicrobienne aurait

demandé de reprendre toute la mise au point des synthèses et les caractérisations, ce qui ne pouvait être envisagé dans le temps imparti.

Les QAS ont un large spectre antibactérien, ciblant, à la fois, les bactéries Gram négatif et les bactéries Gram positif. Ce composé, s'il est greffé au réseau, devrait donc assurer une inhibition par contact avec le matériau. Nous avons également travaillé avec un sel d'ammonium non greffé, inclus dans le matériau. Il devrait être capable de diffuser hors du matériau et d'exercer son action bactéricide dans l'environnement proche.

2. Choix et caractéristiques des composés bactéricides

Parmi les QAS commerciaux, nous avons identifié le chlorure de vinyl benzyl triméthyl ammonium (Figure 92A). Le styrène associé au groupement ammonium peut, en effet, copolymériser par voie radicalaire avec les groupements méthacrylate du PEGDM et de la BSA_m et ainsi être greffé au réseau de manière covalente. La structure de ce composé a été vérifiée par résonance magnétique nucléaire (¹H).

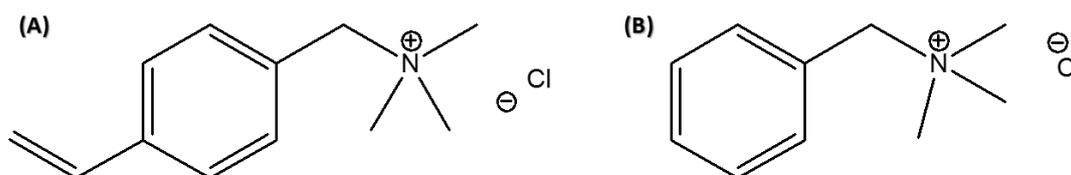


Figure 92 : structure chimique des chlorure de (A) vinyl benzyl triméthyl ammonium, abrégé ici en SN⁺. M = 211,73 g.mol⁻¹ et (B) Benzyl triméthyl ammonium (abrégé BN⁺). M = 185,69 g.mol⁻¹.

La solubilité maximale de ce composé dans du tampon Tris a été déterminée à 2 g.mL⁻¹ (la solution est alors très visqueuse). Nous avons choisi de travailler avec des solutions stock à 800 mg.mL⁻¹ dans du tampon Tris 50mM.

Afin d'étudier le greffage de SN⁺ sur le coréseau POE/BSA et son intérêt relatif par rapport à celui d'un bactéricide inclus dans le matériau et relargué par diffusion, un second système a été étudié en parallèle. Il s'agit de RIP POE-BSA/Fb contenant du chlorure de benzyl triméthyl ammonium (BN⁺). Ce composé est, lui aussi, un ammonium quaternaire, dont la structure est très semblable à celle du SN⁺, à ceci près qu'il ne possède pas de groupement vinyle (Figure 92B) et ne peut donc pas être greffé au réseau. Incorporé dans la solution de précurseurs avant polymérisation, il devrait ensuite relarguer du matériau par diffusion. Les gels synthétisés de cette façon pourraient donc constituer des réservoirs de molécules bactériostatiques, dont la cinétique de relargage devra être étudiée.

Après les avoir choisis, nous avons procédé à la caractérisation des deux sels.

2.1. Coefficient d'extinction molaire

Afin de quantifier les sels d'ammonium, lors des étapes de rinçage des matériaux ou après leur dégradation ou lors de leur diffusion éventuelle hors de l'hydrogel, les spectres de solutions aqueuses de SN^+ et BN^+ à différentes concentrations ont été enregistrés de 200 à 600 nm. Les deux composés présentent deux bandes principales d'absorption, l'une centrée à 210 nm, et l'autre, très large, centrée à environ 250 nm. Les coefficients d'extinction molaire des deux composés ont été calculés à ces deux longueurs d'onde à partir des droites $A = f([SN^+])$ et $A = f([BN^+])$ (Tableau 9).

	ϵ (210 nm)	ϵ (250 nm)
Styrène Ammonium	86 100	94 100
Benzyl Ammonium	26 300	13 600

Tableau 9 : coefficients d'extinction molaire des sels d'ammonium utilisés, exprimés en $L \cdot mol^{-1} \cdot cm^{-1}$.

Contrairement à ce que l'on observe pour le benzyl ammonium, le coefficient d'extinction à 250 nm du styrène ammonium est supérieur à celui que l'on mesure à 210 nm. Cela peut être expliqué par la conjugaison plus importante du styrène (groupement vinyle en plus du motif benzyle). Les autres précurseurs des réseaux ayant une absorbance plus faible à 210 qu'à 250 nm, c'est à 210 nm que seront faites les mesures par la suite.

2.2. Détermination des concentrations minimales inhibitrices

Afin de vérifier l'efficacité de ces deux sels d'ammonium pour inhiber la croissance bactérienne, leur concentration minimale inhibitrice a été déterminée pour deux souches bactériennes : *Staphylococcus epidermidis*, un bacille Gram positif qui fait partie de la flore commensale de la peau mais peut être un pathogène opportuniste, plus particulièrement chez des patients immunodéprimés. *Escherichia coli*, un bacille Gram négatif, est abondamment retrouvé dans le tube digestif des animaux à sang chaud ; seules quelques souches sont pathogènes (entérohémorragiques, entérotoxigéniques, entéroinvasives, uropathogènes...). Pour déterminer les concentrations inhibitrices, l'inoculum bactérien est incubé 24h en présence de chaque sel d'ammonium à différentes concentrations. La concentration minimale inhibitrice (CMI) du produit sur la souche correspond à la limite d'apparition du trouble dans les puits, c'est-à-dire à la concentration pour laquelle la croissance est inhibée (Figure 93).

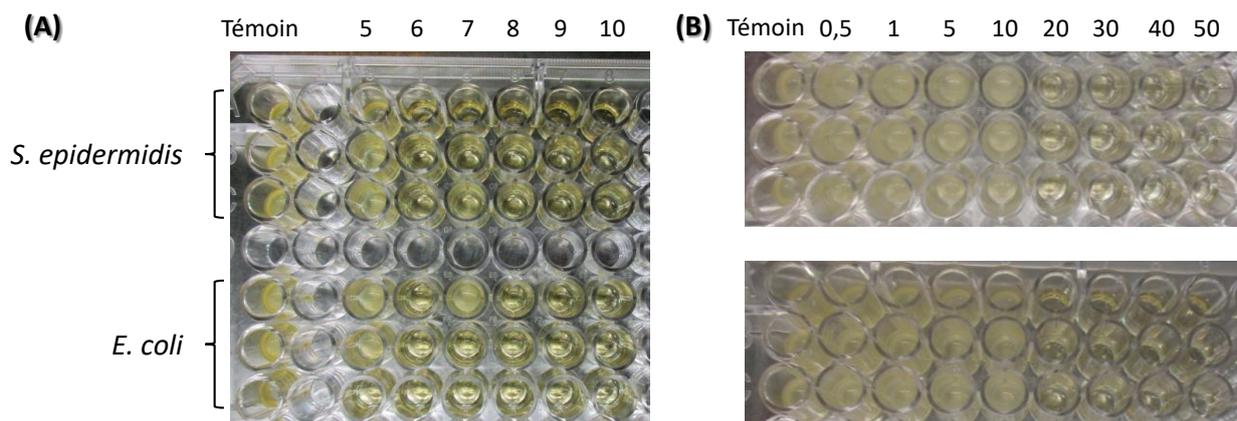


Figure 93 : détermination de la concentration minimale inhibitrice des chlorure de (A) styrène ammonium (SN⁺) et (B) benzyl ammonium (BN⁺) sur *S. epidermidis* et *E. coli*. Les concentrations sont exprimées en mg.mL⁻¹.

Une concentration de 6 mg.mL⁻¹ du styrène ammonium est nécessaire pour avoir une activité bactériostatique. Cette valeur est la même pour les deux souches bactériennes, ce qui indique que l'action du sel d'ammonium est identique pour les Gram négatifs et les Gram positifs. Le styrène ammonium est donc capable, à une concentration de plus de 6 mg.mL⁻¹, d'empêcher la croissance bactérienne. Quelle que soit la souche bactérienne, la concentration minimale inhibitrice du Benzyl Ammonium est de 20 mg.mL⁻¹.

Les deux sels d'ammonium choisis ont tous les deux une activité bactériostatique. La différence de CMI est un peu surprenante, car, *a priori*, c'est plutôt l'ammonium quaternaire qui induit la toxicité sur les souches bactériennes, et la présence ou l'absence du vinyle ne devrait avoir aucune influence.

Les concentrations minimales bactéricides ont également été déterminées. Elles sont très similaires aux valeurs de CMI mesurées, donc les deux composés sont bactéricides.

3. Synthèse de RIPs POE-BSA/Fb contenant des sels d'ammonium

La synthèse de réseaux interpénétrés de polymères contenant les sels d'ammonium a ensuite été mise au point. Le protocole reste quasiment identique à celui de la synthèse des RIPs POE-BSA/Fb, à ceci près que, lors du mélange des précurseurs, l'un des sels d'ammonium solubilisé dans le tampon Tris est ajouté. Pour cela, une partie du volume de tampon est remplacée par le même volume de solution de sels d'ammonium (SN⁺ ou BN⁺). Les pourcentages indiqués correspondent à des pourcentages massiques dans le matériau total. La polymérisation est ensuite réalisée comme précédemment, par exposition du mélange de précurseurs aux UV (365 nm) pendant 1h à 37°C (Figure 94).

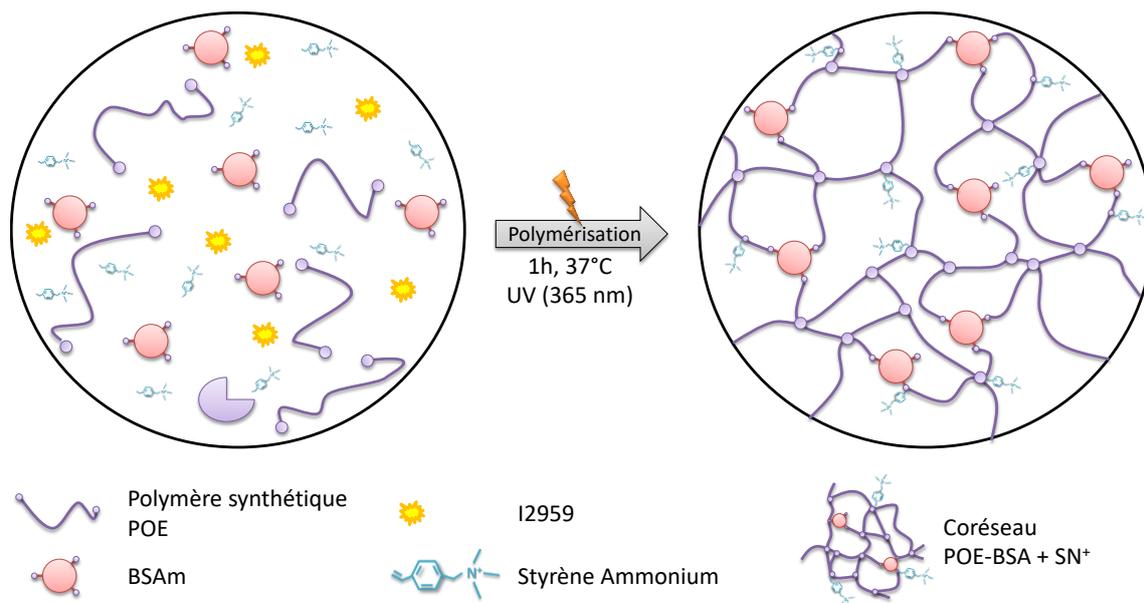


Figure 94 : schéma de la synthèse des coréseaux POE-BSA incorporant le styrène ammonium. Le styrène Ammonium peut être remplacé par le benzyl ammonium (BN⁺) qui n'est pas greffé au réseau.

3.1. Aspect des RIPs contenant les sels d'ammonium

La formation des réseaux a été suivie en enregistrant l'évolution des modules G' et G'' en fonction du temps d'exposition. L'introduction du styrène ammonium dans le milieu de synthèse provoque une augmentation de la concentration des fonctions réactives, mais aussi une diminution de la fonctionnalité moyenne, ce qui peut modifier le temps de gel des RIPs. Tous les matériaux présentent une transition sol/gel comprise entre 3 et 10 min selon la composition du RIP POE-BSA/Fb. La présence de styrène ammonium ne modifie donc pas le temps nécessaire à la gélification.

La présence de styrène ammonium n'empêchant pas que la réaction se déroule, les matériaux ont été synthétisés dans le moule. Nous utilisons la notation suivante : POE(x)BSA(y)SN⁺(z)/Fb pour les matériaux contenant le styrène ammonium ou POE(x)BSA(y)BN⁺(z)/Fb pour les matériaux contenant le benzyl ammonium. Comme précédemment, x et y désignent les pourcentages massiques en POE et BSA dans la solution de synthèse, alors que z désigne le pourcentage massique en sels d'ammonium quaternaire.

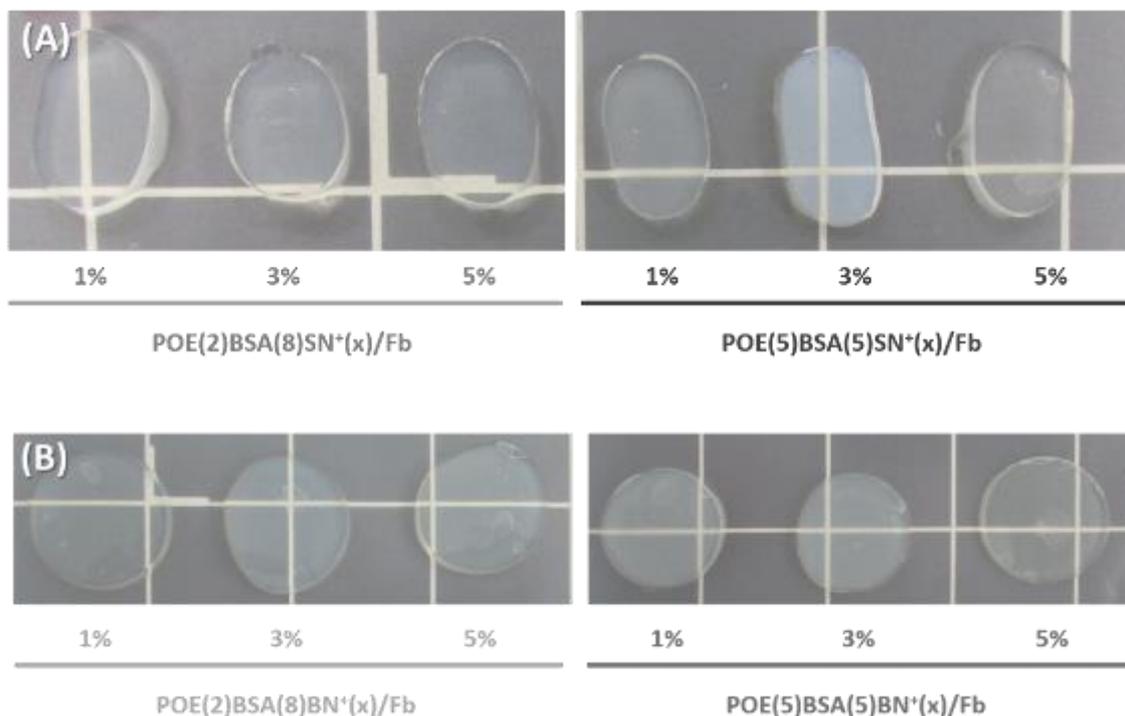


Figure 95 : photos des RIPs POE-BSA/Fb contenant différentes proportions de (A) Styrène Ammonium (SN⁺) et (B) Benzyl Ammonium (BN⁺) en sortie de synthèse : Les pourcentages massiques en sels d'ammonium sont indiqués sous les images, pour chaque formulation.

Les RIPs POE-BSA/Fb contenant le styrène ammonium sont notablement plus rigides et résistants à la déformation manuelle que leurs équivalents n'en contenant pas. Par contre, aucune différence significative n'est décelée entre les RIPs POE-BSA/Fb contenant du Benzyl Ammonium et ceux qui n'en contiennent pas. Tous ces matériaux nouveaux sont homogènes et transparents (ou translucides pour les formulations les plus riches en styrène ammonium).

3.2. Vérification du greffage du styrène ammonium au coréseau POE-BSA

Il est possible que la présence des sels d'ammonium gêne la formation du réseau de fibrine (clivage enzymatique catalysé par la thrombine) ce qui se traduirait dans les matériaux par une fraction de protéines non greffées plus élevée. Un dosage BCA des extractibles protéiques a permis de connaître la concentration en protéines dans le surnageant de diffusion.

Nous avons également vérifié que le styrène copolymérise bien avec les fonctions méthacrylate du PEGDM et de la BSA_m, comme nous le souhaitons, en mesurant les fractions solubles « synthétiques ». Nos références sont alors les RIPs POE-BSA/Fb équivalents qui contiennent du benzyl ammonium. Celui-ci doit être totalement extrait du matériau. Ces fractions solubles ont été quantifiées comme précédemment, hormis le changement du solvant d'extraction. En effet, le dichlorométhane ne permettant pas de solubiliser

le styrène ammonium même à de faibles concentrations (Figure 96), il a été remplacé par de l'éthanol dans lequel le SN⁺ est soluble jusqu'à une concentration de 50 mg.mL⁻¹.

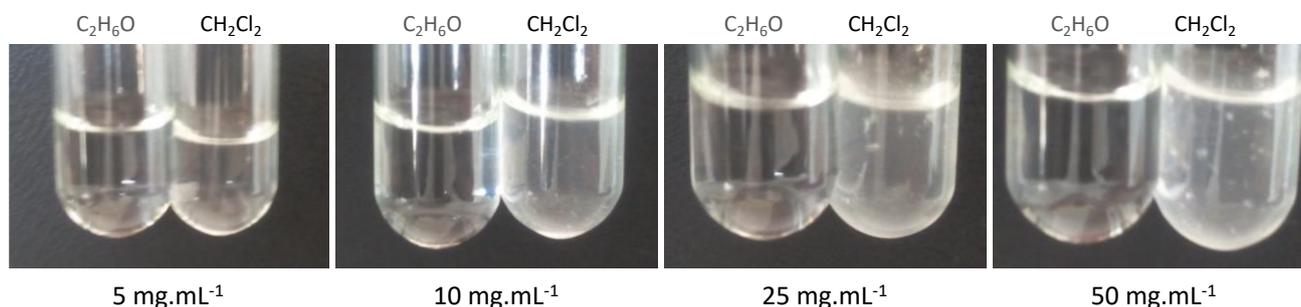


Figure 96 : solutions de Styrène Ammonium à différentes concentrations (5-50 mg.mL⁻¹) dans l'éthanol (C₂H₆O) et dans le dichlorométhane (CH₂Cl₂).

Les différentes fractions solubles contenues dans les différents RIPs sont résumées dans le Tableau 10.

	Styrène Ammonium (SN ⁺)		Benzyl Ammonium (BN ⁺)			
		Extractibles protéiques [%]	Extractibles synthétiques [%]		Extractibles protéiques [%]	Extractibles synthétiques [%]
POE(2)BSA(8) Ammonium(z)/Fb	SN ⁺ (0)	3,0 ± 0,3		BN ⁺ (0)	3,0 ± 0,3	
	SN ⁺ (1)	3,5 ± 1,9	21 ± 4	BN ⁺ (1)	3,7 ± 0,4	32 ± 1
	SN ⁺ (3)	6,4 ± 2,8	18 ± 4	BN ⁺ (3)	3,5 ± 0,6	38 ± 2
	SN ⁺ (5)	3,3 ± 2,3	15 ± 1	BN ⁺ (5)	3,6 ± 0,4	46 ± 2
POE(5)BSA(5) Ammonium(z)/Fb	SN ⁺ (0)	2,6 ± 0,3		BN ⁺ (0)	2,6 ± 0,3	
	SN ⁺ (1)	1,4 ± 0,9	20 ± 1	BN ⁺ (1)	4,0 ± 1,9	28 ± 2
	SN ⁺ (3)	2,0 ± 1,8	13 ± 4	BN ⁺ (3)	5,2 ± 0,5	36 ± 3
	SN ⁺ (5)	2,2 ± 2,0	14 ± 1	BN ⁺ (5)	5,1 ± 0,7	48 ± 5

Tableau 10 : taux d'extractibles protéiques et synthétiques contenus dans les RIPs avec les différents sels d'ammonium.

Quelle que soit la composition du RIP et la proportion de sels d'ammonium qu'il contient (jusqu'à 50 mg.mL⁻¹), les fractions solubles protéiques sont inférieures à 6%. Il est intéressant de noter que ces valeurs restent très proches de celles qui sont mesurées sur les RIPs POE-BSA/Fb ne contenant pas de sel ammonium. Ainsi, la présence du sel d'ammonium, quelles que soient sa nature et sa proportion, ne semble perturber ni la formation du réseau de fibrine, ni la réticulation de la BSA via ses fonctions méthacrylate.

Les fractions solubles synthétiques contenues dans les RIPs POE-BSA/Fb sont plus élevées lorsqu'ils sont synthétisés en présence de styrène ammonium plutôt qu'en présence de benzyl ammonium. Ainsi, les

RIPs POE-BSA-SN⁺/Fb ont des fractions solubles synthétiques comprises entre 13 et 20% alors que les RIPs PEO-BSA-BN⁺/Fb en contiennent entre 32 et 48%. Ces valeurs incluent une partie ou la totalité du sel d'ammonium introduit, du PEGDM qui n'aurait pas réagi, mais aussi les sels (NaCl, CaCl₂ et sels de Tris) et les protéines non greffées qui sont solubles dans l'éthanol. La proportion théorique correspondant à tous les sels de synthèse et les protéines qui ne seraient pas réticulées (évaluée à 3%, cf Tableau 10) est de l'ordre de 13%. Lors de l'extraction avec l'éthanol, la quantité de produits extraits correspond quasiment à la quantité de sels de synthèse et de protéines non greffées présents dans les matériaux. Comme nous le souhaitons, le styrène ammonium a bien copolymérisé avec les méthacrylates du PEGDM et de la BSAm. En effet, si le styrène homopolymérisait sans se greffer au réseau, le polystyrène pourrait ensuite être extrait des matériaux lors de l'extraction solide liquide.

Dans les RIPs contenant le benzyl ammonium, ces taux de fractions solubles sont bien supérieurs aux 13% de sels de synthèse et protéines qu'ils contiennent. La différence, qui dépend peu de la composition du RIP POE-BSA/Fb, correspond quasiment, mais pas tout à fait, à la quantité de benzyl ammonium introduite. Logiquement, ce sel qui n'est pas greffé peut, lui, être extrait du matériau.

Une fois assurés que les matériaux sont correctement synthétisés, nous avons procédé à la caractérisation.

4. Caractérisation des matériaux

4.1. Caractérisation de la morphologie des matériaux

Des images de microscopie électronique à balayage (MEB) ont été réalisées afin d'étudier la morphologie du réseau contenant le Styrène Ammonium (Figure 97 et Figure 98).

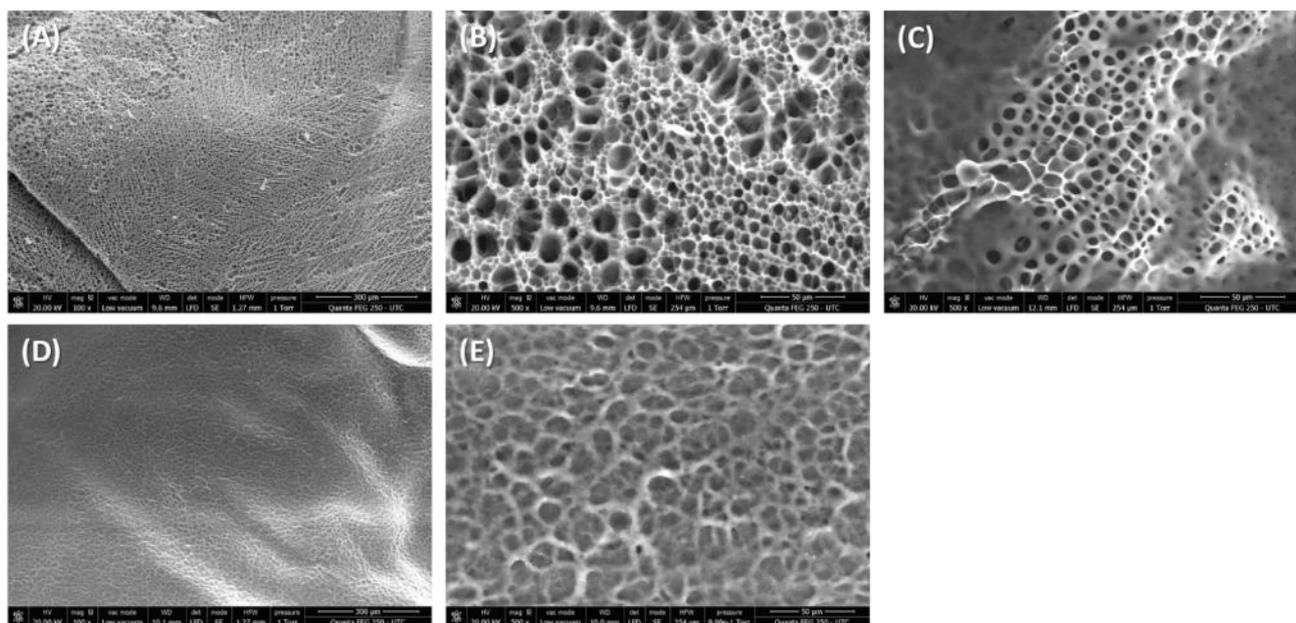


Figure 97 : images MEB (A) et (B) du RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(1)/Fb ; (D) et (E) du RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(5)/Fb. (C) POE(2)BSA(8)/Fb. Pour les images (A) et (D) la barre correspond à 300 μm, et à 50 μm pour les images (B), (C) et (E).

La morphologie du RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(1)/Fb (Figure 97A et B) présente une grande similitude avec celle du RIP équivalent ne contenant pas de Styrène Ammonium. Le réseau est riche en pores dont la taille est comprise entre 1 et 10 μm. L'aspect est très régulier et organisé. La morphologie du RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(5)/Fb est assez différente. Les fibres sont plus épaisses et, bien que de nombreux pores soient visibles, leur contour est moins bien défini et on ne peut pas observer de canaux au sein du réseau. L'augmentation de la concentration en styrène ammonium affecte donc la morphologie du RIP et semble induire sa densification, en provoquant une augmentation de la taille de la paroi des pores, comme cela a déjà été rapporté ²³⁷. Toutefois, en introduisant le styrène ammonium le rapport fonctions réactives : amorceur est modifié puisque la quantité d'I₂₉₅₉ introduite reste constante. Ainsi, ce rapport est de 16 pour le RIP POE(2)BSA(8)/Fb, et il croît jusqu'à 22 pour le RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(1)/Fb et même 48 pour le RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(5)/Fb. Toutefois, l'augmentation du rapport fonctions réactives : amorceur diminue généralement la densité du réseau, selon d'autres études ²⁶³. Il est possible que l'ajout de matière soit le principal facteur impliqué dans la modification de la morphologie du réseau. Pour confirmer cette hypothèse, il serait nécessaire d'imager des matériaux contenant des pourcentages plus élevés en POE.

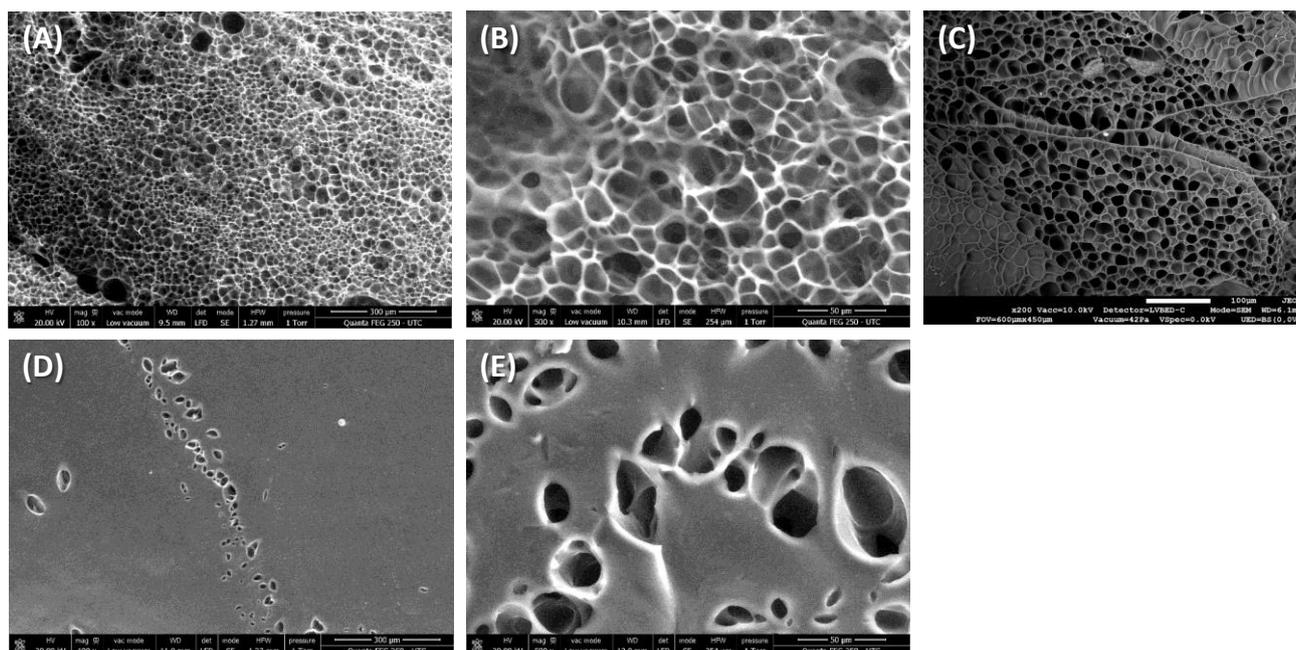


Figure 98 : images MEB des (A) et (B) RIP POE(5)BSA(5)SN⁺(1)/Fb et (D) et (E) RIP POE(5)BSA(5)SN⁺(5)/Fb. (C) POE(5)BSA(5)/Fb. Pour les images (A) et (D) la barre correspond à 300 μm. Elle représente 100 μm pour l'image (C) et 50 μm pour les images (B) et (E).

Pour le RIP POE(5)BSA(5)SN⁺(1)/Fb (Figure 98A et B), une structure poreuse extrêmement bien définie, est observée. Les pores de taille assez régulière ($20 \pm 5 \mu\text{m}$) et homogène. Les parois de ces pores sont assez fines et bien définies. Cela assez proche de ce qui est observé sur le RIP POE(5)BSA(5)/Fb (Figure 98C) pour lequel les pores sont de $25 \pm 5 \mu\text{m}$.

L'augmentation de la concentration en styrène ammonium (Figure 98D et E) modifie fortement la morphologie. La surface est dense et la porosité est très limitée. Cependant, là où se trouvent des pores, des canaux se dessinent sous la surface ; ceci est assez similaire à la morphologie du RIP POE(8)BSA(2)/Fb (cf Chapitre 3 §. 4.1.4.2). Ces différences de morphologies peuvent donc être expliquées par la concentration élevée en POE + SN⁺.

L'observation de ces 4 échantillons permet de conclure que l'architecture des différents RIPs semble être densifiée par la présence de styrène ammonium. La taille des pores est d'autant plus faible que la concentration en styrène ammonium est importante. Cette densification devrait modifier leurs propriétés viscoélastiques. C'est cette conjecture que nous avons ensuite cherché à prouver.

4.2. Propriétés viscoélastiques des RIPs contenant des sels d'ammonium

Les propriétés viscoélastiques sont mesurées sur des matériaux préalablement gonflés pendant 24h dans du tampon Tris 50 mM.

Comme attendu, l'ajout de Benzyl Ammonium dans le RIP POE(2)BSA(8)/Fb n'a aucun impact sur son module de stockage qui reste voisin de 2500 Pa. Par contre, l'incorporation de Benzyl Ammonium provoque une diminution de moitié du module de stockage des RIPs POE(5)BSA(5)/Fb. Le Benzyl Ammonium perturberait légèrement la polymérisation, soit par encombrement stérique, soit par interaction avec certaines charges, auquel cas il agirait comme un plastifiant.

L'insertion de styrène ammonium dans le réseau POE-BSA devrait faire augmenter le module de stockage, ce que nous avons vérifié (Figure 99).

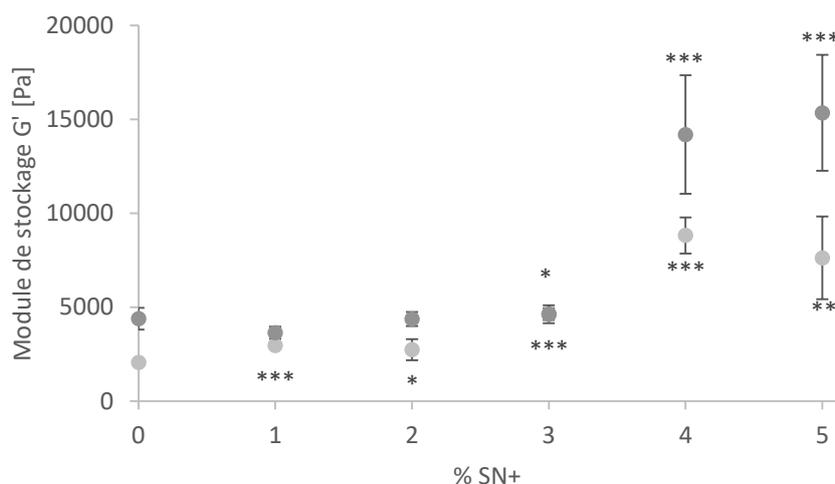


Figure 99 : modules de stockage des RIPs POE(2)BSA(8)SN⁺(z)/Fb (●) et POE(5)BSA(5)SN⁺(z)/Fb (●) contenant différentes proportions de Styrène Ammonium. Le test statistique est effectué par rapport au RIP sans BN⁺. * p < 0,05 ; ** p < 0,01 ; *** p < 0,001.

Tant que la concentration en SN⁺ est inférieure à 30 mg.mL⁻¹, les modules de stockage des RIP POE-BSA-SN⁺(z)/Fb sont du même ordre de grandeur que ceux des RIPs POE-BSA/Fb. Pour les concentrations plus élevées, que ce soit pour les RIPs POE(2)BSA(8)/Fb ou les POE(5)BSA(5)/Fb, l'ajout de styrène ammonium se traduit par une nette augmentation de leurs modules de stockage. Ainsi, le module de stockage du RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(5)/Fb est de 8 kPa alors qu'il n'est que de 2 kPa en absence de styrène ammonium. De même, le module du RIP POE(5)BSA(5)SN⁺(5)/Fb est de plus de 15kPa contre seulement 4,5 kPa initialement. En mettant en parallèle les résultats obtenus avec le benzyl ammonium, cette nette augmentation des modules viscoélastiques est bien due à l'introduction du styrène ammonium dans le réseau POE-BSA.

Cette augmentation peut être due à l'augmentation de la proportion de matière dans le coréseau. Pour conforter cette hypothèse, de nouveaux RIPs, dans lesquels le styrène ammonium a été remplacé par la même quantité de PEGDM, ont été synthétisés ; il s'agit de RIPs POE-BSA/Fb contenant davantage de POE.

Les modules de stockage de ces nouveaux matériaux et la comparaison avec leurs équivalents contenant le même pourcentage de Styrène Ammonium sont présentés sur la Figure 100.

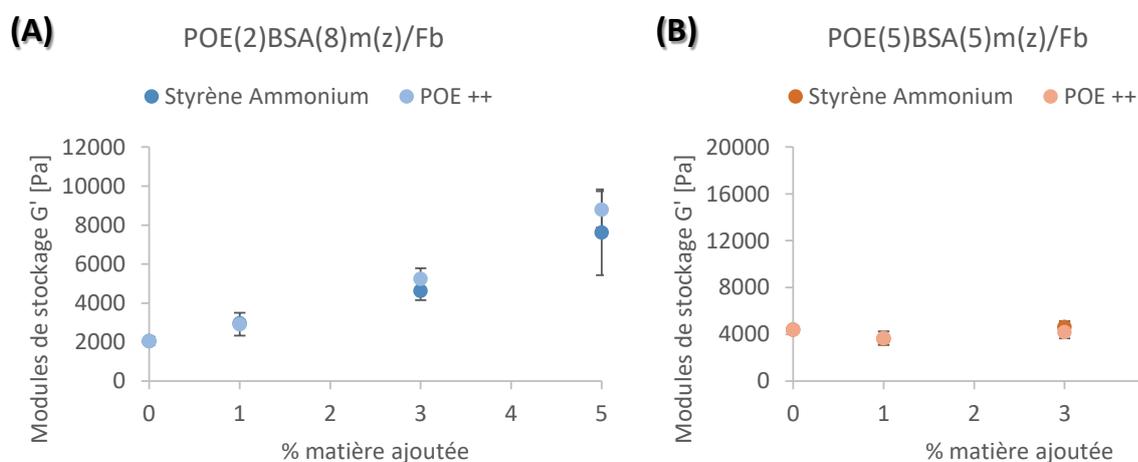


Figure 100 : comparaison des modules de stockage des RIPs POE-BSA/Fb contenant du Styrène Ammonium, du PEGDM « supplémentaire » ou du benzyl ammonium.

L'ajout de matière dans le coréseau du RIP POE(2)BSA(8)/Fb ou du RIP POE(5)BSA(5)/Fb, que ce soit du styrène ammonium ou du PEGDM, provoque une augmentation des modules de stockage, dans des proportions très semblables. Toutefois, lorsque 50 mg.mL^{-1} de PEGDM sont ajoutés, une différence notable est observée entre les modules du RIP POE(5)BSA(5)POE(5)/Fb (6 kPa) et celui du RIP POE(5)BSA(5)SN⁺(5)/Fb (15,5 kPa).

L'introduction de polymère synthétique dans le coréseau conduit à la formation de matériaux plus rigides, ce qui peut être très intéressant pour certaines applications. À partir d'une concentration supérieure à 50 mg.mL^{-1} , la nature du polymère ajouté semble prendre de l'importance. Les dérivés de sel d'ammonium ayant une action bactéricide, les matériaux qui les contiennent devraient donc avoir une action inhibitrice de contact. Toutefois, nous souhaiterions obtenir des matériaux qui constituent des réservoirs de molécules bactériostatiques – voire bactéricides – capables de les relarguer au fil du temps pour avoir une action sur l'environnement proche du matériau. La dégradation de ces RIPs POE-BSA-SN⁺/Fb a donc été étudiée, toujours en présence de thermolysine. Le composé d'intérêt pourrait ainsi être relargué, soit à la faveur du clivage protéolytique, probablement sous une forme liée à un fragment protéique, soit par la modification de l'architecture du réseau et des charges locales, favorisant alors sa diffusion.

4.3. Suivi de la dégradation des RIPs contenant les sels d'ammonium

4.3.1. Suivi de la diffusion des fragments protéiques

Comme précédemment (cf. Chapitre 3 § 4.2.2), la dégradation des RIPs POE(2)BSA(8)/Fb et POE(5)BSA(5)/Fb ont, tout d'abord, été étudiées en fonction des concentrations en Sel d'Ammonium qu'ils contiennent en suivant l'apparition de fragments protéiques dans la solution de thermolysine ($2\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$) dans laquelle ils sont immergés.

Dans un premier temps, nous avons vérifié que la présence de sel d'ammonium encapsulé ne modifie pas l'activité de la thermolysine et/ou la dégradation du réseau POE-BSA. Pour cela, la cinétique de dégradation des RIPs POE-BSA/Fb contenant différentes concentrations de Benzyl Ammonium a été étudiée. Comme nous l'avons déjà discuté (cf. Chapitre 3 § 4.2.2), la vitesse de dégradation du RIP POE(2)BSA(8)/Fb est extrêmement rapide au départ (l'absorbance passe de 0 à 0,75 en 10h), puis l'absorbance se stabilise à 0,8. Les profils de dégradation de RIPs POE-BSA/Fb restent quasiment inchangés lorsque le benzyl ammonium est introduit à différentes concentrations dans ce RIP. Ainsi, les maxima d'absorbance sont aux alentours de 0,7-0,8 dans tous les cas. Le même constat est fait lors de la dégradation des RIPs POE(5)BSA(5)/Fb : leurs cinétiques de dégradation sont identiques, qu'ils contiennent du benzyl ammonium ou pas. Ainsi, la dégradation des matériaux n'est pas entravée par la présence du composé bactéricide qui n'est pas greffé.

Dans un second temps, la dégradation des RIPs POE(2)BSA(8)SN⁺(z)/Fb et POE(5)BSA(5) SN⁺(z)/Fb a été étudiée en fonction des concentrations en Styrène Ammonium qu'ils contiennent (Figure 101).

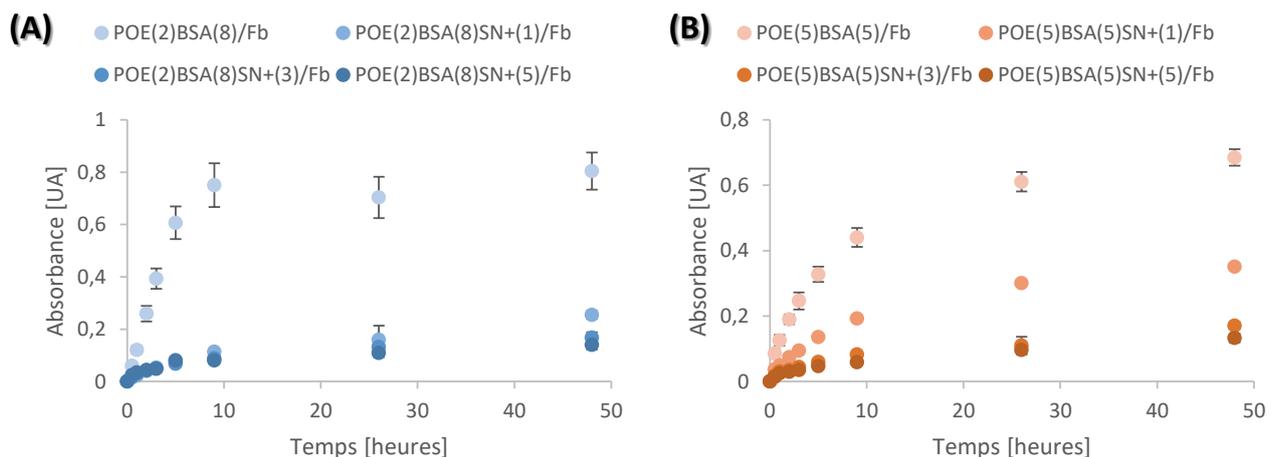


Figure 101 : Apparition des fragments protéiques en fonction du temps de dégradation des différents RIP POE-BSA SN⁺(x)/Fb dans une solution de TL à $2\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$.

Lorsque du Styrène Ammonium est introduit dans le RIP POE(2)BSA(8)/Fb, sa vitesse de dégradation est considérablement ralentie. En effet, pour les trois concentrations en SN^+ testées, la vitesse initiale (calculée à 2h de dégradation) est 6 fois plus faible que lorsque ce dernier n'est pas introduit et la valeur de l'absorbance à 48h est comprise entre 0,15 et 0,25, soit 3 à 5 fois plus faible. La vitesse de dégradation à 2h est de $0,13 \Delta Abs_{280}.h^{-1}$ pour le RIP POE(2)BSA(8)/Fb mais seulement de $0,02 \Delta Abs_{280}.h^{-1}$ pour les trois RIPs contenant du styrène ammonium. Le même constat peut être fait lors de la dégradation des RIPs POE(5)BSA(5)/Fb. Lorsque 10 mg.mL^{-1} de Styrène ammonium sont ajoutés au cours de la synthèse du matériau, la vitesse initiale est approximativement divisée par trois ($0,04 \Delta Abs_{280}.h^{-1}$ contre $0,10 \Delta Abs_{280}.h^{-1}$ pour le RIP POE(5)BSA(5)/Fb). L'absorbance à 48h étant de 0,35. L'ajout de styrène ammonium jusqu'à 50 mg.mL^{-1} ralentit encore la dégradation du RIP puisque la vitesse initiale est de $0,02 \Delta Abs_{280}.h^{-1}$.

La présence de Styrène Ammonium dans le réseau réduit donc l'hydrolyse enzymatique des segments protéiques dans les RIPs POE-BSA/Fb. Il est probable que l'accessibilité des sites de clivage de l'albumine soit réduite par sa copolymérisation avec le Styrène Ammonium, la fibrine formant, elle, un réseau indépendant. Cette conclusion est confortée par la différence entre les deux cinétiques d'apparition des fragments protéiques lors de la dégradation des RIPs POE-BSA/Fb contenant soit du Styrène Ammonium, soit du Benzyl Ammonium. Ce dernier ne modifie pas l'architecture au niveau moléculaire au point de modifier l'accessibilité par la TL lors de la dégradation et n'affecte donc pas l'hydrolyse enzymatique.

4.3.2. Suivi des modules viscoélastiques des matériaux

La dégradation des RIPs a aussi été directement quantifiée par le suivi de l'évolution des modules viscoélastiques des RIPs POE-BSA- $SN^+(z)$ /Fb incubés dans une solution de TL à $2U.mL^{-1}$ à différents temps (Figure 102). Ces mesures n'ont pas été réalisées sur les RIPs contenant du Benzyl Ammonium car, les résultats précédents nous ont conduit à penser que leur profil de dégradation serait très proche de celui des matériaux n'en contenant pas. Leurs valeurs étant initialement différentes, les modules des matériaux ont été normalisés par rapport à leur valeur initiale afin de pouvoir comparer les matériaux.

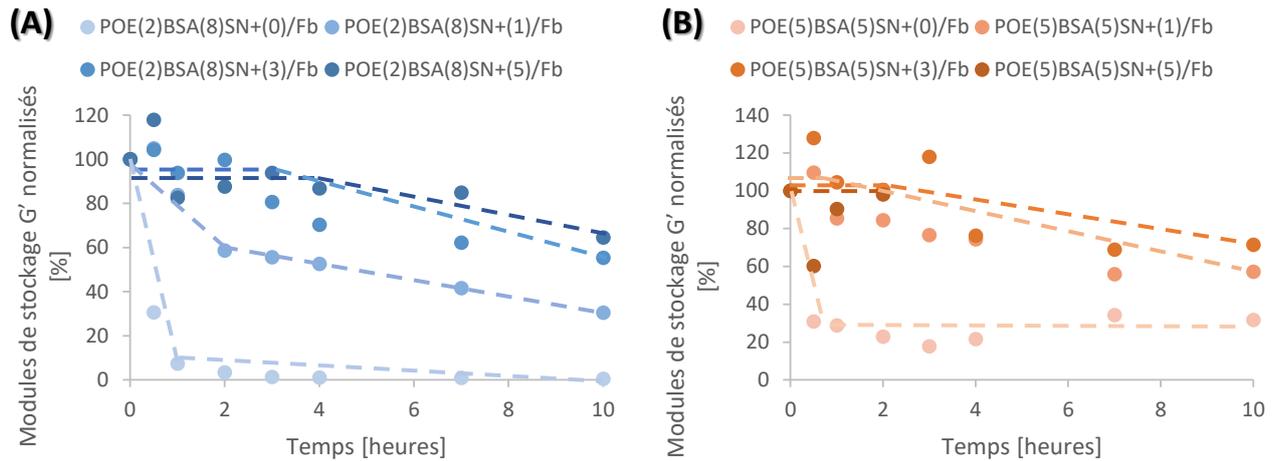


Figure 102 : Module de stockage (normalisés par rapport au $t=0$) des différents RIPs POE-BSA-SN⁺(z)/Fb en fonction du temps d'immersion dans la solution de thermolysine à $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Les valeurs des modules des RIPs diminuent lorsque leur durée d'immersion dans la solution d'enzyme augmente. Par exemple, les modules du RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(5)/Fb et du RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(1)/Fb diminuent, respectivement de 7600 à 4600 Pa et de 2900 à 900 Pa après 10 h d'immersion. De même, les modules de stockage des RIPs POE(5)BSA(5)SN⁺(1)/Fb et POE(5)BSA(5)SN⁺(3)/Fb diminuent respectivement de 3600 à 2000 Pa et de 4600 à 3300 Pa. Or, la diminution relative du module est d'autant plus limitée que la concentration en styrène ammonium est importante. Ainsi, elle est d'un facteur 1,6 lorsque le RIP contient $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ de Styrène Ammonium contre 3,2 lorsqu'il n'en contient que $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

Les deux RIPs qui ne contiennent pas de Styrène Ammonium présentent le même profil de dégradation, c'est-à-dire une chute du module de stockage dès le début de l'incubation. Pour les matériaux contenant du styrène ammonium, hormis pour le RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(1)/Fb, les modules de stockage semblent rester stables, à 100% de leur valeur initiale, durant les premières heures d'immersion, quelle que soit la concentration en styrène ammonium. Leur diminution n'est amorcée qu'après un temps d'autant plus long que la concentration en SN⁺ est élevée. Par exemple, le module du RIP POE(5)BSA(5)SN⁺(5)/Fb est stable pendant plus de 2h, alors que celui du RIP POE(5)BSA(5)SN⁺(1)/Fb diminue dès 1h d'immersion. Noter qu'après 2 h d'immersion, le RIP POE(5)BSA(5)SN⁺(5)/Fb devient très rigide et très « fragile » ; il se fragmente et les mesures n'ont pas pu être poursuivies. Cette durée de stabilité des modules ne semble pas dépendre de la proportion de POE et de BSA dans le RIP. Le délai précédant l'observation d'une diminution du module de stockage est peut-être lié à la taille de maille qui serait réduite et limiterait la diffusion de l'enzyme dans le matériau.

Ainsi, le comportement mécanique global des RIPs POE(x)BSA(y)SN⁺(z)/Fb lors de la dégradation enzymatique est similaire à celui des RIPs POE-BSA/Fb. Le clivage des liaisons peptidiques entraîne l'augmentation de la taille des mailles du réseau et donc la diminution de leurs propriétés viscoélastiques. Toutefois, l'introduction de Styrène Ammonium avec le réseau POE-BSA ralentit cette diminution. À ce stade, on peut se demander si ce ralentissement est uniquement fonction de la quantité de matière synthétique (POE+SN⁺ ou POE seul) ou si la nature de ce dernier joue un rôle. Pour répondre à cette question, les évolutions des modules du RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(3)/Fb et du RIP POE(5)BSA(5)/Fb ont été comparées puisque ces matériaux présentent la même concentration en polymère synthétique mais de compositions différentes (Figure 103).

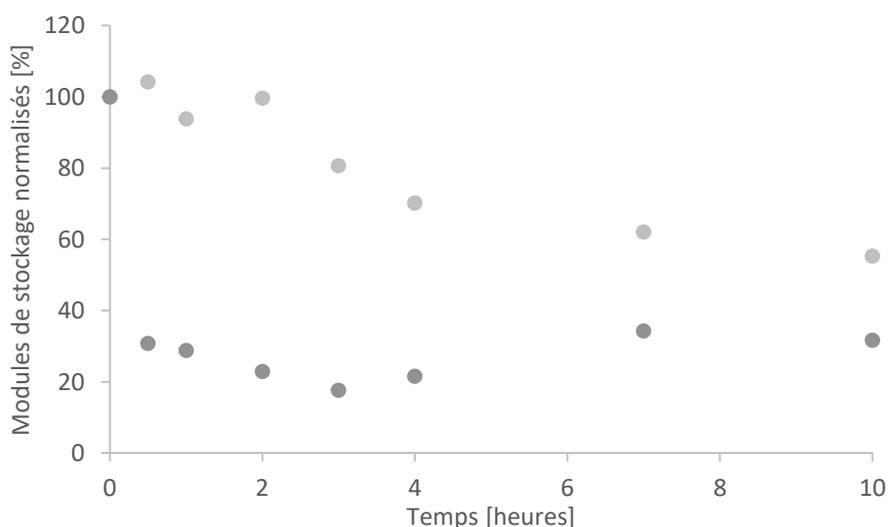


Figure 103 : comparaison du profil de diminution des modules de stockage des RIPs POE(2)BSA(8)SN⁺(3)/Fb (●) et POE(5)BSA(5)/Fb (●) en fonction du temps d'immersion dans la thermolysine (2U.mL⁻¹).

La vitesse de dégradation ne dépend pas uniquement de la quantité de matière dans le réseau puisque les cinétiques de dégradation des RIPs POE(2)BSA(8)SN⁺(3)/Fb et POE(5)BSA(5)/Fb sont différentes. Le module du RIP POE(5)BSA(5)/Fb est divisé par 3 en une demi-heure, puis reste assez stable alors que, la dégradation n'affecte les propriétés mécaniques du RIP POE(2)BSA(8)SN⁺(3)/Fb qu'au bout de 2h.

La vitesse de dégradation des RIPs dépend donc de la proportion en polymère synthétique qu'ils contiennent mais aussi de sa composition. Pour compléter ces analyses, il faudrait déterminer la répartition du styrène ammonium dans le coréseau POE-BSA en analysant le matériau totalement dégradé.

Cette étude a permis de démontrer que l'incorporation de Styrène Ammonium dans les RIPs POE-BSA/Fb permet d'obtenir des matériaux plus rigides et plus résistants à la dégradation enzymatique. Lors de la dégradation de ces RIPs, des chaînes de polymères sont libérées, et certaines d'entre elles contiennent

vraisemblablement des motifs ammonium quaternaire. Il est donc probable que ces fragments induisent une inhibition de la croissance bactérienne. La vérification de ce point est présentée dans la partie suivante.

5. Activité bactéricide de ces RIPs

5.1. Etude de la diffusion des sels d'ammonium

L'effet inhibiteur sur la croissance bactérienne a été vérifié en conditions planctoniques pour les deux sels d'ammonium testés (cf. § 2.2) mais, nous avons préalablement vérifié la diffusion du benzyl ammonium hors des matériaux dans lesquels il est encapsulé.

5.1.1. Diffusion vers un milieu liquide

Afin de vérifier la diffusion ou non des sels d'ammonium hors des matériaux, ces derniers ont été incubés pendant 72h dans un volume 10 fois supérieur de tampon Tris, à 37°C. La solution d'extraction a ensuite été dosée à partir de son absorbance à 210 nm. Connaissant la quantité de sel d'ammonium introduite dans le matériau et son coefficient d'extinction molaire (cf § 2.1), la quantité extraite a été exprimée en pourcentage de la quantité initialement introduite.

Moins de 1% de styrène ammonium peut être extrait des RIPs qui en contiennent. Ce résultat confirme la copolymérisation quasi-quantitative du Styrène Ammonium au sein de l'hydrogel. Par contre, de façon surprenante, alors que l'on attend une valeur proche de 100%, la proportion de Benzyl Ammonium relargué hors des RIPs POE-BSA/Fb est inférieure à 5%, quelle que soit la formulation. Ces proportions restent très faibles que la diffusion soit faite contre du tampon Tris 50 mM ou contre de l'eau déionisée. Le Benzyl Ammonium étant un composé de masse faible (186 g.mol^{-1}), sa diffusion ne doit pas être limitée par sa taille. Il est plausible que des interactions de faible énergie le retiennent dans le matériau. En effet, les ammoniums peuvent interagir, via leur charge positive, avec les acides aminés chargés négativement (acide glutamique et acide aspartique). Cela expliquerait, qu'à pH neutre, il n'est pas possible d'extraire le Benzyl Ammonium du RIP. Pour vérifier cette hypothèse, la diffusion a donc été réalisée contre un tampon Glycine 50 mM à pH 2, pendant 3 jours à 37°C (Figure 104).

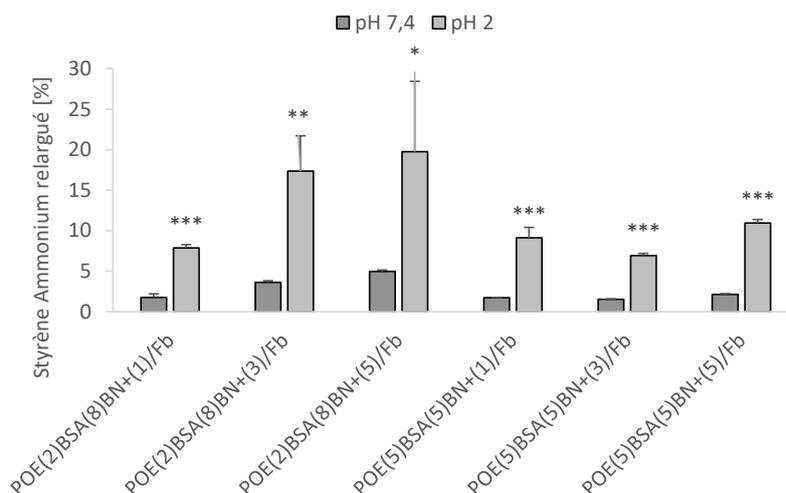


Figure 104 : pourcentage de Benzyl Ammonium relargué des RIPs POE-BSA-BN/Fb contre du tampon à pH 2. Le test statistique est effectué par rapport à l'extraction contre du Tris à pH 7,4. * < 0,05 ; ** < 0,01 ; *** < 0,001.

La quantité de Benzyl Ammonium extraite avec un tampon à pH2 est significativement (test de Student) plus élevée que lorsque l'extraction est réalisée avec un tampon à pH neutre. Pour la série de RIPs POE(2)BSA(8)BN⁺(z)/Fb, plus la quantité de Benzyl Ammonium dans le matériau est élevée, plus l'extraction est importante (environ 7 à 20% lorsque le RIP contient respectivement 1 et 5% de BN⁺). Pour le RIP POE(5)BSA(5)BN⁺(z)/Fb, les valeurs sont de l'ordre de 10 à 15%, quelle que soit la quantité de Benzyl Ammonium introduite. L'architecture RIP contenant seulement 2% de POE semble donc mieux se prêter à la diffusion du Benzyl Ammonium que celle d'un RIP en contenant 5%.

Ainsi, même dans ces conditions de pH acide, moins de 20% du Benzyl Ammonium sont extraits après 3 jours, ce qui est faible.

5.1.2. Diffusion vers un milieu gélosé

Nous avons ensuite étudié l'impact de la diffusion du Benzyl Ammonium sur des bactériesensemencées sur un milieu solide. Pour cela, une boîte de Pétri estensemencée avec une suspension bactérienne calibrée à 10⁶ UFC.mL⁻¹ et un matériau est placé en son centre. Après une nuit d'incubation à 37°C, l'impact de la présence du matériau est photographiée (Figure 105).

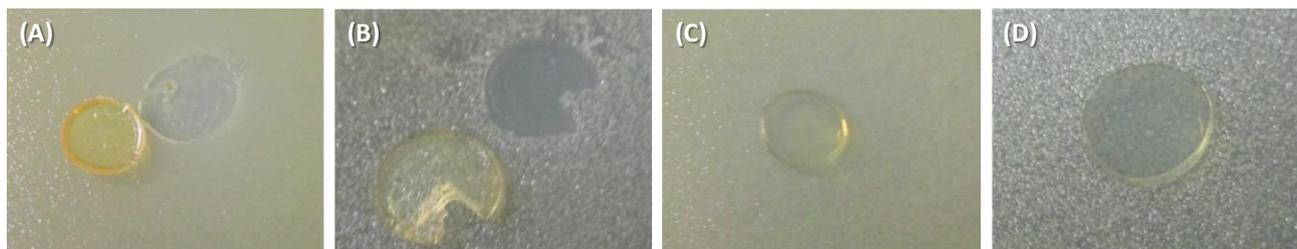


Figure 105 : photographie de géloses recouvertes de colonies de *E.coli* (A) et (C) ou *S.epidermidis* (B) et (D), après 18h d'incubation à 37°C des RIPs POE(2)BSA(8)SN⁺(5)/Fb (A) et (B) ou POE(2)BSA(8)BN⁺(5)/Fb (C) et (D) en surface.

Que les RIP POE-BSA/FB contiennent du Styrene Ammonium ou du Benzyl Ammonium, aucun cercle d'inhibition n'est observé autour des matériaux. Cela n'est pas surprenant puisque, d'une part, le Styrene Ammonium est réticulé et que, d'autre part, le Benzyl Ammonium diffuse peu hors des matériaux (cf.§ 5.1.1) et cette quantité doit être trop faible pour avoir un effet notable sur les colonies.

Dans tous les cas, lorsque le matériau est soulevé, aucune colonie n'est observée en dessous. Cela peut être lié, soit à une inhibition de contact due à la présence des sels d'ammonium dans le matériau, soit à des conditions de croissance sous-optimales qui retardent l'apparition des colonies. L'hypothèse d'une inhibition de contact est confirmée par la présence de quelques colonies sous les RIPs qui ne contiennent pas de sels d'ammonium.

Afin de compléter ces premières mesures, nous avons modifié le protocole d'incorporation des sels d'ammonium dans les RIPs. Ainsi, des RIPs POE(2)BSA(8)/Fb et POE(5)BSA(5)/Fb sont synthétisés, puis placés dans un volume 10 fois plus important de solution de Styrene Ammonium à une concentration de 10, 30 ou 50 mg.mL⁻¹ sous agitation et à 37°C pendant 24h. Le lendemain, ces matériaux gonflés sont déposés au centre des gélosesensemencées. Quelques photographies représentatives des résultats obtenus sont présentées sur la Figure 106 et sont comparées à celles qui sont obtenues avec un RIP POE(2)BSA(8)/Fb gonflé de PHMB (lequel est un puissant bactéricide).



Figure 106 : photographies de géloses recouvertes de colonies de *S.epidermidis* ou *E.coli*, après 18h d'incubation à 37°C des RIPs POE(2)BSA(8)/Fb gonflés avec (A) du PHMB à 0,2%, (B) du SN⁺ 1% et (C) du SN⁺ 5%.

	%	<i>S.epidermidis</i>	<i>E.coli</i>
PHMB	0,2	++++	++++
POE(2)BSA(8)/Fb gonflé SN ⁺ (z)	SN ⁺ (1)	+	++
	SN ⁺ (3)	++	++
	SN ⁺ (5)	++	+++
POE(5)BSA(5) Fb gonflé SN ⁺ (z)	SN ⁺ (1)	-	+
	SN ⁺ (3)	+	+++
	SN ⁺ (5)	++	+++

Tableau 11 : taille approximative du cercle d'inhibition observé autour des matériaux gonflés dans différentes solutions de Styrène Ammonium et de PHMB (contrôle positif).

Lorsque le Styrène Ammonium est incorporé au matériau post-synthèse, par gonflement, il semble être relargué, au moins en partie, puisqu'on observe un cercle d'inhibition dans lequel les bactéries sont incapables de pousser. Le Styrène Ammonium peut donc pénétrer dans le matériau depuis l'extérieur. Cependant, nous ne disposons d'aucune information supplémentaire permettant de savoir à quel point cette molécule diffuse (jusqu'au cœur du matériau, ou simplement en surface).

Ainsi, il est possible de faire gonfler les matériaux avec des sels d'ammonium pour les rendre bactéricides.

5.2. Dénombrement des bactéries en contact avec le matériau

Nous avons vu que, lorsque le Styrène Ammonium est introduit dans le coréseau, aucune colonie n'est observée sous le matériau, suggérant une inhibition de contact. Pour vérifier cette hypothèse, les matériaux sont incubés en présence d'une suspension bactérienne à 10^7 UFC.mL⁻¹ pendant 6h. Les bactéries non adhérentes sont ensuite éliminées par des rinçages successifs ; les bactéries adhérentes sont ensuite récupérées par sonication douce, et dénombrées par étalement sur des géloses.

Un premier dénombrement a été fait avec des RIPs dans lesquels la concentration en sel d'Ammonium (Styrène ou Benzyl) est fixée à 3% (Figure 107). Le contrôle (CTR) correspond aux bactéries cultivées en surface du plastique de culture, en l'absence de matériau.

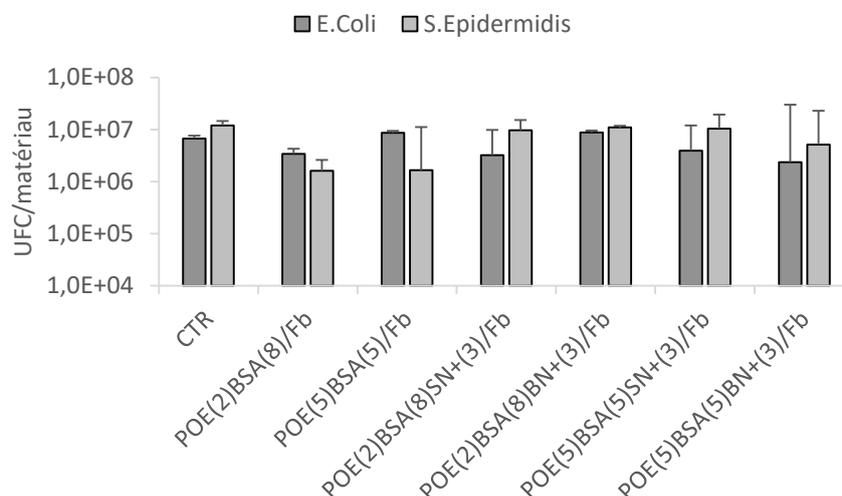


Figure 107 : nombre de bactéries viables après 6h de contact avec les différents RIPs POE-BSA/Fb contenant 3% de SN⁺ ou BN⁺ pour *E.coli* (barres sombres) et *S.epidermidis* (barres claires). L'expérience a été réalisée en n = 2.

Pour les deux souches bactériennes (*E. coli* et *S. epidermidis*), aucun effet antibactérien significatif n'est observé, que les matériaux contiennent du Styrène Ammonium ou du Benzyl Ammonium. En effet, le nombre de bactéries viables en surface des RIPs est très proche de celui du contrôle (moins de 0,5 log d'écart). On considère généralement qu'un effet significatif est observé quand la population bactérienne est diminuée de 5 log. Il est également possible que la concentration en styrène ammonium ne soit pas suffisante en surface du matériau. Enfin, la CMI du Benzyl Ammonium étant plus élevée que celle du Styrène Ammonium, il faut une concentration plus élevée pour observer un effet bactéricide.

L'expérience a donc été répétée, avec une concentration de 5% de SN⁺ et de BN⁺ (Figure 108).

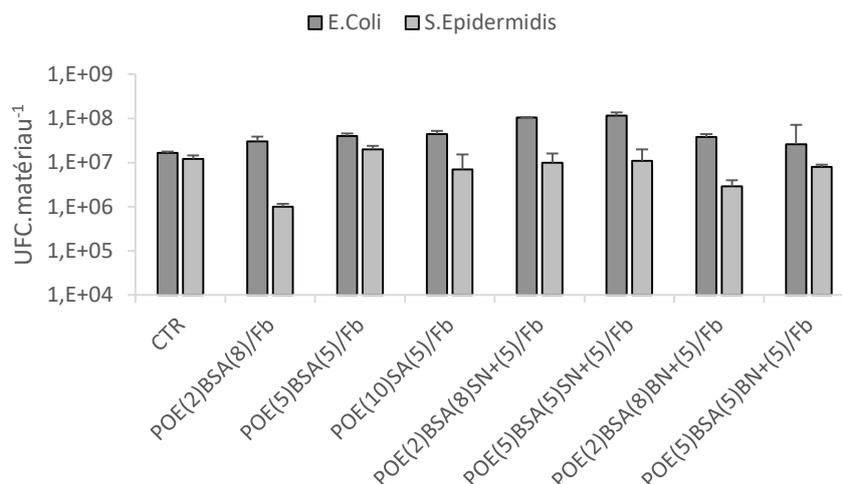


Figure 108 : nombre de bactéries viables après 6h de contact avec les différents RIPs pour *E.coli* (barres sombres) *S.epidermidis* (barres claires). L'expérience a été réalisée en n = 2.

En dépit de la concentration plus importante, le résultat est le même que précédemment : aucune différence significative de viabilité des bactéries n'est constatée par rapport aux témoins lorsque les RIPs contiennent du Styrène ou du Benzyl Ammonium.

Ces résultats peuvent être expliqués. En effet, la quantité de sel d'ammonium (Styrène ou Benzyl) relarguée contre du tampon Tris en 72h est inférieure à 5% de la quantité introduite (cf § 5.1.1), soit moins de 2,5 mg.mL⁻¹, valeur très inférieure à celle de la concentration minimale inhibitrice (6 mg.mL⁻¹ pour le SN⁺ et de 20 mg.mL⁻¹ pour le BN⁺). Or, pour ces expériences, le temps de contact entre les matériaux et les bactéries est de 18h seulement. La quantité de sels d'ammonium pouvant être relarguée pendant cette durée est donc inférieure à la quantité nécessaire pour observer un effet bactériostatique. Les ammoniums quaternaires présents à la surface du matériau sont donc trop faiblement concentrés ou trop peu accessibles. Ils ne peuvent pas induire la mortalité bactérienne par contact. Ce point n'a, faute de temps, pas pu être vérifié par des tests Live/Dead.

L'effet bactéricide des fragments de dégradation des matériaux a également été testé. Pour cela, les matériaux sont incubés pendant 3 jours dans une solution de TL à 10 U.mL⁻¹. Le surnageant de dégradation est ensuite mis en contact avec une suspension bactérienne à 10⁷ UFC.mL⁻¹. Cependant, là encore, aucune différence significative n'a pu être observée sur la croissance bactérienne. Or, après une dégradation totale des RIPs POE-BSA/Fb contenant 30 et 50 mg.mL⁻¹ de SN⁺ ou de BN⁺, la quantité de sels d'ammonium présente dans le surnageant est supérieure à leur CMI. Dans le cas du styrène ammonium, sa photopolymérisation permet sa réticulation, et il est possible que les motifs ammonium quaternaires soient alors moins accessibles pour interagir avec les parois bactériennes. Cela expliquerait, d'une part, l'absence d'inhibition de la

croissance bactérienne dans le cas des RIPs contenant le Styène Ammonium et d'autre part les écarts si importants entre les résultats observés pour la diffusion des sels d'ammonium incorporés au matériau pendant la synthèse ou par gonflement (cf § 5.1.2). Pour le Benzyl Ammonium, qui n'est pas réticulé, il est surprenant de ne pas observer d'effet sur la croissance bactérienne, mais aucune expérience supplémentaire n'a pu être faite pour apporter davantage d'informations sur les interactions possibles entre les composés issus de la dégradation.

6. Conclusion

Pour conclure cette partie, soulignons que les résultats sont en demi-teinte. Les matériaux élaborés ne permettent pas d'obtenir un effet antimicrobien significatif dans les conditions testées. Cependant, ces tests antimicrobiens ont été effectués avec des concentrations bactériennes très élevées (10^6 et 10^7 UFC.mL⁻¹), bien supérieures à ce qui est habituellement retrouvé *in vivo*. Puisque le composé en solution est capable d'empêcher la croissance bactérienne, il est probable qu'un tel matériau puisse limiter la colonisation bactérienne dans les conditions d'implantation. Des tests supplémentaires devraient donc être réalisés afin de vérifier ce point.

Toutefois, plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer l'absence d'effet significatif sur la croissance bactérienne lors de l'incorporation des sels d'ammonium, et plus particulièrement du Styène Ammonium, dans le matériau. L'ammonium est séparé du cycle benzénique par seulement un -CH₂, donc une chaîne extrêmement courte. La mobilité de l'ammonium quaternaire est réduite. Il est donc peu vraisemblable qu'il puisse être en contact durable avec la paroi bactérienne une fois qu'il est lié de façon covalente dans le réseau. Cette hypothèse est confortée par le fait que la longueur de la chaîne alkyle liée à l'azote a été identifiée comme un facteur important dans le caractère bactéricide^{249,260,262}. Dans notre cas, l'azote est entouré de 4 méthyle. Or, plus les chaînes greffées à l'azote sont longues, plus l'effet bactéricide est important (en particulier contre les bactéries Gram positif²⁴⁸). Il serait très intéressant de tester l'incorporation d'un styène ammonium contenant une chaîne alkyle entre le styène et l'ammonium, ou comme substituant de l'ammonium.

Les matériaux présentés dans ce chapitre contiennent un réactif supplémentaire par rapport à ceux que nous avons développés précédemment. Cette étude a montré qu'il est possible de greffer un composé actif sur les coréseaux, d'une part et que les RIPs sont capables d'encapsuler un réactif lors de leur synthèse d'autre part. Dans le cas d'un composé greffé, des propriétés viscoélastiques supérieures à celles des RIPs présentés dans le chapitre 4 ont été obtenues et la dégradation est ralentie.

Enfin, bien que d'autres expériences soient nécessaires afin de confirmer ce point, les nouveaux matériaux obtenus pourraient limiter la colonisation bactérienne dans le cas d'une implantation *in vivo*.

Chapitre 5 : Matériaux à base de Plasma

Dans le chapitre 2, des RIPs PVA-BSA/Fibrine ont été caractérisés et ont démontré leur réversibilité à l'hydratation et leur dégradabilité. Dans le chapitre 3, le PVA a été remplacé par le POE et les propriétés de ces nouveaux matériaux ont été étudiées. Enfin, dans le chapitre 4, un sel d'ammonium a été incorporé au réseau, soit par greffage covalent, soit en étant retenu dans la phase sol de l'hydrogel. Dans ces 3 chapitres, c'est le réseau constituant la partie synthétique du matériau qui a été modifié. Dans ce dernier chapitre, nous nous sommes également intéressés à l'impact de la modification du réseau de fibrine sur les propriétés globales du matériau. Pour cela, nous avons tenté de réaliser la synthèse de RIPs à partir directement du plasma sanguin. Ces travaux ont été réalisés avec les RIPs obtenus à partir de PVAm et de POE, mais dans ce chapitre seuls les résultats avec le POE précédemment sélectionné seront détaillés. Les autres résultats sont reportés en annexe A.

En vue de leur implantation *in vivo*, il serait souhaitable de disposer de matériaux dans lesquels les protéines sont d'origine autologue, afin de limiter les réactions inflammatoires. Au lieu d'utiliser du fibrinogène commercial comme précurseur du gel de fibrine, nous avons donc utilisé du plasma sanguin total. En effet, le plasma contient du fibrinogène (à hauteur de 5 mg.mL^{-1} , la concentration choisie pour les matériaux élaborés dans les chapitres précédents), mais également un grand nombre de protéines, de facteurs de croissance, et de molécules participant à la cicatrisation. Il est donc, en théorie, possible de faire gélifier le fibrinogène présent dans le plasma, afin de former un réseau de fibrine. De plus, si le prélèvement sanguin provient du patient lui-même, le réseau de fibrine présente un caractère « autologue ». Dans un premier temps, une présentation des produits existants à base de plasma sanguin sera faite. Puis la mise au point de la synthèse des RIPs à base de plasma sera exposée, et ainsi que les caractérisations des matériaux obtenus.

1. Etude bibliographique

1.1. Intérêt de l'utilisation directe du sang

Lors d'une blessure, le sang est le théâtre de la cascade de la coagulation sanguine, qui permet la régénération tissulaire. En effet, la formation d'un caillot sanguin, composé de fibrine et de plaquettes,

permet l'occlusion des lésions vasculaires ²⁶⁴. Pour cela, la coagulation est activée par une rupture d'un vaisseau sanguin, exposant le facteur tissulaire, une protéine abondante dans les tissus extravasculaires. Suite à ce traumatisme, les plaquettes sont activées et se rassemblent sur le site de la blessure en un caillot au cours de l'hémostase primaire ²⁶⁵ qui active en cascade des facteurs VII puis IX et X de la coagulation lors de l'hémostase secondaire. Le facteur X activé se lie au facteur II pour activer la thrombine qui catalyse alors l'hydrolyse du fibrinogène en fibrine pour former un réseau tridimensionnel. La thrombine permet aussi l'activation du facteur XIII qui réticule de façon covalente les macromolécules de fibrine afin d'augmenter la résistance et la stabilité du clou plaquettaire ²⁶⁶. Ce processus se déroule en moins de 5 min et permet la consolidation du clou plaquettaire par le réseau de fibrine ²⁶⁷. Plusieurs protéines sont emprisonnées dans le clou plaquettaire, notamment le plasminogène, dont l'activation en plasmine permet au bout de quelques jours de dégrader le réseau de fibrine ²³².

Les plaquettes, produites à partir des mégacaryocytes dans la moelle osseuse, sont donc des acteurs majeurs de la coagulation. Ces cellules anucléées ne contiennent pas d'ADN génomique, mais possèdent une machinerie traductionnelle pour la synthèse de nombreuses protéines. Lorsqu'elles sont activées, elles relarguent des molécules biologiquement actives qui favorisent le recrutement, la croissance et la morphogénèse des cellules. Ces molécules sont contenues dans des granules α et denses. Les granules α contiennent, entre autres, le PDGF (platelet-derived growth factor), l'EGF (epithelial growth factor), le VEGF (vascular endothelial growth factor), le TGF- β (transforming growth factor- β) et l'IGF (insulin growth factor) ²⁶⁸. Ces facteurs agissent en recrutant par chimiotactisme et en activant les cellules souches, induisant leur mitogénèse et leur différenciation. Les granules denses contiennent des médiateurs, tels que la sérotonine et l'histamine, qui augmentent la perméabilité vasculaire.

1.2. Biomatériaux dérivés du sang

Plusieurs classes de biomatériaux dérivés du sang sont utilisées en clinique. Les procédés de fabrication utilisés pour produire ces matériaux varient et impactent la composition cellulaire et protéique de ces produits. Une classification a été établie par Burnouf *et al* ²³². Elle tient compte du mode de production et du contenu en fibrinogène et en plaquettes, éléments déterminants pour les propriétés physiques et fonctionnelles des biomatériaux dérivés du sang (Figure 109).

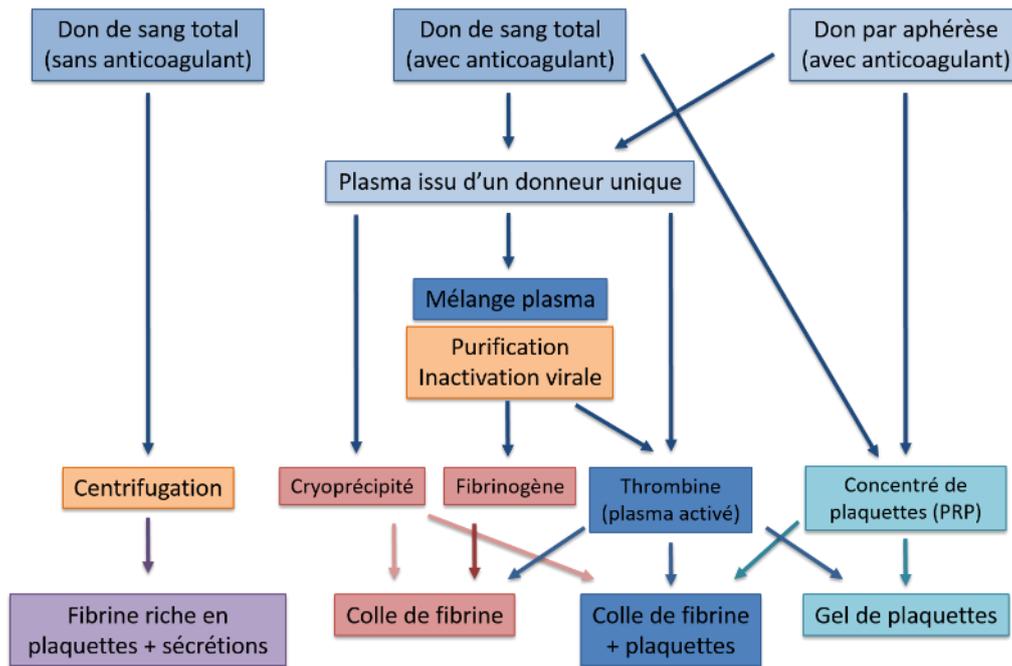


Figure 109 : méthodes de préparation et composants sanguins nécessaires pour préparer les principaux biomatériaux dérivés du sang actuellement utilisés en clinique. D'après Burnouf *et al* ²³².

1.2.1. Biomatériaux à base de fibrine

Les hydrogels à base de fibrine ont été présentés dans le chapitre 1 (cf. § 6.2.2.3), mais les colles de fibrine sont disponibles commercialement en Europe depuis les années 1980. Elles peuvent être produites à partir de mélanges de différents donneurs ou ponctuellement à partir d'un don unique. Ces colles de fibrine contiennent du fibrinogène et de la thrombine, comme principales protéines actives, et généralement, du chlorure de calcium qui accélère la polymérisation de la fibrine ²⁶⁹. Les concentrés de fibrinogène sont produits à partir de mélanges de plasma humain, fractionné et précipité puis lyophilisé ou conservé congelé. La concentration en fibrinogène nécessaire pour former un caillot est d'environ 80 mg.mL^{-1} , et le mélange peut contenir d'autres protéines telles que la fibronectine, le facteur de Van Willebrand et le facteur XIII. La thrombine est purifiée par chromatographie, et concentrée jusqu'à $500\text{-}1000 \text{ U.mL}^{-1}$, puis lyophilisée ou congelée. Le fibrinogène et la thrombine sont mélangés au moment de l'usage clinique, formant un caillot qui adhère aux tissus.

Le mélange des constituants du plasma (au moins, le fibrinogène, la thrombine et le calcium) conduit à la formation d'un réseau de fibrine présentant une architecture tridimensionnelle formée de fibres interconnectées, susceptible d'être colonisée par les cellules (Figure 110) ²⁷⁰.

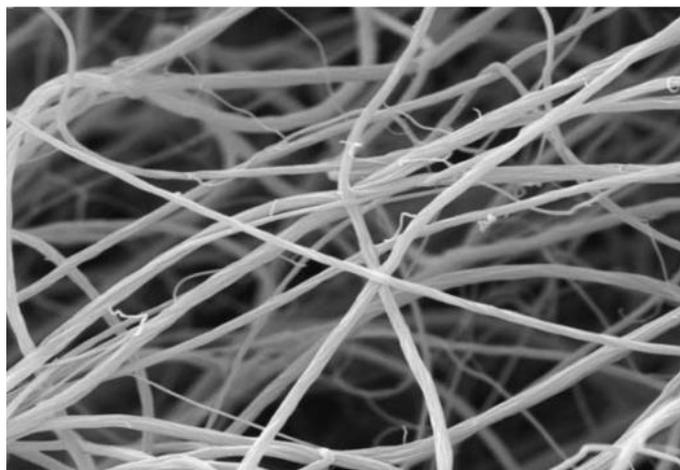


Figure 110 : structure typique d'un réseau de fibrine ($2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$) préparé par mélange de plasma avec de la thrombine, imagé en microscopie électronique à balayage. La largeur de l'image est de $5\mu\text{m}$ ²⁷⁰.

1.2.2. Biomatériaux à base de plaquettes

Des biomatériaux riches en facteurs de croissance peuvent être obtenus à partir de la fraction riche en plaquettes récupérée par centrifugation du sang total. Cette fraction est en général activée par la thrombine pour former un gel de fibrine ou pour le relargage de facteurs de croissance à partir des plaquettes.

1.2.2.1. Plasma riche en plaquettes (PRP)

Le plasma riche en plaquettes est préparé en débarrassant le sang des leucocytes. La concentration en plaquettes est environ 5 fois supérieure à celle du sang total, c'est-à-dire comprise en 1 et 4 millions de plaquettes/ μL . Cette préparation peut être conservée à température ambiante pendant 5 à 7 jours. Le PRP peut être préparé de manière autologue à partir de 50 à 100 mL de sang du patient. Un gel contenant les plaquettes est formé en mélangeant le PRP avec du CaCl_2 ou de la thrombine, afin de convertir le fibrinogène en fibrine, et pour activer le relargage des facteurs de croissance par les plaquettes. Ce type de gel contient une concentration physiologique de fibrinogène (5 mg.mL^{-1}) ainsi que de la fibronectine ($0,3\text{-}0,5 \text{ mg.mL}^{-1}$). Ces gels ont donc une faible résistance à la traction et libèrent une quantité importante de fluides. Bien que cela favorise le relargage des facteurs de croissance, c'est un inconvénient majeur pour certaines applications cliniques car cela limite l'adhérence du matériau au tissu et il risque d'être emporté par les fluides biologiques ²³². Le contenu en facteurs de croissance et les propriétés viscoélastiques du matériau sont variables, en fonction du donneur, de la méthode de préparation et du type de thrombine ajoutée au mélange.

Les PRP sont riches en facteurs de croissance qu'ils libèrent lors de l'activation des plaquettes, ils peuvent être préparés de manière complètement autologue et rapide car seules quelques étapes de

centrifugation sont nécessaires et peu coûteuses. Un grand nombre d'études a montré qu'ils stimulent la croissance cellulaire ce qui rend leur utilisation possible dans de nombreux domaines.

1.2.2.2. Fibrine riche en plaquettes

La fibrine riche en plaquette (PRF) est préparée à partir d'un petit volume de sang autologue collecté sans anticoagulant et immédiatement centrifugé. L'activation physiologique de la cascade de la coagulation lors de la centrifugation induit la formation d'un caillot de fibrine qui peut être utilisé comme une membrane riche en facteurs de croissance qui améliore la croissance cellulaire ²⁷¹ (Figure 111). La principale différence entre la PRF et les PRP tient à l'architecture du réseau de fibrine qui se forme graduellement dans la PRF lors de la centrifugation, en l'absence d'agents anticoagulants. Le réseau est donc plus dense et emprisonne les plaquettes et les leucocytes. Le relargage des facteurs de croissance est donc plus graduel que dans le PRP. Le relargage du TGF β et du PDGF diminue considérablement après le premier jours pour les PRP, alors qu'il est maintenu pendant 2 semaines avec les PRF ²⁷². Cependant, ces gels ne sont pas encore utilisés en routine par les cliniciens.

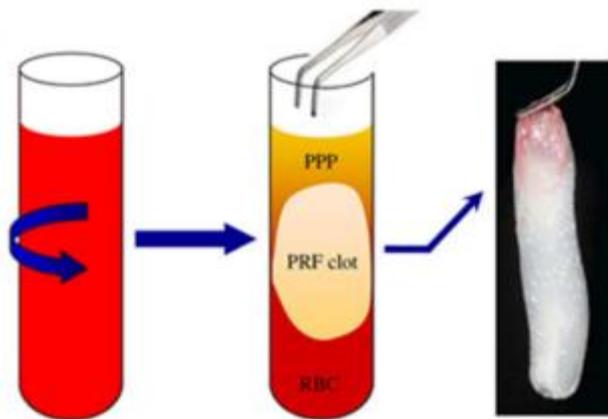


Figure 111 : préparation de la fibrine riche en plaquette (PRF) d'après Masoudi *et al* ²⁶⁸.

1.2.2.3. Activation des biomatériaux à base de plaquettes

Le terme « activation » renvoie à deux processus clés devant être initiés au sein des matériaux à base de plaquettes : la dégranulation des granules α pour libérer les facteurs de croissance qu'elles contiennent, et le clivage du fibrinogène pour amorcer la formation de la matrice de fibrine. Il existe 3 méthodes principales pour accomplir cela :

- l'addition de chlorure de calcium et de thrombine qui aboutit à une activation rapide et irréversible. Cependant, introduire une substance exogène augmente le risque d'infections ou de réactions inflammatoires.
- l'activation par des cycles de congélation/décongélation qui altèrent la structure des plaquettes et initient leur dégranulation. L'avantage de cette méthode est qu'elle ne nécessite aucune substance exogène, mais elle est longue à mettre en place et peu adaptée à un contexte clinique ou industriel.
- l'activation *in vivo* par du collagène. Les PRP et autres matériaux contenant des plaquettes peuvent être injectés directement *in vivo*, où ils sont activés au contact du collagène (par l'interaction avec le facteur de Van Willebrand, lié aux collagènes de type I et III principalement). Cette méthode est la plus utilisée car elle permet un relargage plus lent et maintenu de facteurs de croissance.

1.3. Utilisation clinique des biomatériaux à base de sang

Le potentiel hémostatique de la fibrine est connu depuis bien longtemps. En effet, lors de la première guerre mondiale, des patches de fibrine étaient utilisés pour limiter le saignement. Mais ce n'est que dans les années 1940 que l'utilisation de la fibrine comme un adhésif émerge, grâce aux travaux du docteur Peter Medawar²⁶⁹. Les méthodes de fractionnement et de purification sont ensuite améliorées, de telle sorte qu'à la fin des années 1970, les colles de fibrines commencent à se répandre en Europe. A l'heure actuelle, les colles de fibrine sont utilisées pour limiter les saignements et refermer les tissus en chirurgie cardiaque et intestinale, mais aussi en neurochirurgie, afin de limiter l'utilisation d'agrafes ou de points de suture²⁷³.

Les matériaux à base de plaquettes (et notamment autologues) sont utilisés dans les hôpitaux, pour des applications variées, car ils contiennent des facteurs de croissance. Ils accélèrent la guérison en chirurgie orale, maxillo-faciale et parodontale, notamment en améliorant la régénération osseuse et l'ostéo-intégration des implants dentaires. Ils sont également utilisés en chirurgie orthopédique, bien que dans ce domaine les bénéfices cliniques associés à leur utilisation soient encore sujets à controverse²³². Des résultats encourageants ont été obtenus pour le traitement des ulcères récalcitrants, en particulier, en les combinant avec une greffe de peau pour les ulcères de grande taille²⁷⁴. Les PRP peuvent aussi être utilisés pour le traitement des lésions du cartilage et autres chondropathies. Ainsi, l'injection de quelques millilitres de PRP dans l'articulation défaillante, répétée 2 ou 3 fois toutes les semaines, diminue significativement l'inflammation et les douleurs, et semblerait induire une régénération du cartilage²⁷⁵. Les propriétés anti-inflammatoires des PRP et leur capacité à induire la régénération tissulaire ont amené à leur utilisation en médecine du sport pour le traitement des blessures aux tendons et aux ligaments²⁷⁶.

1.4. Risques et limites des biomatériaux à base de sang.

La transmission de virus est un risque bien connu. C'est pourquoi, dans les pays développés, la production de biomatériaux à base du sang de donneurs multiples est strictement régulée et des contrôles systématiques ont été mis en place. L'absence de virus, tels que le VIH ou le VHC, est vérifiée dans chaque échantillon de sang et de plasma, mais aussi dans les matériaux finaux. Au cours de leur production, certaines étapes permettent aussi de limiter la charge virale (pasteurisation, stérilisation à la vapeur, nanofiltration...). Le risque de transmission virale par ces produits est donc très réduit.

L'utilisation de thrombine bovine, notamment pour induire l'activation des PRP, est associée à un risque d'induction des réactions immunologiques. La thrombine bovine présente aussi un risque de transmission de zoonose. Pour pallier cela, de la thrombine humaine recombinante produite dans des cellules CHO ²⁷⁷ a récemment reçu les agréments permettant sa commercialisation.

Le dernier risque associé à l'utilisation de ces biomatériaux est la présence de concentrations élevées de facteurs de croissance, et particulier le PDGF, connu pour ses propriétés potentiellement oncogènes. En effet, un risque de cancer plus élevé a été démontré pour des patients traités avec d'importantes doses de ce facteur de croissance ²⁷⁸. Le PDGF régule l'activation et la sécrétion des enzymes protéolytiques dans les cellules cancéreuses, et il jouerait ainsi un rôle dans leur caractère invasif ou métastatique.

Bien que les matériaux à base de sang présentent de nombreux avantages, ils ont aussi leurs limites. Certaines formulations de PRP ont des propriétés viscoélastiques telles qu'ils ne résistent pas à la déformation, ce qui limite leur utilisation pour certaines applications. L'utilisation de thrombine exogène pour l'activation des PRP peut déclencher des réactions inflammatoires. Pour le traitement des brûlures, l'utilisation de PRP est associée à la formation de grandes quantités de tissu de granulation et donc de cicatrices hypertrophiques ²⁷⁹. Il est également très difficile de disposer d'un nombre suffisant de plaquettes d'un individu ayant subi un traumatisme important comme l'est une brûlure du second degré et au-delà ²⁸⁰. De plus, le relargage de quantités importantes de facteurs de croissance par les plaquettes présente un risque oncogénique potentiel. Travailler en l'absence des plaquettes permettrait donc d'avoir un environnement plus riche en facteurs de croissance, sans pour autant courir ce risque. De plus, un matériau acellularisé peut plus aisément être conservé, sous forme lyophilisée par exemple. Il serait donc intéressant de disposer d'un matériau synthétisé à partir de sang, mais en l'absence de plaquette, dont les propriétés viscoélastiques seraient supérieures à celles des PRP et fournissant un environnement nutritif riche pour la colonisation cellulaire et la réparation tissulaire.

Nous avons donc élaboré un RIP à base de plasma sanguin comme une alternative aux PRP pour certaines applications. En effet, le RIP contenant un réseau de polymère synthétique, devrait être aisément

manipulable et posséder des propriétés viscoélastiques adéquates. Il serait également composé d'un réseau de fibrine dont la concentration sera proche de la valeur physiologique, dans lequel les autres protéines circulantes seraient emprisonnées. Ces protéines sont principalement la fibronectine et la vitronectine, connues pour posséder des motifs favorisant l'adhérence cellulaire, en particulier le motif RGD. Ce point devrait permettre de faciliter la survie et la prolifération cellulaire.

Tous les matériaux présentés dans ce chapitre ont été synthétisés à partir de plasma humain total, qui nous a été donné par le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA). Nous nous sommes dans un premier temps intéressés à la gélification du plasma, en présence de Calcium et de Thrombine, avant d'élaborer des RIPs à base de plasma.

2. Gel de plasma

2.1. Condition de gélification du fibrinogène du plasma

La gélification du plasma total a été vérifiée. Pour cela, le plasma est mélangé à de la thrombine (0,2 U.mL⁻¹) et/ou du chlorure de Calcium (20 mM). Les tubes sont incubés à 37°C et la gélification est vérifiée en retournant le tube. (Figure 112).

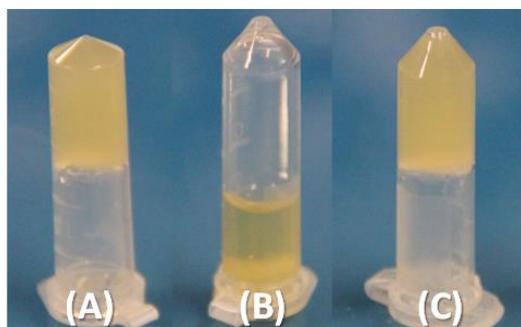


Figure 112 : tests macroscopiques de la gélification du plasma en présence de (A) CaCl₂, (B) Thrombine ou (C) les deux. Tubes photographiés après 1h d'incubation à 37°C.

Le plasma total gélifie si on introduit soit du calcium, soit du calcium à 20mM et de la Thrombine à 0,2 U.mL⁻¹. Cela concorde avec le fait que le plasma est déplété en calcium (poches de plasma citratées) mais contient de la thrombine. Ainsi, la thrombine présente dans le plasma suffit à transformer le fibrinogène en fibrine si son cofacteur est ajouté dans le milieu, mais aucune gélification ne peut avoir lieu en absence de calcium. Toutefois, le temps de gel, vérifié par retournement du tube, est réduit de 40 à 15 minutes si de la thrombine est ajoutée. L'action de la thrombine exogène s'ajoute donc à celle contenue dans le plasma et la vitesse de formation du réseau de fibrine est accélérée.

Pour mesurer plus précisément les temps de gel, les matériaux ont été synthétisés à partir de plasma auquel est ajouté soit du calcium, soit un mélange de calcium et de thrombine (toujours dans les mêmes proportions) et leur synthèse a été suivie en rhéologie *in situ* (Figure 113).

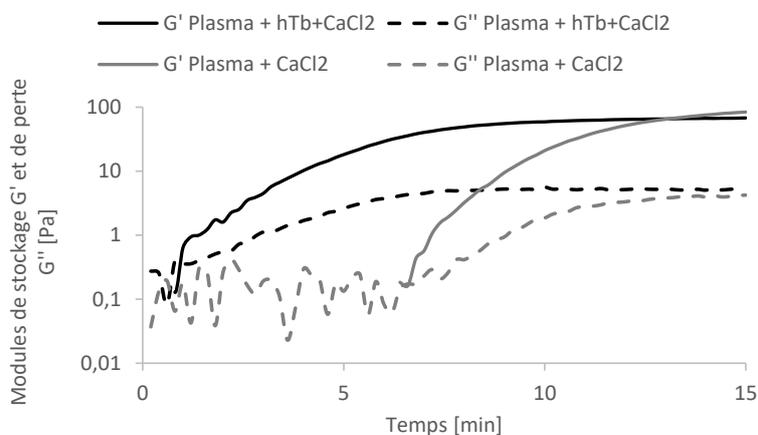


Figure 113 : suivi rhéologique de la gélification du plasma. Les traits pleins correspondent au module de stockage G' et les traits en pointillé correspondent aux modules de perte G'' . Les traits noirs correspondent au plasma + 20 mM de CaCl_2 + 2 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ de Thrombine alors que les traits gris correspondent au Plasma + 20 mM de CaCl_2 .

Lorsque du CaCl_2 est ajouté au plasma, le temps de gel (déterminé lorsque $G'=G''$) est d'environ 9 min, alors que lorsque du CaCl_2 et de la thrombine sont ajoutés, ce temps de gel est de l'ordre de seulement 30 s. Ces valeurs sont donc en accord avec l'observation macroscopique. Par ailleurs, les valeurs de modules de stockage des gels sont très faibles (< 100 Pa), ce qui est cohérent avec le fait que la fibrine, à concentration physiologique, forme un réseau qui n'est pas autosupporté et donc pas manipulable.

2.2. Structure du réseau de fibrine

La répartition du réseau de fibrine est observée dans les gels formés à partir de plasma par microscopie confocale (Figure 114). Le marquage a été réalisé avec de l'Alexa 488.

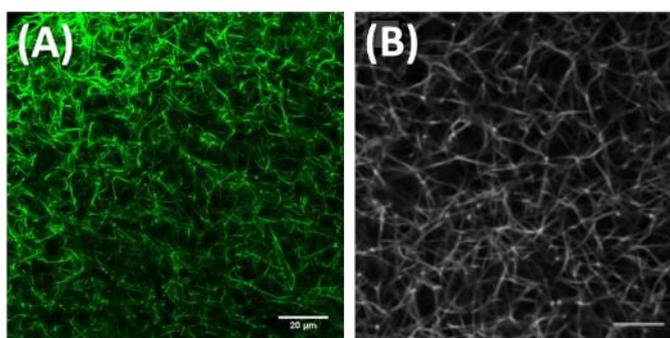


Figure 114 : images en microscopie confocale du réseau de fibrine dans (A) le plasma gélifié, (B) fibrinogène purifié gélifié par addition de Thrombine (la barre représente $7\mu\text{m}$) d'après W. Gray Jerome *et al.*²⁸¹

Le marquage de la fibrine dans le gel de plasma révèle une structure fibrillaire et homogène. Les fibres ont un diamètre moyen de 690 nm alors que pour le fibrinogène purifié, ce diamètre moyen est plutôt de l'ordre de 450 nm. Ces résultats sont en accord avec les travaux de Nair *et al*²⁸² qui avaient rapporté l'augmentation de la taille des fibres de fibrine lorsque le réseau se forme en présence d'autres protéines. Un réseau continu et homogène de fibrine se forme, avec quelques différences morphologiques suivant le traitement appliqué au plasma.

Il est donc possible d'obtenir la gélification du plasma total en présence de calcium. La formation du réseau de fibrine est accélérée par l'ajout de la thrombine exogène. Dans l'optique de synthétiser des RIPs à base de plasma, nous avons également cherché à concentrer le plasma pour obtenir *in fine* des matériaux dans lesquels la concentration en fibrinogène est la plus élevée possible. En effet, l'ajout des autres composants du RIP (polymère, amorceur, sels) induira une dilution du fibrinogène, et cela modifiera, d'une part, l'architecture du réseau de fibrine au sein du matériau mais également ses propriétés, en particulier viscoélastiques.

Puisqu'un réseau de fibrine peut être formé à partir du plasma total, par simple ajout de calcium à la concentration finale de 20 mM, nous avons réalisé la synthèse de RIPs à base de plasma, dans un premier temps et de POE.

3. Matériaux RIPs à base de POE et de plasma total

3.1. Synthèse de RIPs à base de POE dans le plasma

Afin d'obtenir la concentration en fibrinogène la plus élevée possible dans le matériau, l'albumine est introduite sous forme lyophilisée dans le plasma. Le PEGDM et l'Irgacure sont ensuite ajoutés, ainsi que du calcium (20 mM) et de la thrombine (0,2 U.mL⁻¹) afin de permettre la formation rapide du réseau de fibrine. La solution est placée sous UV, pendant 1h à 37°C. De cette façon, des RIPs POE(x)BSA(y)/PL sont obtenus (Figure 115). La concentration en fibrinogène théorique dans le matériau est indiquée sous chaque photo. Elle est calculée en tenant compte de la dilution induite par le mélange des différents composés dans le plasma, dans lequel la concentration de fibrinogène est supposée égale à 5 mg.mL⁻¹. Elle est comprise entre 3,9 et 4,6 mg.mL⁻¹, donc proche de la concentration physiologique, pour tous les matériaux.

La formation des hydrogels à base de plasma a été étudiée en suivant l'évolution des modules viscoélastiques des solutions au cours de leur exposition aux UV à 37°C comme précédemment (cf Chapitre 3 § 3.2). Les modules de stockage, G' , augmentent fortement au départ (formation d'un amas percolant), puis de façon moins marquée, pour finir par se stabiliser. Les temps de gel varient de 10 min pour le RIP POE(8)BSA(2)/PL à 6 min pour un RIP POE(5)BSA(5)/PL, et 3 min pour le RIP POE(10)/PL. Cette dernière valeur

est très inférieure à celle mesurée pour le RIP POE(10)/Fb équivalent. Ainsi, des hydrogels sont bien synthétisés après exposition des mélanges réactionnels aux UV à 37°C (Figure 115).

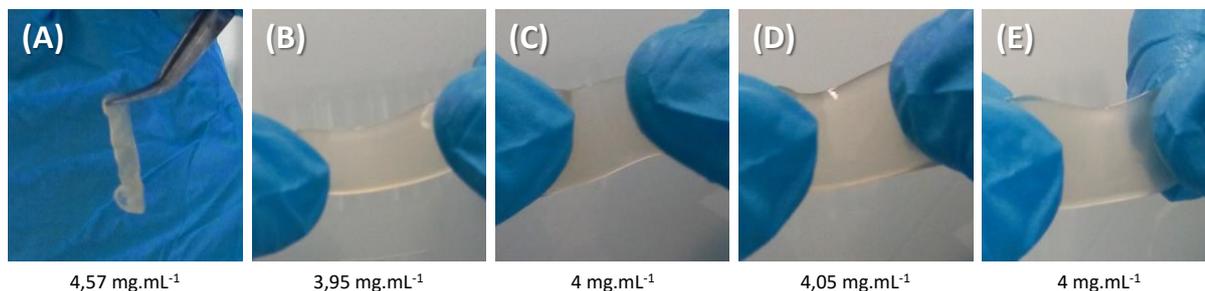


Figure 115 : images de différents RIPs POE-BSA/plasma total (A) BSA(10)/PL (B) POE(2)BSA(8)/PL (C) POE(3)BSA(7)/PL (D) POE(4)BSA(6)/PL (E) POE(5)BSA(5)/PL.

Le RIP BSA(10)/PL est un gel qui n'est pas manipulable et qui supporte à peine son propre poids. Il se déforme totalement dès qu'il est manipulé et libère une importante quantité de liquide de synérèse. Par contre, tous les RIPs contenant au moins 2% de POE, sont homogènes, transparents et autosupportés. Très peu de synérèse est observée à l'issue de la synthèse. Leur résistance mécanique au toucher est bien supérieure à celle du matériau équivalent à base de PVAm et leur élasticité est également meilleure que celle des matériaux correspondants synthétisés avec du fibrinogène commercial. Le rapport entre POE et albumine impacte visiblement la résistance des matériaux. Plus la teneur en POE est importante, plus le matériau gagne en rigidité donc devient cassant. Ainsi, le RIP POE(5)BSA(5)/PL a tendance à casser si on lui applique une déformation trop importante.

Les formations, à la fois, des réseaux POE-BSA et de fibrine, ont ensuite été vérifiées, comme précédemment, en mesurant, respectivement, les extractibles synthétiques et protéiques (Tableau 12).

	Extractibles protéiques (%)	Extractibles synthétiques (%)
BSA(10)/PL		2,5 ± 2,1
POE(2)BSA(8)/PL	30,1 ± 1,6	5,7 ± 3,6
POE(3)BSA(7)/PL	32,9 ± 1,2	3,5 ± 2,5
POE(4)BSA(6)/PL	32,3 ± 2,3	2,5 ± 1,8
POE(5)BSA(5)/PL	35,6 ± 1,9	4,1 ± 0,7
POE(10)/PL	54,7 ± 5,2	4,5 ± 0,5

Tableau 12 : fractions solubles protéiques et synthétiques contenues dans les RIPs à base de plasma.

Comme pour les RIPs POE-BSA/Fb (cf. Chapitre 3 § 4.1.2), les proportions de fractions solubles synthétiques des RIPs POE-BSA/PL sont toutes inférieures à 6%. Par contre, le RIP POE(10)/PL présente une quantité d'extractibles synthétique bien plus faible que celle contenue dans le RIP POE(10)/Fb (de l'ordre de

20%). Ces valeurs étant inférieures à 10%, le coréseau POE-BSA se forme bien par polymérisation radicalaire dans le milieu plasmatique.

Par contre, les extractibles protéiques des RIPs POE-BSA/PL sont compris entre 30 et 35% et sont donc tous très supérieurs à ceux pour les matériaux synthétisés à base de fibrinogène pur (compris entre 2 et 5%). Des valeurs aussi élevées ne sont pas étonnantes, compte tenu de la forte teneur en protéines du plasma sanguin (74 mg.mL^{-1} , valeur mesurée sur du plasma total, par dosage BCA). Ces fractions solubles protéiques contiennent donc des protéines du plasma qui ne sont pas liées au réseau de fibrine et qui peuvent diffuser librement. Nous avons pu calculer que c'est environ 50% des protéines du plasma (quelle que soit la formulation) qui sont extraites hors du réseau lors de l'extraction. La concentration en protéines dans le RIP est donc finalement moins élevée que ce qui peut être calculée théoriquement, s'il subit cette étape d'extraction.

Ces mesures montrent donc qu'il est possible, à la fois, de synthétiser un coréseau POE-BSA dans le plasma, en conservant la formation du réseau de fibrine à partir du fibrinogène contenu naturellement dans ce milieu.

3.2. Caractérisation des RIPs POE-BSA/Plasma

3.2.1. Morphologie du réseau de fibrine

La répartition du réseau de fibrine dans les RIPs a été visualisée au moyen d'un immunomarquage. Les deux faces des matériaux ont été systématiquement imagées et très peu de différences ont été observées. Les images de la Figure 20 sont représentatives des différents RIPs POE-BSA/PL.

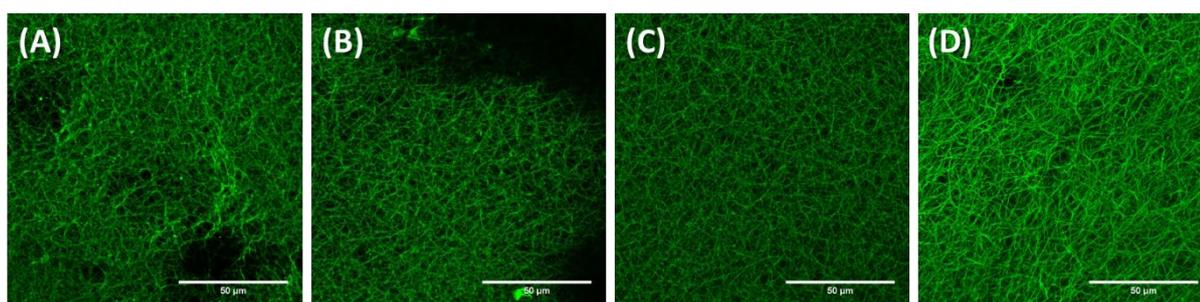


Figure 116 : immunomarquage du réseau de fibrine au sein des RIPs POE-BSA/PL. La barre représente 50 µm. (A) POE(2)BSA(8)/PL ; (B) POE(3)BSA(7)/PL ; (C) POE(4)BSA(6)/PL ; (D) POE(5)BSA(5)/PL.

A noter que les zones où aucun marquage n'apparaît dans les RIPs POE(2)BSA(8)/PL et POE(3)BSA(7)/PL correspondent à une irrégularité de la surface qui rend le matériau difficile à imager. Le réseau de fibrine au sein des RIPs POE-BSA/PL est dense, réparti de façon relativement homogène et assez

similaire à celui observé dans un gel de plasma (cf § 2.2). Ainsi, la présence du POE et de la BSA n'a que peu d'influence sur la formation du réseau de fibrine au sein de ces RIPs. Toutefois, les fibres du RIP POE(5)BSA(5)/PL semblent plus fines et former un réseau plus homogène que celui des autres formulations. C'est pourquoi, une analyse du diamètre moyen des fibres en fonction de la formulation du RIP a alors été réalisée au moyen du logiciel ImageJ (Figure 117). Ces valeurs sont comparées à celles mesurées sur un réseau de fibrine dans le gel de plasma seul.

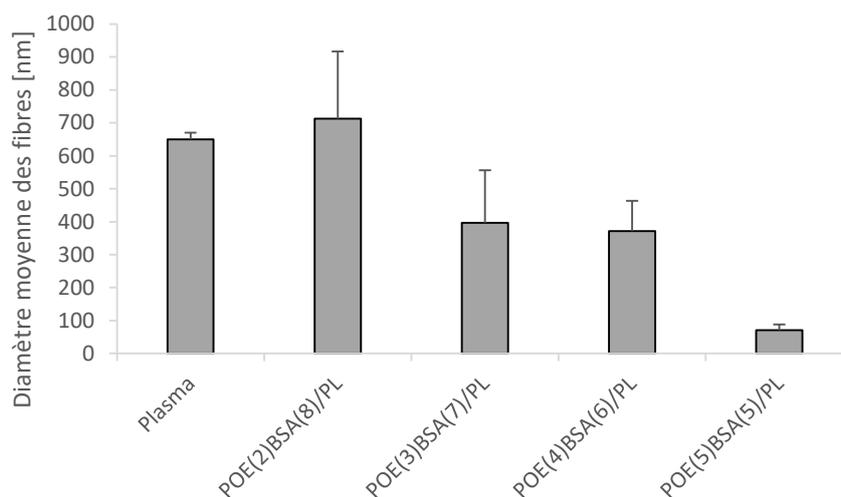


Figure 117 : diamètre moyen des fibres de fibrine dans les différents RIPs POE-BSA/PL et un gel de plasma.

Le diamètre moyen des fibres de fibrine sont du même ordre de grandeur dans un gel de plasma (650 nm - Figure 114A) et dans le RIP POE(2)BSA(8)/PL (700 nm). Lorsque la proportion de polymère synthétique augmente, le diamètre moyen des fibres diminue à environ 400 nm dans les RIPs POE(3)BSA(7)/PL et POE(4)BSA(6)/PL et est seulement de 100 nm pour un RIP POE(5)BSA(5)/PL. Ainsi, bien qu'il ne l'empêche pas, le réseau partenaire affecte légèrement la morphologie du gel de fibrine. Cependant, la morphologie de ces réseaux est très semblable à celle observée dans les caillots de fibrine formés dans des conditions voisines de celles *in vivo* (Figure 114B)²⁸¹. Le réseau de fibrine dans les RIPs POE-BSA/PL est donc très proche de celui qui permet l'arrêt du saignement et initie la cicatrisation.

3.2.2. Propriétés viscoélastiques

Les valeurs des modules de stockage G' et de perte G'' de ces RIPs POE-BSA/PL gonflés de tampon Tris ont ensuite été mesurés et rapportés en fonction du pourcentage de POE qu'ils contiennent (Figure 118).

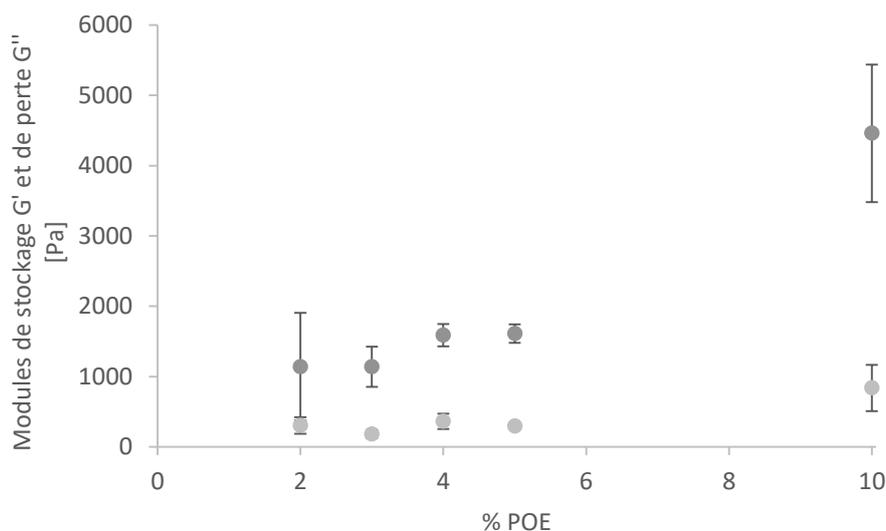


Figure 118 : modules de stockage G' (●) et de perte G'' (●) des différents RIPs POE-BSA/PL en fonction du pourcentage massique en POE. $\gamma = 1\%$ et $f = 1\text{Hz}$.

Les modules de stockages de ces matériaux sont compris entre 1000 et 2000 Pa et ne semblent pas dépendre directement de la proportion de POE. Ils sont nettement inférieurs à ceux des RIPs POE-BSA/Fb correspondant synthétisés avec le fibrinogène commercial qui sont tous supérieurs ou égaux à 2500 Pa (cf. Chapitre 3 § 4.1.3). Cependant, ces résultats sont satisfaisants puisque tous ces RIPs POE-BSA/PL sont autosupportés, manipulables et résistants à la déformation. De plus, il a été vérifié qu'ils peuvent être agrafés sur un support, sans se déchirer. Ainsi, en plus de leur composante autologue, ces matériaux peuvent être aisément maintenus en contact d'un corps et leur application comme pansement, voire substitut cutané, ne sera pas freinée par cet aspect.

3.2.3. Biodégradabilité enzymatique

3.2.3.1. Evolution des propriétés viscoélastiques

Afin de connaître la cinétique de dégradation de ces RIPs POE-BSA/PL, leurs propriétés viscoélastiques, d'une part, et la concentration de fragments relargués dans la solution d'enzyme, d'autre part, ont été suivies en fonction du temps, selon les mêmes protocoles que précédemment (cf. Chapitre 3 § 4.2.3). Ainsi, la Figure 119 présente l'évolution des modules de stockage pour des différents RIPs en fonction du temps d'immersion dans une solution de thermolysine à 2U.mL^{-1} . Les valeurs des modules ont été normalisées par rapport à la valeur mesurée avant la première immersion (100%).

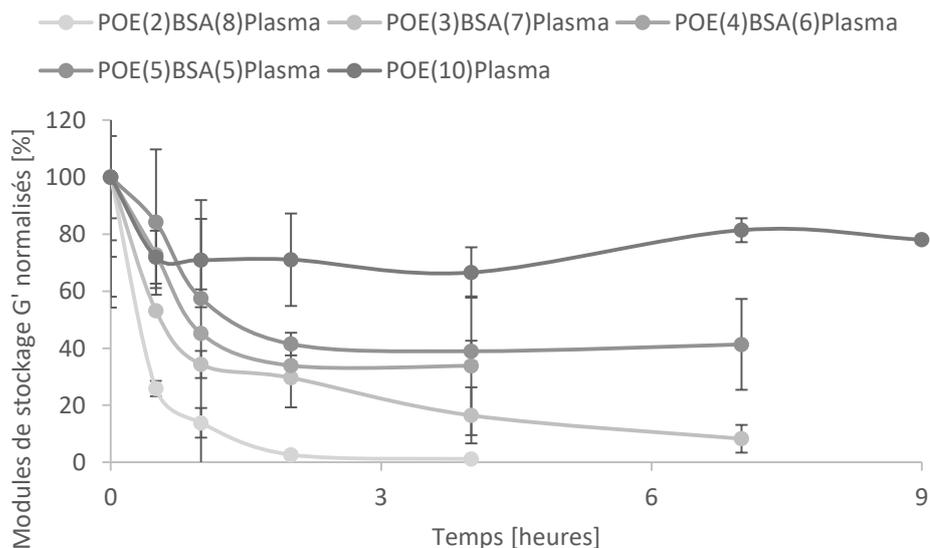


Figure 119 : évolution du module de stockage G' des RIPs POE-BSA/PL en fonction du temps d'immersion dans une solution de thermolysine à $2U.mL^{-1}$.

Les modules de stockage des RIPs POE-BSA/PL contenant de la BSA diminuent fortement (au moins 50%) au cours des 3 premières heures. Le RIP POE(2)BSA(8)/PL a un module de seulement 27 Pa après 2h d'immersion, alors que très mou et fragile, ce matériau est encore, curieusement, autosupporté à ce stade (il faut donc comparer ces valeurs de G' et G'' avec précaution, car elles ne reflètent pas forcément le caractère manipulable des hydrogels). Après 4h d'immersion, le matériau est alors trop fragile pour être manipulé et se fragmente sous son propre poids. Lorsque la concentration en POE est plus importante, la diminution des modules est moins importante : par exemple, la valeur du module du RIP POE(3)BSA(7)/PL après 7h est de 128 Pa, soit environ 10% de la valeur initiale. Le RIP POE(5)BSA(5)/PL atteint un module de 611 Pa, soit 40% de la valeur de départ. Enfin, le RIP POE(10)/PL ne subit une diminution que de 30%. La Figure 120 montre que la valeur du module au plateau augmente linéairement avec le pourcentage en POE présent dans le matériau.

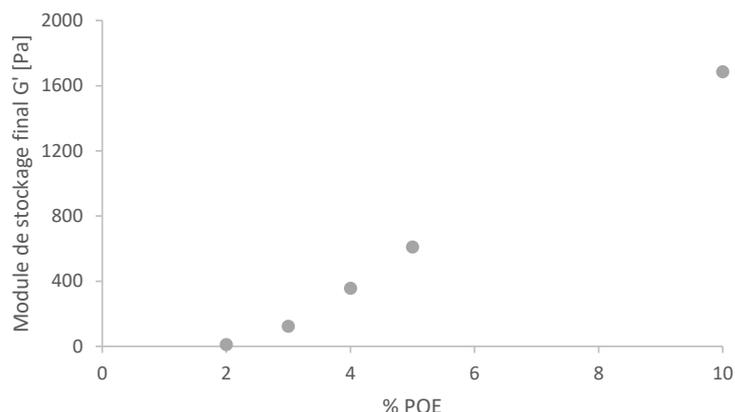


Figure 120 : module de stockage au plateau en fonction du pourcentage en POE contenu dans le RIP POE-BSA/PL.

Quelle que soit sa composition, les RIPs POE-BSA/PL se délitent après un certain temps d'immersion. Ce phénomène est détecté après 2h d'immersion pour les RIPs POE(4)BSA(6)/PL et POE(2)BSA(8)/PL et après 7h pour les RIPs POE(3)BSA(7)/PL et POE(5)BSA(5)/PL. Ainsi, à l'exception du RIP POE(10)/PL, quelle que soit la composition des RIPs POE-BSA/PL, le clivage protéolytique impacte fortement la structure de l'hydrogel, et, même s'il n'est pas solubilisé, celui-ci est partiellement voire largement dégradé (Figure 121). Le RIP POE(10)/PL incubé dans une solution de thermolysine à 10 U.mL^{-1} demeure macroscopiquement intact pendant plusieurs mois.

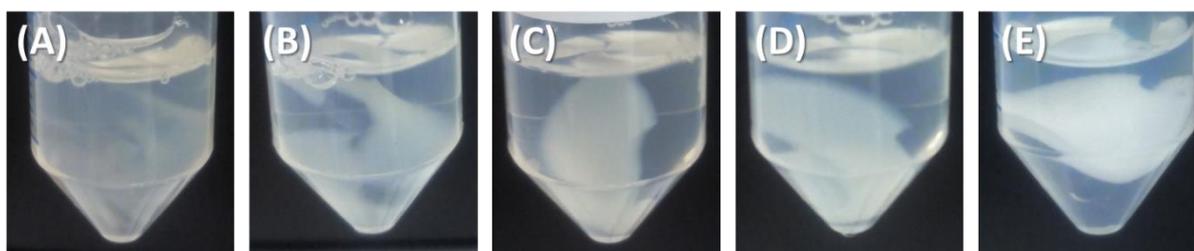


Figure 121 : photos des RIPs POE-BSA/PL après 9h d'immersion dans la solution de thermolysine. (A) POE(2)BSA(8)/PL (B) POE(3)BSA(7)/PL (C) POE(4)BSA(6)/PL (D) POE(5)BSA(5)/PL (E) POE(10)/PL.

Comme pour les RIPs POE-BSA/Fb (cf Chapitre 3 § 4.2.3), la présence du POE permet donc de renforcer le réseau protéique de BSA, et assure une plus grande longévité au matériau en présence d'une enzyme protéolytique modèle. En dépit de la richesse protéique apportée par le plasma, il est donc intéressant de constater que le POE continue d'assurer son rôle, c'est-à-dire à servir de soutien dans l'hydrogel et à limiter son hydrolyse. Par contre, alors que les RIPs POE-BSA/Fb contenant 4% et plus de POE ne se dégradent pas sur des temps courts dans la thermolysine (ils gardent leur intégrité macroscopique sur plusieurs semaines), tous les RIPs POE-BSA/PL se fragmentent significativement en 9h lorsque le RIP est

manipulé pour faire les mesures. Cette fragmentation est observée macroscopiquement après environ 10 jours pour un RIP POE(5)BSA(5)/PL lorsqu'ils ne sont pas sollicités.

3.2.3.2. Relargage des fragments protéiques

Le relargage de fragment protéique a été suivi en mesurant l'absorbance à 280 nm de la solution d'enzyme dans laquelle les différents RIPs ont été immergés (Figure 122).

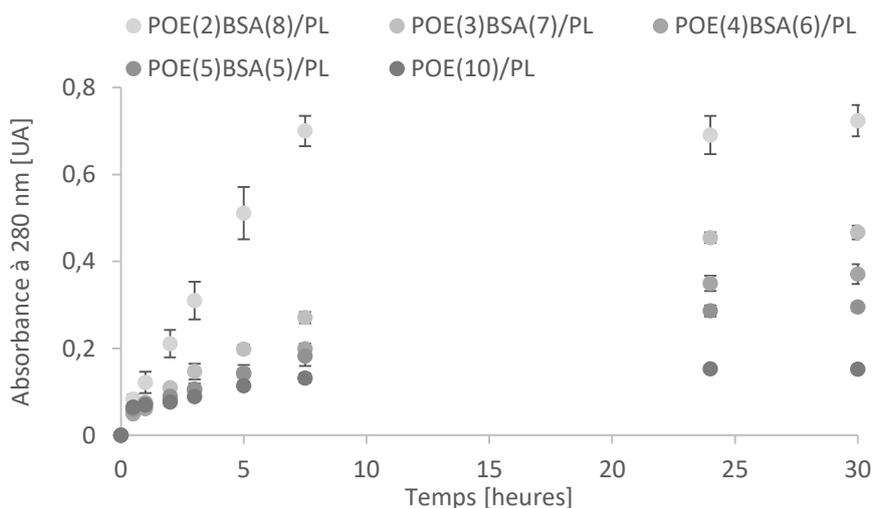


Figure 122 : suivi du relargage des fragments protéiques par mesure de l'absorbance à 280 nm de la solution de 2 U.mL⁻¹ de thermolysine dans laquelle les RIPs POE-BSA/PL sont immergés.

L'augmentation de l'absorbance est très importante pendant les 8 premières heures, après quoi un plateau est atteint. Il correspond vraisemblablement au maximum de sites de clivage dégradés dans ces conditions. Les vitesses initiales ont été calculées sur les deux premières heures de dégradation et sont reportées sur la Figure 123.

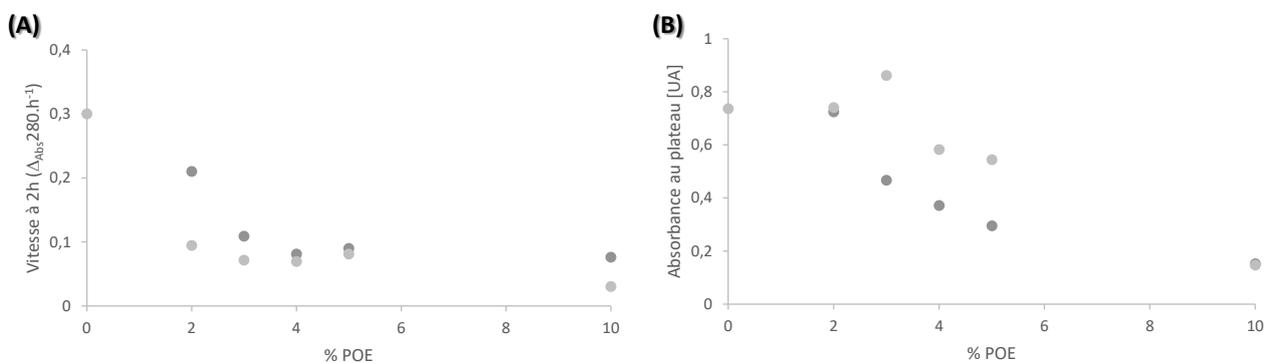


Figure 123 : (A) vitesse initiale calculée à t = 2h de dégradation et (B) absorbance au plateau (80h) pour les RIPs POE(x)BSA(y)/PL (●) et les RIPs POE(x)BSA(y)/Fb (●) en présence d'une solution de TL à 2U.mL⁻¹.

La vitesse initiale de dégradation du RIP POE(2)BSA(8)/PL est presque 2 fois plus élevée que celle des autres RIPs, plus riches en POE. Il est logique que ce matériau se dégrade plus rapidement puisque l'albumine est majoritaire par rapport au POE. Ce résultat est également en accord avec la diminution du module de stockage de ce matériau qui est également la plus rapide (cf.§ 3.2.3.1). De façon surprenante, l'ajout de seulement 10% de POE qui conduit au RIP POE(3)BSA(7)/PL, ralentit fortement la vitesse de dégradation ($0,109 \Delta\text{Abs}_{280} \cdot \text{h}^{-1}$). Cette vitesse n'est plus ensuite modifiée par l'ajout de POE dans le RIP POE-BSA/PL. En comparaison, les vitesses initiales de dégradation des RIP POE-BSA/Fb sont quasiment les mêmes pour les 4 compositions testées (autour de $0,1 \Delta\text{Abs}_{280} \cdot \text{h}^{-1}$), ce qui est proche de celles des RIPs POE-BSA/PL contenant moins de 5% de POE.

Comme pour les RIPs POE-BSA/Fb, les valeurs d'absorbance au plateau dépendent de la proportion de protéine dans le matériau (Figure 123B). Les valeurs des plateaux des RIPs POE-BSA/PL diminuent linéairement avec la proportion de POE dans les RIPs. La valeur de l'absorbance au plateau pour le RIP POE(10)/PL n'est que très légèrement supérieure à celle du RIP POE(10)/Fb (0,16 contre 0,14), ce qui indique que la protéase s'attaque majoritairement au réseau de fibrine et que la présence des autres protéines résiduelles, après les trois étapes de rinçage préalable à la dégradation, peut être négligée.

Des RIPs contenant un gel de fibrine peuvent donc être synthétisés à partir de plasma sanguin. La réticulation du coréseau partenaire semble peu modifiée par la présence du plasma. Les propriétés viscoélastiques et la biodégradabilité restent ainsi conservées.

3.2.4. Conservation sous forme lyophilisée

Dans le but d'une potentielle utilisation clinique, nous avons vérifié que ces matériaux pouvaient être lyophilisés, et conservés sous forme déshydratée. Ainsi, immédiatement après leur synthèse, les hydrogels ont été congelés, puis lyophilisés.

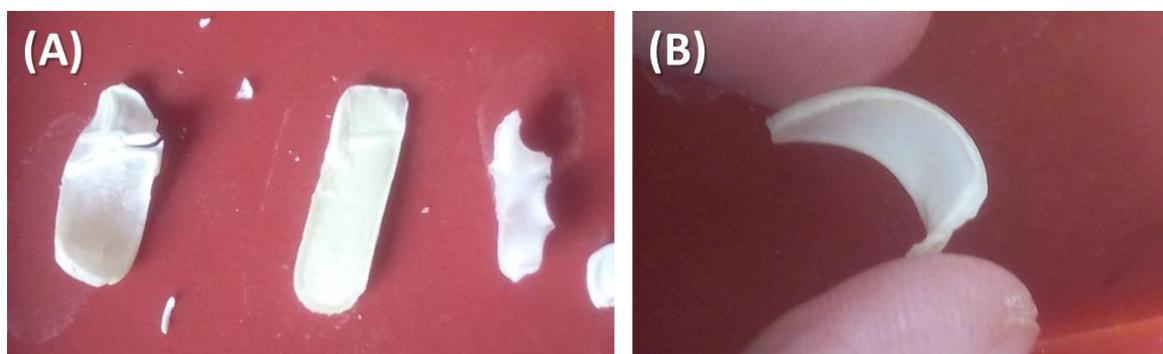


Figure 124 : photographies (A) (de gauche à droite) des RIPs POE(2)BSA(8)/PL, POE(5)BSA(5)/PL et POE(10)/PL. (B) flexibilité du RIP POE(5)BSA(5)/PL.

Les matériaux deviennent blancs lors de la lyophilisation, alors qu'ils sont légèrement jaunes lorsqu'ils sont hydratés. Le RIP POE(2)BSA(8)/PL (Figure 124A - gauche) s'est fragmenté alors que les deux autres RIPs restent intacts, bien que le RIP POE(10)/PL se recroqueville. Ils peuvent être manipulés et déformés sans se casser : ils sont très flexibles.

La lyophilisation est donc un moyen de conserver les RIPs POE-BSA/PL sous forme déshydratée, sauf s'ils sont riches en albumine. Toutefois, des analyses supplémentaires seraient nécessaires pour évaluer la capacité de réhydratation de ces matériaux et vérifier que leurs propriétés mécaniques et biologiques sont conservées après réhydratation.

3.3. Biocompatibilité

3.3.1. Prolifération cellulaire en conditions "classiques"

Des fibroblastes BJ (ATCC CRL-2522) sont à nouveau utilisés en tant que modèle cellulaire. Ils ont été ensemencés en surface des RIPs et cultivés avec du milieu de culture complet (10% de SVF) jusqu'à 3 semaines. La Figure 125A présente leur viabilité cellulaire en fonction du temps à la surface des RIPs POE(2)BSA(8)/PL, POE(5)BSA(5)/PL et POE(10)/PL.

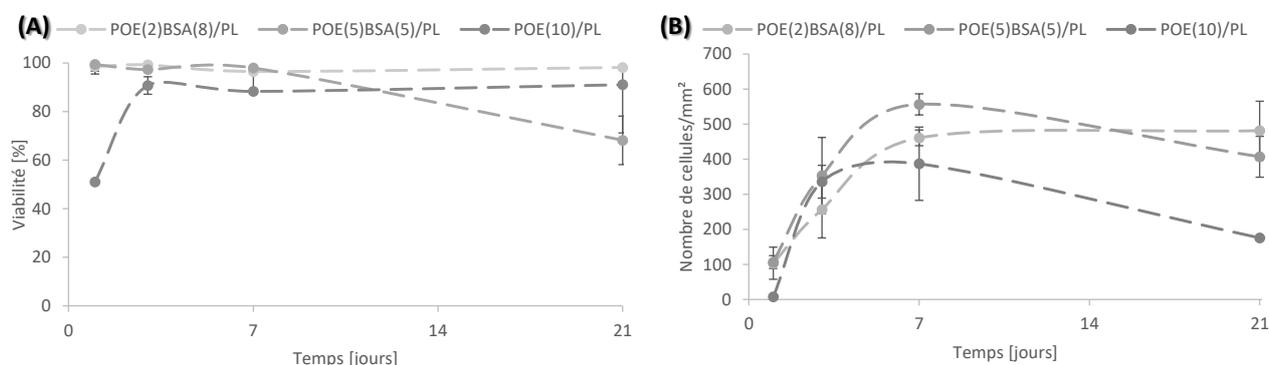


Figure 125 : (A) viabilité cellulaire et (B) nombre de fibroblastes BJ en surface des RIPs POE-BSA/PL en présence de milieu de culture complet (10% SVF)

Pour 24h de culture, la viabilité cellulaire est supérieure à 95% pour les deux RIPs coréseaux alors qu'elle n'est que de 50% pour le RIP POE(10)/PL. Cela indique que la surface d'un RIP ne contenant pas d'albumine réticulée est moins propice à l'adhérence cellulaire et que de ce fait, une quantité plus faible de cellules est capable de s'attacher. Il y a donc une certaine proportion de cellules qui meurent par anoïkis (apoptose en absence d'attachement à un support).

Sur des temps plus longs, le pourcentage de cellules viables en surface des RIPs POE(2)BSA(8)/PL et POE(5)BSA(5)/PL reste élevé. Il n'est pas possible de faire de distinction entre ces deux matériaux, malgré

leur comportement différent lors des expériences de dégradation (cf.§ 3.2.3). La viabilité sur le RIP POE(10)/PL, élevée à 3 et 7 jours (90%), n'est pas maintenue totalement, car elle diminue sensiblement à 21 jours (70%). Il est vraisemblable que les cellules qui survivent au-delà de 24h parviennent à établir des contacts d'adhérence en surface de ces matériaux puisqu'elles sont dans un milieu nutritif riche. Cependant, sur des délais plus longs, cette surface ne s'avère pas optimale pour la croissance cellulaire et la viabilité diminue.

Introduire de l'albumine dans le réseau POE est donc le moyen d'obtenir une viabilité cellulaire très élevée sur une durée longue (3 semaines). Cela confirme la tendance observée pour les RIPs POE-BSA/Fb (cf Chapitre 3) puisque la viabilité diminuait à partir de 3 jours pour le RIP POE(10)/Fb pour atteindre moins 5% de cellules vivantes à 3 semaines (sur la face la plus riche en POE). En revanche, pour les RIPs POE-BSA/Fb, la viabilité était maintenue supérieure à 90% même pour ces longues durées de culture.

Afin d'évaluer la prolifération cellulaire en surface de ces matériaux, les résultats de cette même expérience ont été rapportés en nombre de cellules par unité de surface (Figure 125B)**Erreur ! Source du envoi introuvable..**

Le nombre de cellules par mm² est multiplié par plus de 2 en 3 jours à la surface du RIP POE(2)BSA(8)/PL (passage de 100 à plus de 260) et par 3,5 à la surface du RIP POE(5)BSA(5)/PL (de 100 à un peu plus de 350). Ces valeurs sont très semblables, et traduisent le fait que ces deux matériaux, de compositions très proches, induisent un comportement très similaire pour les cellules. A la surface du RIP POE(10)/PL, le nombre de cellules à 1 jour est très faible (seulement 7/mm²) alors qu'à 3 jours, cette valeur augmente à 335, valeur du même ordre que celle mesurée sur les précédents RIPs. Ces résultats sont cohérents avec la viabilité cellulaire mais mériteraient d'être confirmés par des réplicats supplémentaires, car seuls deux échantillons ont été testés pour cette formulation. Il semble donc que le temps nécessaire aux cellules pour s'attacher à la surface des RIPs ne contenant pas d'albumine est plus long que sur ceux en contenant, ce qui se traduit par un délai avant d'observer une réelle prolifération. Cependant, il faut mettre en parallèle ces résultats avec ceux présentés dans le chapitre 3 : pour le RIP POE(10)/Fb, la viabilité des cellulesensemencées sur la face exposée aux UV chute, alors qu'elle se maintient côté Téflon. Sur les RIPs à base de plasma, la prolifération cellulaire semble être ralentie, ce qui est plus proche du comportement observé sur la face Teflon. Nous avons montré que le réseau de fibrine est présent en surface des RIPs à base de plasma, quelle que soit la face (Figure 116). En dépit la présence du réseau de fibrine, la présence du polymère limite l'adhérence cellulaire au moins dans un premier temps, ce qui se traduit donc par une mortalité plus importante pour les premiers jours de culture. Les cellules qui adhèrent au matériau parviennent ensuite à se multiplier, et la prolifération devient équivalente à celle en surface des matériaux contenant de l'albumine.

Après une semaine de culture, la prolifération cellulaire continue au même rythme à la surface des RIPs POE(2)BSA(8)/PL et POE(5)BSA(5)/PL (doublement du nombre de cellules/cm² entre 3 et 7 jours). Par contre, la prolifération semble ralentir sur les RIPs POE(10)/PL, conformément aux observations de la viabilité. Sur de plus longs temps, les RIPs ne contenant pas de BSA sont donc moins propices à la survie cellulaire que leur contre-partie incluant la protéine dans le réseau.

La morphologie des fibroblastes, ainsi que leur capacité de sécrétion de protéines de la matrice extracellulaire a été étudiée au moyen d'immunomarquages (DAPI, phalloïdine et anticorps contre le collagène de type I et la fibronectine - Figure 126).

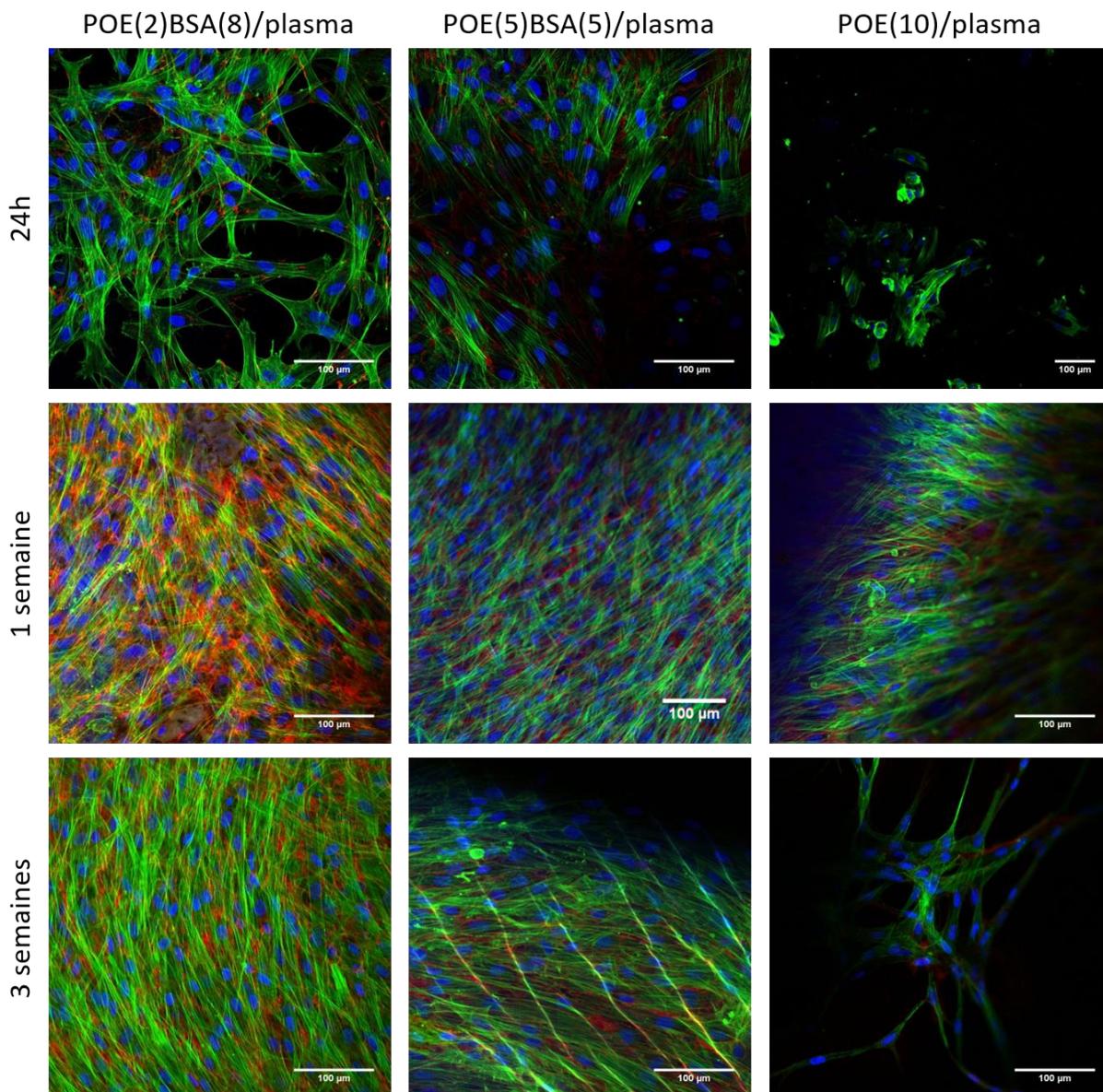


Figure 126 : observation en microscopie confocale (objectif x20) de la morphologie des fibroblastes BJ et de la répartition de deux molécules de la matrice extracellulaire : la Fibronectine (Rouge, anticorps secondaire couplé à l'alexa Fluor 568) et le collagène de type I (jaune, anticorps secondaire couplé à l'alexa fluor 633). Le noyau des cellules est marqué au DAPI (bleu) et le cytosquelette est en vert (phalloïdine couplée à Alexa Fluor 532).

Après 24h de culture, quelques fibroblastes bien étalés qui ont déjà adopté la morphologie caractéristique en étoile, sont observés sur le RIP POE(2)BSA(8)/PL. Très peu de fibronectine, située en périphérie des cellules, est visible. Il est probable que les fibroblastes soient en train de s'adapter à leur environnement, et que leur activité sécrétoire soit encore réduite. Bien qu'il y ait davantage de cellules sur le RIP POE(5)BSA(5)/PL, la quantité de fibronectine sécrétée est aussi faible. Les fibroblastes présentent là aussi la morphologie caractéristique, et semblent adhérer correctement au matériau. En revanche, sur le RIP POE(10)/PL, la situation est bien différente : les cellules sont nettement moins nombreuses, sont rondes et leur cytosquelette est bien moins visible. Aucune molécule de la matrice extracellulaire ne peut être observée. Le support le plus adapté à la culture de ces fibroblastes semble donc être les RIPs contenant de la BSA, mais, à ce stade, il est difficile de juger si sa proportion a une réelle influence sur le comportement cellulaire.

Après 1 semaine de culture, le nombre de cellules observées en surface des matériaux est nettement plus important, quelle que soit la composition du RIP. Il apparaît clairement que les cellules sont sur le point d'atteindre la confluence ou qu'elles y sont déjà parvenues. En croisant ces clichés avec les comptages et la viabilité cellulaire (Figure 125), il est évident que ces matériaux permettent, non seulement, une excellente viabilité cellulaire à 1 semaine (supérieure à 90%), mais aussi une importante prolifération cellulaire. De plus, les cellules produisent une importante quantité de fibronectine, et de collagène de type I, comme illustré sur la Figure 127 qui présente les marquages pour les deux protéines à 1 semaine de culture en surface du RIP POE(2)BSA(8)/PL.

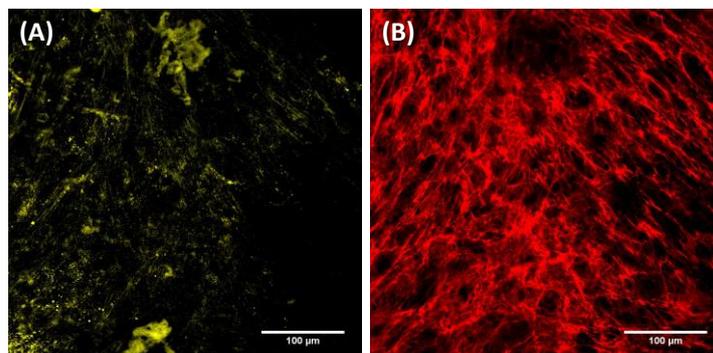


Figure 127 : images en microscopie confocale (objectif x20) du collagène de type I (A) et de la fibronectine (B) sécrétés par les fibroblastes BJ après 1 semaine de culture en surface du RIP POE(2)BSA(8)/PL. L'anticorps anti-Coll I est reconnu par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 633. L'anticorps anti-Fn est reconnu par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluor 568.

Le marquage du collagène de type I est bien visible pour le RIP POE(2)BSA(8)/PL alors qu'il est bien plus léger et punctiforme pour les deux autres formulations. La fibronectine forme un tapis homogène (Figure 127B) dont la morphologie régulière et fibrillaire montre un degré d'organisation élevé.

Alors que leur comportement cellulaire était quasiment identique à 1 semaine, les fibroblastes sont beaucoup moins nombreux en surface du RIP POE(10)/PL, et ils sont regroupés dans certaines zones. Les fibroblastes cultivés en surface des RIPs POE(2)BSA(8)/PL et POE(5)BSA(5)/PL présentent, eux, une morphologie étalée, et ils sont à confluence. Ils s'alignent tous dans une même direction et on peut supposer qu'une transition phénotypique vers l'état de myofibroblaste est en train de commencer. Pour vérifier ce point, un immunomarquage pour l' α -SMA (alpha-smooth muscle actin) aurait pu être fait. Pour des gels de fibrine ou de collagène, ce phénomène est bien connu et documenté, mais n'est généralement observé que pour des cellules encapsulées dans un hydrogel^{205,212,283-285}, ce qui n'est pas notre cas puisque les cellules sont simplement cultivées en surface des matériaux.

L'architecture du réseau de fibronectine change relativement peu entre 1 et 3 semaines, aussi les images ne sont-elles pas présentées. Cela traduit une importante activité sécrétoire de ces cellules qui ont proliféré jusqu'à recouvrir l'ensemble de la surface et mettent alors leur énergie à produire les macromolécules de la matrice extracellulaire. À 3 semaines de culture, le marquage du collagène n'a pas pu être effectué en raison de difficultés techniques.

Au vu de l'ensemble de ces résultats, on peut conclure que le RIP POE(2)POE(8)/PL et le RIP POE(5)BSA(5)/PL sont d'excellents supports pour la culture de fibroblastes de derme humain. En effet, ils y adhèrent très rapidement, établissent un grand nombre d'interactions avec leur surface, comme le traduit leur morphologie étoilée et les nombreux prolongements cytoplasmiques. Très rapidement, la prolifération est telle que les cellules atteignent la confluence, et sécrètent alors une grande quantité de matrice extracellulaire, en particulier de la fibronectine, mais aussi du collagène de type I, en particulier sur le RIP POE(2)BSA(8)/PL.

Toutefois, ces résultats de culture cellulaire à leur surface ne permettent pas mettre en avant de réels avantages à utiliser des matériaux à base de plasma plutôt qu'à base de fibrinogène commercial. Dans les deux cas (plasma ou fibrinogène commercial), la viabilité est excellente en surface des RIPs contenant de l'albumine (de l'ordre de 95% après 3 semaines de culture). Le comportement cellulaire ne semble pas être influencé par la formulation du matériau, car les profils de prolifération sont les mêmes sur les RIP POE(2)BSA(8)/PL et POE(5)BSA(5)/PL. La seule différence se situe au niveau du comportement des fibroblastes en surface du RIP POE(10)/PL par rapport au RIP POE(10)/Fb : sur la face du RIP POE(10)/Fb exposée aux UV, la concentration en polymère limite considérablement l'adhérence cellulaire, de sorte qu'une forte mortalité est observée pour 1 et 3 semaines de culture. Bien que la prolifération soit moins importante sur le RIP POE(10)/PL que pour les RIPs contenant de l'albumine, la viabilité est supérieure à 70% après 3 semaines de culture, et aucune différence n'a été observée entre les faces. Il est probable que les

autres protéines contenues dans le plasma (en particulier la fibronectine) permettent une meilleure adhérence cellulaire et à terme une meilleure viabilité cellulaire.

Les propriétés viscoélastiques des RIPs à base de Fibrinogène sont supérieures à celles des RIPs à base de plasma, et la résistance mécanique opposée aux cellules par les hydrogels est connue comme un facteur influençant le comportement cellulaire²²⁷⁻²³⁰. Cependant, il n'a pas été observé de différence notable de comportement cellulaire entre les RIPs à base de fibrinogène, plus rigides, et ceux à base de plasma. Afin de distinguer les différences de comportements, le suivi de la migration des cellules sur les différentes surfaces aurait pu être réalisé, notamment par vidéomicroscopie. En effet, les cellules se déplacent plus rapidement sur des surfaces plus rigides²²⁸.

Afin de mieux comprendre la façon dont le plasma influence la réponse cellulaire, une autre série d'expériences a donc été réalisée. Il s'agit de savoir si la présence de plasma confère un avantage pour la culture cellulaire.

3.3.2. Avantages des RIPs à base de Plasma en tant que support de culture ?

Le plasma étant riche en protéines (fibrinogène bien entendu, mais aussi fibronectine, protéines de la coagulation...) et en facteurs de croissance. Afin de mettre en évidence un avantage de la présence de ces différentes molécules au sein des RIPs, nous avons cultivé les fibroblastes BJ en surface des RIPs à base de plasma dans un milieu de culture moins riche que précédemment. Au lieu de 10%, ce sont seulement 2% de SVF qui ont été ajoutés au milieu de culture. Cependant, le milieu de culture est renouvelé régulièrement (tous les 3-4 jours) de façon à limiter la mort cellulaire. Parallèlement à cela, des fibroblastes sont cultivés dans les mêmes conditions, sur des RIPs à base de fibrinogène purifié.

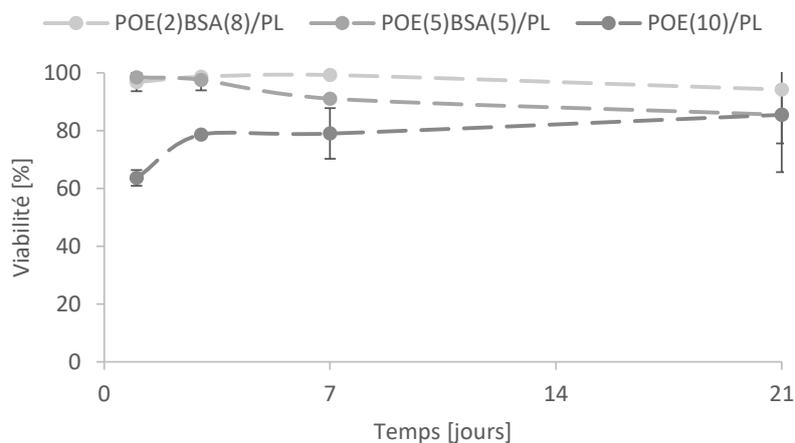


Figure 128 : viabilité cellulaire des fibroblastes BJ en surface des RIPs POE-BSA/PL en présence de milieu de culture minimum (2% SVF).

La viabilité cellulaire des fibroblastes en surface des RIPs POE-BSA/PL est presque égale à 100% jusqu'à 3 jours de culture et reste excellente sur des temps plus longs (7 et 21 jours -

Figure 128). La viabilité est plus faible (60-70%) sur le RIP POE(10)/PL sur des temps de culture courts (1 et 3 jours). Ensuite, elle augmente pour atteindre des valeurs similaires à celles mesurées sur les RIPs contenant de l'albumine (> 80%). Il est probable que les cellules aient plus de difficultés à établir des points d'adhérence en surface de ces RIPs POE(10)/Fb, la présence d'une quantité importante de polymère synthétique étant défavorable à leur attachement. Ce profil de prolifération est donc cohérent avec ce qui a été observé dans des conditions de culture classiques, avec 10% de SVF.

Ces résultats ont été comparés aux valeurs obtenues sur les RIPs à base de fibrinogène pur. Pour les temps courts de culture (1, 3 et 7 jours), les valeurs sont sensiblement identiques quelle que soit la source du fibrinogène. Le Tableau 4 présente uniquement les viabilités moyennes après 3 semaines de culture.

	Fibrinogène	Plasma
POE(2)BSA(8)	67,9 ± 4,9	94,6 ± 5,1
POE(5)BSA(5)	82,3 ± 3,0	85,5 ± 9,3
POE(10)	47,8 ± 11,9	85,7 ± 2,6

Tableau 13 : viabilité en % des fibroblastes cultivés en surface de RIPs à base de fibrinogène ou de plasma après 21 jours en milieu minimum (2% SVF).

La viabilité des cellules cultivées en surface du RIP POE(2)BSA(8)/PL est supérieure à celle mesurée sur le RIP équivalent à base de fibrinogène pur. De même, la viabilité sur le RIP POE(10)/PL est presque deux fois supérieure à celle sur le RIP POE(10)/Fb. En revanche, pour les RIPs POE(5)BSA(5)/PL et POE(5)BSA(5)/Fb, la viabilité est quasiment identique, autour de 85%. Le résultat observé sur le RIP POE(10)/PL est particulièrement intéressant : alors qu'il ne contient pas de BSA et qu'il n'est pas biodégradable, la survie des fibroblastes cultivés en milieu minimum y est du même ordre de grandeur que sur les RIP POE(2)BSA(8)/PL et POE(5)BSA(5)/PL. Dans des conditions de culture plus drastiques, où les nutriments sont moins abondants, il semblerait que les fibroblastes parviennent mieux à se maintenir en vie sur un RIP à base de plasma que de fibrinogène.

La prolifération des fibroblastes a également été étudiée en fonction du temps de culture.

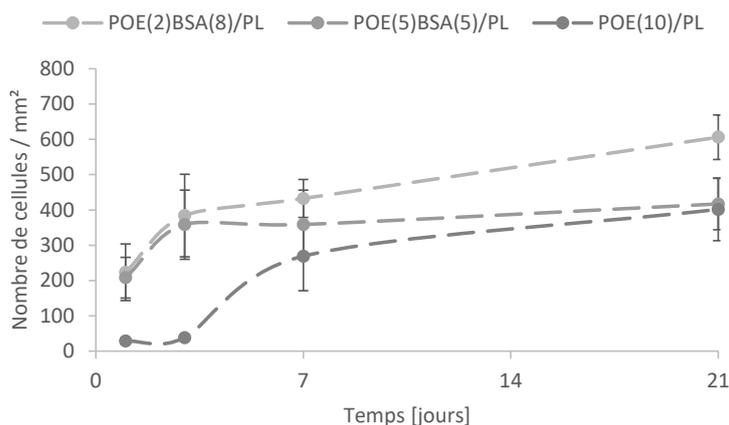


Figure 129 : nombre de cellules par unités de surface en fonction du temps de culture en surface des RIPs POE-BSA/PL en milieu minimum (2% SVF).

Pour le RIP POE(2)BSA(8)/PL, la prolifération cellulaire est très importante pendant les 3 premiers jours (doublement du nombre de cellules/mm²). Ensuite, la croissance est plus lente, mais continue, jusqu'à 21 jours, et la population cellulaire est alors multipliée par un facteur 1,5. En surface du RIP POE(5)BSA(5)/PL, ces deux mêmes phases de prolifération sont également observées. Lors des 3 premiers jours, la croissance est aussi rapide que sur le RIP POE(2)BSA(8)/PL (doublement du nombre de cellules/mm²). Cependant, à partir de 3 jours, la prolifération semble s'arrêter puisque la population cellulaire se maintient sans augmentation. Le comportement cellulaire en surface du RIP POE(10)/PL est assez différent. Pendant les 3 premiers jours, le nombre de cellules demeure très faible et constant. Ensuite, la croissance semble s'amorcer, et à 21 jours les cellules sont aussi nombreuses en surface de ce matériau que sur le RIP POE(5)BSA(5)/PL. Cette latence correspond à ce qui a été observée pour la viabilité dont les valeurs sont plus faibles aux temps de culture courts. Le POE étant connu pour limiter l'adsorption protéique, cela retarde l'adhérence cellulaire et la prolifération en surface du matériau. Mais les cellules finissent par surmonter cet obstacle, certainement en raison de la présence de fibrine, mais aussi probablement grâce à certaines protéines favorisant l'adhérence cellulaire telles que la fibronectine. Un tel comportement ne pourrait pas être observé en surface d'un réseau simple de POE ^{126,233}. Lors de sa thèse, L. Bidault avait montré que les fibroblastes BJ, cultivés en surface de RIPs riches en PVA, adoptaient un comportement similaire. Le rôle du gel de fibrine formé au sein de cet hydrogel a donc un rôle crucial pour favoriser l'adhérence et la prolifération cellulaire.

De même que pour la viabilité cellulaire, les nombres moyens de cellules/mm² ont été comparées à celles de fibroblastes cultivés en surface des RIPs correspondants à base de fibrinogène pur, dans 2% de SVF (Tableau 5). Les valeurs sont assez différentes à tous les temps de culture, mais la tendance générale peut être déduite de ce qui est observé après 3 semaines de culture.

	Fibrinogène	Plasma
POE(2)BSA(8)	1218 ± 95	606 ± 63
POE(5)BSA(5)	659 ± 45	417 ± 73
POE(10)	190 ± 77	401 ± 89

Tableau 14 : nombre moyen de cellules/mm² après 3 semaines de culture en milieu minimum (2% SVF) des fibroblastes BJ en surface de RIP à base de fibrinogène ou de plasma.

Alors que le nombre moyen de cellules/mm² est de 1200 sur le RIP POE(2)BSA(8)/Fb, il est seulement de 600 sur le RIP POE(8)BSA(2)/PL. Une différence du même ordre de grandeur est observée pour les RIPs POE(5)BSA(5)/PL ou Fb. Pour ces deux RIPs contenant de l'albumine, la quantité de cellules présentes à la surface du RIP à base de plasma est inférieure à celle mesurée sur le RIP équivalent à base de fibrinogène pur. Ces résultats ne sont pas cohérents avec les résultats de la viabilité puisque les cellules cultivées dans des conditions plus drastiques en terme de nutriments sont capables de survivre sur un matériau à base de plasma, alors qu'elles se maintiennent un peu plus difficilement sur un RIP à base de fibrinogène. La prolifération importante serait donc un moyen de contrer une mortalité cellulaire plus élevée. Cependant, ces observations nécessiteraient être appuyées par d'autres tests, notamment en s'intéressant aux marqueurs de l'apoptose. Si notre hypothèse est valide, ils devraient être surexprimés pour les cellules cultivées dans en milieu minimum sur les RIPs à base de fibrinogène pur.

Par contre, les résultats de la viabilité cellulaire et de la prolifération sur le RIP POE(10)/PL sont cohérents quand ils sont comparés à ceux d'un RIP POE(10)/Fb : le nombre moyen de cellules/mm² est bien plus élevé sur le RIP POE(10)/PL que sur le RIP POE(10)/Fb (du simple au double). Ainsi, sur les RIPs ne contenant pas d'albumine, bien que la viabilité aux temps courts soit assez faible, les cellules finissent par adhérer au support, et sont alors en mesure de proliférer. Ce résultat est une piste intéressante : un RIP POE(10)/PL semble être un matériau qui favorise la prolifération cellulaire sur des temps de culture supérieurs à 1 semaine. Il est très stable et résistant à l'hydrolyse enzymatique même sur de longues durées (> 8 semaines). Ce type de matériau possède des propriétés viscoélastiques importantes (3 kPa) et pourrait avoir des applications pour jouer un rôle de membrane rigide protégeant des organes ou comme support de culture sur des temps longs.

La morphologie des fibroblastes a ensuite été étudiée, utilisant les mêmes protocoles que précédemment (Figure 130).

Sur le RIP POE(2)BSA(8)/PL, après 24h de culture dans du milieu minimum, la morphologie cellulaire est très similaire à celle des fibroblastes cultivés dans milieu complet (Figure 126). Il en est de même sur le RIP POE(5)BSA(5)/PL, sur lequel le nombre de cellules est toutefois supérieur à ce qui est observé sur le RIP

POE(2)BSA(8)/PL. Après 1 semaine de culture, la prolifération cellulaire en surface de ces deux matériaux est importante, conformément aux résultats présentés sur la Figure 129 : les cellules y adhèrent et prolifèrent. D'importantes quantités de fibronectine sont déjà sécrétées après 1 semaine. Les cellules sont donc capables de sécréter les macromolécules de la matrice extracellulaire. Le nombre de cellules semble augmenter encore jusqu'à 3 semaines de culture. Ainsi, dès les premières heures de culture et jusqu'à des temps relativement longs, les fibroblastes adoptent une morphologie étoilée, ce qui traduit le fait qu'ils ont établi de nombreux points d'ancrage. Leur activité est orientée vers la synthèse de macromolécules de la MEC, en dépit de la quantité réduite en nutriments (2% SVF). Ces matériaux sont donc des supports de culture adaptés, même dans des conditions de culture moins favorables.

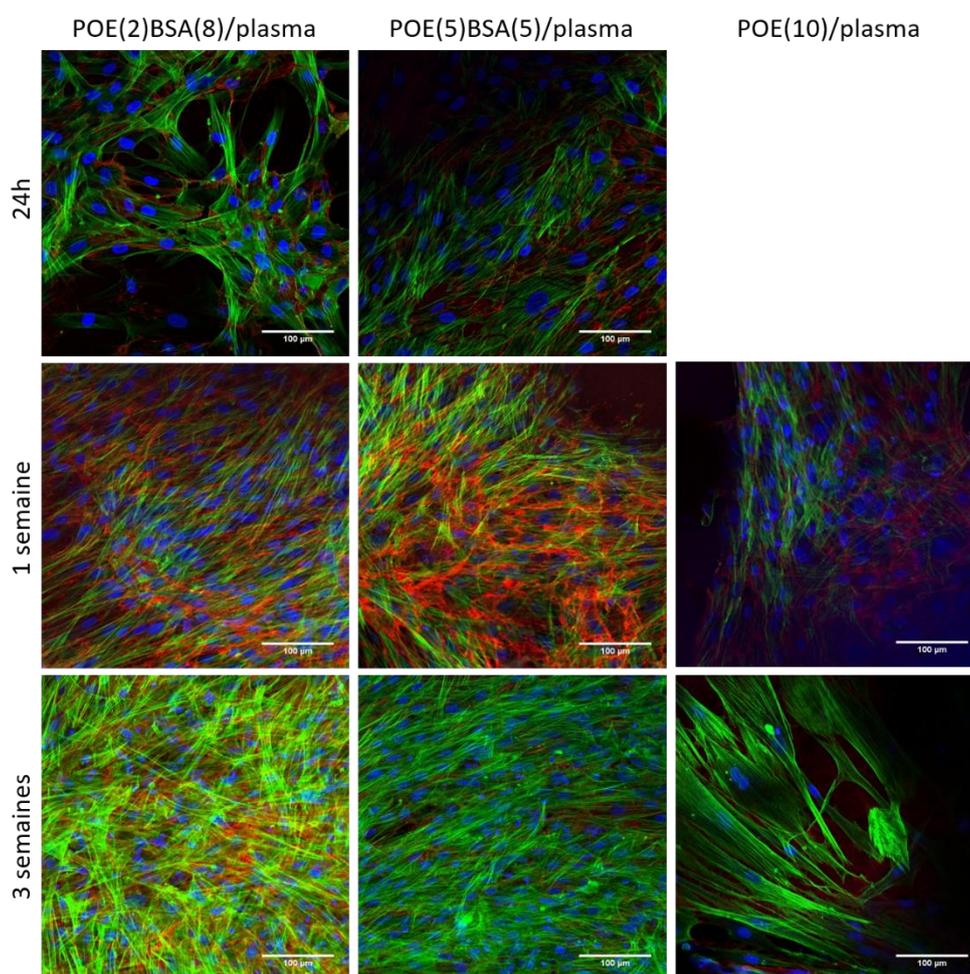


Figure 130 : observation en microscopie confocale (objectif x20) de la morphologie des fibroblastes BJ cultivés en milieu minimum (2% SVF) et de la répartition de la Fibronectine (Rouge, anticorps secondaire couplé à l'alexa Fluor 568) et du collagène de type I (jaune, anticorps secondaire couplé à l'alexa fluor 633). Le noyau des cellules est marqué au DAPI (bleu) et le cytosquelette est en vert (phalloïdine couplé à Alexa Fluor 532).

Enfin, le comportement cellulaire est un peu différent sur le RIP POE(10)/PL pour lesquels les résultats observés sont cohérents avec la viabilité et la prolifération cellulaire. Dans les premiers temps de

culture, l'adhérence ne semble pas se faire convenablement, à tel point qu'aucune image satisfaisante n'a pas été réalisée à 24h. Après 1 semaine, les fibroblastes parviennent à adhérer et commencent à se multiplier. A 3 semaines, ils ont une morphologie étalée et commencent à recouvrir la plus grande partie de la surface du matériau. La comparaison des fibroblastes cultivés en conditions classiques (Figure 126) avec ceux cultivés dans du milieu minimum ne révèle que très peu de différences. La prolifération cellulaire étant plus importante sur les RIPs cultivés avec 10% de SVF, les cellules sont plus nombreuses et elles sont davantage rapprochées, recouvrant complètement la surface. Avec 2% de SVF, la densité cellulaire est plus faible et de ce fait, les cellules sont davantage espacées, bien que nombreuses. Sur le RIP POE(10)/PL, les cellules sont davantage étalées et leur cytosquelette est bien marqué avec 2% de SVF, alors que leur morphologie était fusiforme en présence de 10% de SVF.

Enfin, nous avons comparé la morphologie cellulaire des fibroblastes cultivés en présence de 2% de SVF, sur des RIPs à base de plasma ou de fibrinogène purifié. Là encore, le comportement est assez similaire. La Figure 131 présente la comparaison pour les différentes formulations après 3 semaines de culture en milieu minimum (2% SVF).

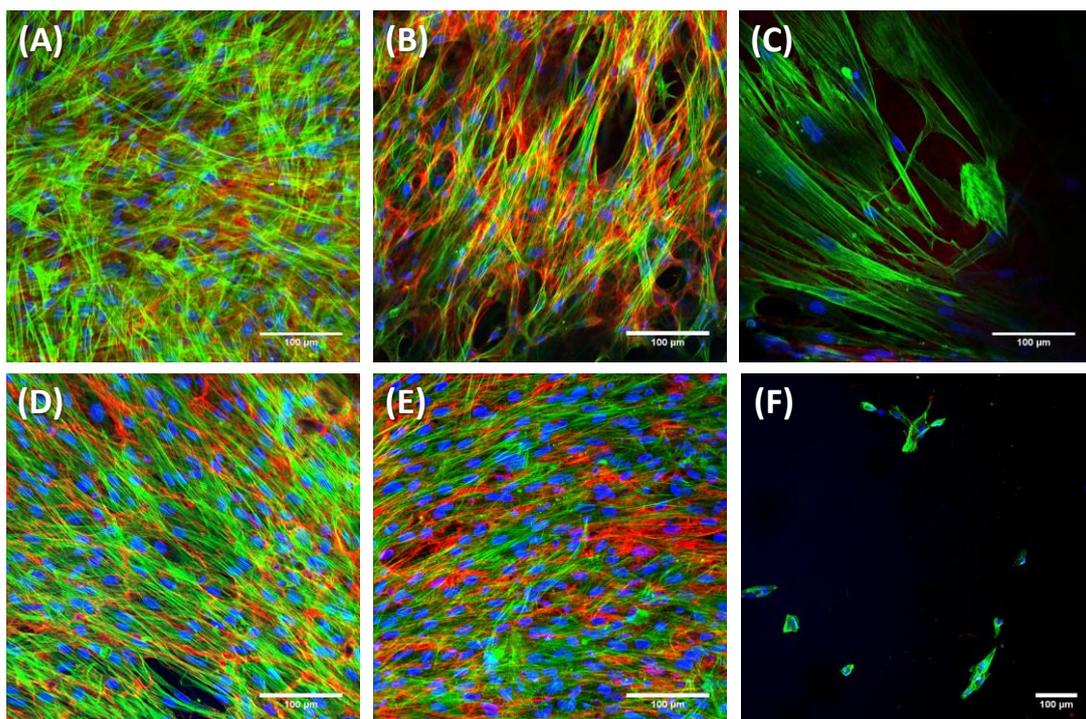


Figure 131 : observation en microscopie confocale (objectif x20) de la morphologie des fibroblastes BJ cultivés en milieu minimum (2% SVF) en surface de RIPs POE(2)BSA(8) (A) et (D), POE(5)BSA(5) (B) et (E) et POE(10), à base de plasma (A) à (C) ou de Fibrinogène (D) à (F), après 3 semaines de culture. La fibronectine apparaît en rouge, le noyau des cellules en bleu et le cytosquelette en vert.

Pour le RIP POE(2)BSA(8), les cellules sont plus nombreuses en surface du RIP à base de Fg et cela se traduit par une organisation des cellules, toutes dans la même direction. Une quantité importante de Fibronectine est sécrétée dans les deux cas. Pour le RIP POE(5)BSA(5), la densité cellulaire est encore plus importante en surface du RIP à base de Fg, et aucun espace n'est laissé vide. La totalité de la surface du matériau est recouverte par les fibroblastes, alors que pour les RIPs à base de plasma, certaines zones sont laissées vides. Cependant, la quantité de fibronectine sécrétée est très importante quelle que soit la source du Fibrinogène. A la surface des RIPs POE(10)/Fb, les cellules sont très peu nombreuses (cf Tableau 14) et la plupart sont rondes, ce qui traduit un nombre réduit de contact d'adhérence. La surface de ces RIPs est donc défavorable à l'adhérence cellulaire, alors que pour le RIP POE(10)/PL, les cellules sont plus nombreuses et bien étalées. De la fibronectine peut être observée en périphérie des fibroblastes. Le peu de différence observée entre ces deux conditions est peut être lié au fait que suite à la synthèse des RIPs (à base de plasma ou de fibrinogène), les matériaux sont placés dans du milieu de culture pendant une nuit. Cette étape permet de se débarrasser de l'amorceur et des monomères qui n'auraient pas réagi, mais aussi d'échanger le tampon contre du milieu de culture. Lors de cette étape, à l'image des fractions solubles protéiques mesurées (Tableau 12). Il est probable que certaines protéines du plasma aient été extraites du matériau. Ce phénomène n'a pas été quantifié, mais cela pourrait expliquer pourquoi les deux conditions donnent des résultats si proches, d'autant plus que la concentration réelle en fibrine dans le matériau à base de plasma est inférieure d' 1 mg.mL^{-1} à celle des RIPs à base de fibrinogène purifié. Cela peut avoir une influence sur la réponse cellulaire, car cela réduit légèrement la capacité des cellules à adhérer au réseau.

La prolifération cellulaire et la sécrétion des macromolécules de la matrice extracellulaire très élevées sur les matériaux à base de fibrinogène ne sont pas fortement améliorées par l'apport de plasma. La biocompatibilité sur les RIPs à base de fibrinogène commercial étant déjà excellente, il était difficile d'améliorer encore ce résultat. Par contre, les résultats obtenus pour le RIP POE(10)/PL sont très intéressants : en présence de 2% de SVF, ces matériaux permettent une bonne prolifération cellulaire, ce qui n'est pas le cas avec le fibrinogène. La prolifération ralentie par rapport aux matériaux contenant de l'albumine sur les temps courts est importante sur le plus long terme. Après trois semaines de culture, les fibroblastes ont une morphologie étalée et ils ont proliféré. Ce type de matériau, résistant à la dégradation pendant plusieurs mois, pourrait être utilisé pour des applications nécessitant une implantation sur du long terme.

4. Conclusion

Nous avons donc démontré dans ce chapitre qu'il est possible de faire gélifier du plasma total en présence de chlorure de Calcium à 20 mM, et que cette gélification est accélérée en présence de thrombine exogène. Les gels ainsi obtenus sont très fragiles ne peuvent pas être manipulés. Des RIPs à base de plasma

ont donc été synthétisés. Ils incorporent une concentration en fibrinogène proche de la concentration physiologique, sont autosupportés et aisément manipulables (G' d'environ 1kPa). La réticulation de ces matériaux est satisfaisante, car la proportion de polymère soluble est inférieure à 10% et une grande partie des protéines incorporées dans le matériau reste emprisonnée au sein du gel. Les matériaux peuvent être dégradés par voie enzymatique, en présence d'une protéase modèle, et la cinétique de dégradation est d'autant plus rapide que la concentration en albumine est importante. Nous avons enfin montré que ces matériaux sont de bons supports pour la culture de cellules eucaryotes, et plus particulièrement pour les fibroblastes. Ils adhèrent rapidement à la surface de ces hydrogels, s'étalent, prolifèrent et sécrètent d'importantes quantités de matrice extracellulaire. Dans des conditions de culture plus drastiques, avec seulement 2% de SVF, la présence de plasma permet la survie des fibroblastes en surface des RIPS POE(10)/PL, alors que la mortalité cellulaire est importante en surface des RIPS POE(10)/Fb cultivés dans de telles conditions.

Conclusion générale et perspectives

Pour la réparation tissulaire, c'est à concentration physiologique que le gel de fibrine engendre la meilleure réponse cellulaire, mais il ne peut être manipulé en raison de ses faibles propriétés viscoélastiques. La possibilité d'obtenir des matériaux autosupportés en l'incorporant au sein d'architecture Réseaux Interpénétrés de Polymères (RIP) avait été démontrée lors des précédents travaux. Deux réseaux partenaires synthétiques, à base de Polyoxyde d'éthylène (POE) et d'alcool polyvinylique (PVA), avaient alors été identifiés. Ces deux polymères sont neutres, hydrophiles, et considérés comme non cytotoxiques. Les RIPs à base de POE présentaient l'inconvénient de ne pas pouvoir être réhydratés de façon réversible après séchage, ce qui rendait impossible leur stockage à l'état sec avant utilisation. Le PVA étant plus hydrophile que le POE, les RIP ainsi obtenus ne présentaient plus cet inconvénient. De plus, ces matériaux ont été rendus dégradables par l'incorporation d'albumine copolymérisée avec le PVA *via* des fonctions méthacrylate introduites (RIP PVA-BSA/Fb). Ces matériaux se fragmentaient alors en présence d'une concentration élevée de protéase.

Au début de ma thèse, j'ai donc entrepris de caractériser la réversibilité à l'hydratation des RIP PVA-BSA/Fb, et de contrôler leur dégradation. La vitesse de dégradation des matériaux a été évaluée en suivant l'apparition de fragments protéiques dans la solution de thermolysine dans laquelle ils sont immergés. La composition du RIP PVA-BSA/Fb permet de contrôler sa cinétique de dégradation : plus le matériau est riche en albumine, plus il est dégradé rapidement, et la diffusion de l'enzyme au sein de l'hydrogel ne limite pas sa dégradation. Bien que les propriétés de ces RIP à base de PVA soient prometteuses, ce dernier doit être préalablement fonctionnalisé par des groupements méthacrylate, et une certaine variabilité a été observée entre les différents lots. De plus, il n'était pas possible, au sein de nos laboratoires, de réaliser cette modification dans des conditions stériles, et il s'avère impossible de stériliser le PVAm après sa synthèse. Ainsi, ces contraintes nous ont amené à envisager une alternative à son utilisation.

L'un des principaux objectifs de mon doctorat a donc été la mise au point de la synthèse de nouveaux RIPs, toujours à base de fibrine, mais dans lequel le partenaire synthétique est disponible commercialement, et qui puisse être stérilisé. Les hydrogels ainsi obtenus devaient être biodégradable et biocompatibles, afin d'être colonisés et remodelés par des cellules lors de leur implantation. Sur la base des travaux antérieurs, nous avons choisi le polyoxyde d'éthylène. Ce réseau peut être synthétisé à partir de différents oligomères

(PEGDM), disponibles commercialement. Les PEGDM de petites masses molaires sont des liquides visqueux qui peuvent être stérilisés par filtration sur 0,22 μm . Les coréseaux POE-BSA ont, dans un premier temps, été synthétisés et caractérisés. Ces matériaux sont manipulables et présentent des modules viscoélastiques supérieurs à ceux des réseaux simples correspondant (1500 à 2000 Pa contre 800 Pa pour les réseaux simples), ce qui montre que l'albumine copolymérise effectivement avec le PEGDM. Un gel de fibrine a ensuite été incorporé dans ces coréseaux pour synthétiser des RIP POE-BSA/Fb. En modifiant la proportion de PEGDM et d'albumine, nous avons obtenu une série de matériaux dont la réticulation a été optimisée en introduisant 1 mole d'amorceur pour 16 moles de fonctions méthacrylate. Les matériaux ont alors des fractions solubles inférieures à 8% et des modules de stockage qui varient de 2000 à 5000 Pa pour les matériaux les plus riches en POE. Le réseau de fibrine est fibrillaire et homogène, avec une morphologie proche de celle des gels de fibrine seule. Les matériaux ont une structure poreuse, et la taille des pores est modulée entre 7 et 25 μm en moyenne en fonction de la proportion en POE dans le RIP. La biodégradabilité de ces RIP a ensuite été étudiée. Le suivi de l'apparition des fragments protéiques dans la solution de thermolysine montre que leurs profils de dégradation sont légèrement différents de ceux des RIP PVA-BSA/Fb. Simultanément, les modules de stockage des matériaux chutent très rapidement dès le début de l'incubation dans la solution de protéase, et l'augmentation de la proportion en POE diminue la vitesse de dégradation (de quelques heures à plusieurs jours) et augmente les modules finaux (entre 0 et 800 Pa). La biocompatibilité, point crucial pour des applications en ingénierie tissulaire, a été vérifiée en deux dimensions : la viabilité de fibroblastes de derme humain en surface de ces RIP est supérieure à 95% après 3 semaines de culture, ils adoptent une morphologie étalée, et sécrètent d'importantes quantités de macromolécules de la matrice extracellulaire.

Enfin, en vue de l'encapsulation cellulaire au sein de ces RIP, l'impact de la photopolymérisation sur la viabilité des fibroblastes a été étudié. Les radicaux libres formés pour amorcer la synthèse du coréseau POE-BSA ont, certes, un effet néfaste sur les cellules, mais qui est nettement atténué en présence de PEGDM et de BSA_m qui captent ces radicaux libres. Le temps d'exposition aux UV, fixé à 1h pour toute l'étude, pourra être réduit à 30 min pour limiter les éventuels dégâts sur l'ADN cellulaire et les altérations possibles des protéines. Bien que des études supplémentaires soient nécessaires, il est donc envisageable d'encapsuler des cellules au moment de la synthèse de ces RIPs. Nos partenaires du projet ANR FibriDerm s'intéressent particulièrement à ce point, afin de déterminer plus précisément dans quelles conditions ces matériaux cellularisés pourraient être obtenus, avec l'impact négatif le plus faible possible pour les cellules.

Par la suite, nous avons montré qu'il est possible de greffer au sein du coréseau un sel d'ammonium quaternaire. Les modules viscoélastiques des matériaux sont alors augmentés jusqu'à 15 000 Pa, ce qui élargit encore les champs d'application possible de ces RIP. Simultanément, plus la concentration en ammonium quaternaire est élevée, plus la dégradation des RIP est ralentie. Par contre, il semble que la

concentration en ammonium quaternaire soit trop faible pour que les matériaux aient une action antibactérienne vis-à-vis de souches modèles. Afin d'obtenir un effet bactériostatique plus marqué, un autre sel d'ammonium pourrait être choisi, avec, par exemple, des chaînes alkyles plus longues.

Enfin, nous avons exploré une voie alternative pour la synthèse de ces matériaux en remplaçant le fibrinogène commercial par du plasma sanguin lors de la synthèse des RIP. Le fibrinogène présent dans le plasma est clivé par la thrombine après ajout de chlorure de Calcium et cela est accéléré par l'ajout de thrombine exogène. Les RIP POE-BSA/Fb sont autosupportés bien qu'ils présentent des modules viscoélastiques plus faibles que leurs équivalents à base de fibrinogène commercial. Ils présentent un potentiel intéressant de par la richesse du plasma en facteurs de croissance et autres molécules bioactives favorisant la réparation tissulaire. La viabilité cellulaire en surface de ces RIPs est excellente, même dans des conditions de culture plus drastiques (en présence de seulement 2% de SVF).

Au cours de ce travail, plusieurs nouveaux hydrogels à base de fibrine ont été synthétisés. Leurs propriétés viscoélastiques varient entre 500 et 15000 Pa. Ils peuvent être dégradés en des temps variant entre quelques heures et plusieurs jours, avec, pour les matériaux intacts, des modules atteignant entre 1000 et 2000 Pa au terme de la dégradation. Mes savoir-faire concernant les RIP POE-BSA/Fb ont été transférés à nos partenaires du projet ANR Fibriderm, afin qu'ils étudient plus précisément la réponse cellulaire au contact de ces matériaux, et pour l'élaboration d'un équivalent de derme humain. Ainsi, à l'Université de Technologie de Compiègne, les RIPs vont être implantés chez des rats athymiques afin d'évaluer la réponse inflammatoire, la vascularisation et l'infiltration des tissus par des cellules souches mésenchymateuses de l'hôte. Parallèlement, au Centre de Transfusion sanguine des Armées, des cultures tridimensionnelles de fibroblastes de derme humain puis de cellules souches mésenchymateuses seront réalisées au sein de ces RIP, dans le but d'évaluer la prolifération cellulaire, la différenciation et l'apoptose. Ces expériences permettront la mise au point d'un modèle de derme humain reconstruit, dans lequel les fibroblastes seront capables de proliférer et de néosynthétiser les protéines de la matrice extracellulaire. Ensuite, un équivalent de peau humaine complet sera créé, par addition d'un épithélium différencié constitué de kératinocytes autologues de derme humain en surface de la matrice cellularisée précédemment décrite. La culture de ces reconstructions cutanées à l'interface air-liquide permettra au tissu d'acquérir la morphologie stratifiée, comparable celle observée *in vivo*.

La dernière étape consistera à implanter cet équivalent de peau comme greffe sur des rats ou des souris athymiques, pour vérifier la vascularisation et l'intégration de l'implant. Ce matériau devrait pouvoir être utilisé comme équivalent de peau humaine en remplacement des cultures d'épiderme autologues existants (Epicel®) pour les grands brûlés, et ce point sera préalablement vérifié par l'utilisation d'un modèle de brûlure thermique mis au point par le CTSA et la société Celogos.

Cependant, les applications potentielles de ce produit ne se limitent pas à celles qui viennent d'être présentées. Un matériau à base de fibrine peut être utilisé pour la régénération de nombreux tissus ou organes, et les hydrogels développés au cours de cette thèse présentent une grande gamme de modules viscoélastiques (de 300 à 15 000 Pa). Leur utilisation au contact de différents types cellulaires peut donc être raisonnablement envisagée.

De plus, l'albumine, qui est un des constituants du coréseau, est connue pour sa capacité de liaison de principes actifs, et le relargage contrôlé de ces derniers. Les RIP POE-BSA/Fb pourraient donc servir de matrices pour la libération contrôlée de différentes molécules thérapeutiques. Ces matériaux étant biodégradables, la cinétique de dégradation, donc de relargage, peut également être modifiée en fonction de la concentration en POE dans le matériau.

Au sein du laboratoire ERRMECe, et en partenariat avec la société Celogos, un doctorant, Mathieu Goczkowski, continue l'étude de RIP POE-BSA/Fb, pour des applications en médecine régénérative via la dégradation contrôlée de ces matériaux.

Références bibliographiques

1. Couch, N. P. *et al.* Transplantation of cadaver kidneys: Experience with 21 cases. *Surgery* **59**, 183–188 (1964).
2. Biomédecine, A. de la. *Rapport annuel 2014 Biomedecine*. (2014).
3. Langer, R. & Vacanti, J. P. Tissue Engineering. *Science (80-.)*. **260**, 920–926 (1993).
4. Akpalo, E. Création de nouveaux biomatériaux Réseaux interpénétrés de Polymères Réseau POE-Réseau Fibrine. (Université de Cergy-Pontoise, 2008).
5. Bidault, L. D'un matériau innovant vers un pansement actif et un substitut cutané. (Université de Cergy-Pontoise, 2012).
6. Kaur, J. & Reinhardt, D. P. *Extracellular Matrix (ECM) Molecules*. *Stem Cell Biology and Tissue Engineering in Dental Sciences* (Elsevier Inc., 2014). doi:10.1016/B978-0-12-397157-9.00003-5
7. Waldeck, H. M. & Kao, W. J. *Extracellular Matrix : Inspired Biomaterials*. *Comprehensive Biomaterials* (Elsevier Ltd., 2011). doi:10.1016/B978-0-08-055294-1.00065-9
8. Schoen, F. J. *et al.* Chapter II.1.5 - Tissues, the Extracellular Matrix, and Cell–Biomaterial Interactions. *Biomaterials Science (Third Edition)* (Elsevier, 2013). doi:http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-08-087780-8.00039-5
9. Badylak, S. F. Regenerative medicine and developmental biology: The role of the extracellular matrix. *Anat. Rec. - Part B New Anat.* **287**, 36–41 (2005).
10. Kumar, V., Abbas, A. K., Fausto, N. & Aster, J. *Robbins and Coltrun Pathologic Basis of Disease*. (2010).
11. Hynes, R. O. The Extracellular Matrix: Not Just Pretty Fibrils. *Science (80-.)*. **326**, 1216–1219 (2009).
12. Sicari, B. M., Londono, R. & Badylak, S. F. *Extracellular Matrix as a Bioscaffold for Tissue Engineering*. *Tissue Engineering* (Elsevier Inc., 2014). doi:10.1016/B978-0-12-420145-3.00005-5
13. Ruoslahti, E. & Pierschbacher, M. D. New perspectives in cell adhesion: RGD and integrins. *Science* **238**, 491–497 (1987).
14. Kim, S. H., Turnbull, J. & Guimond, S. Extracellular matrix and cell signalling: The dynamic cooperation

- of integrin, proteoglycan and growth factor receptor. *J. Endocrinol.* **209**, 139–151 (2011).
15. El-Sherbiny, I. & Yacoub, M. Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2013**, 316–42 (2013).
 16. Yamauchi, A. in *Gels Handbook* 4–12 (Elsevier, 2001). doi:10.1016/B978-012394690-4/50075-X
 17. Almdal, K., Dyre, J., Hvidt, S. & Kramer, O. Towards a phenomenological definition of the term ‘gel’. *Polym. Gels Networks* **1**, 5–17 (1993).
 18. Kavanagh, G. M. & Ross-Murphy, S. B. Rheological characterization of polymer gels. *Prog. Polym. Sci.* **23**, 533–562 (1998).
 19. Papon, P. & Meijer, P. H. E. *The Physics of Phase Transitions*. (2006). doi:10.1007/3-540-33390-8
 20. Buwalda, S. J. *et al.* Hydrogels in a historical perspective: From simple networks to smart materials. *J. Control. Release* **190**, 254–273 (2014).
 21. Wichterle, O. & Lim, D. Hydrophilic Gels for Biological Use. *Nature* **185**, 117–118 (1960).
 22. Patel, A. & Mequanint, K. Hydrogel Biomaterials. (2009).
 23. Hoffman, A. S. Hydrogels for biomedical applications. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 3–12 (2002).
 24. Van Vlierberghe, S., Dubruel, P. & Schacht, E. Biopolymer-based hydrogels as scaffolds for tissue engineering applications: a review. *Biomacromolecules* **12**, 1387–1408 (2011).
 25. Yu, Y. B. Coiled-coils: stability, specificity, and drug delivery potential. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **54**, 1113–1129 (2002).
 26. Yang, J., Xu, C., Wang, C. & Kopeček, J. Refolding hydrogels self-assembled from N-(2-hydroxypropyl)methacrylamide graft copolymers by antiparallel coiled-coil formation. *Biomacromolecules* **7**, 1187–1195 (2006).
 27. Pakstis, L. M. *et al.* Effect of chemistry and morphology on the biofunctionality of self-assembling diblock copolypeptide hydrogels. *Biomacromolecules* **5**, 312–318 (2004).
 28. Hoffman, A. S. ‘intelligent’ polymers in medicine and biotechnology. *Macromol. Symp.* **98**, 645–664 (1995).
 29. Ruel-Gariépy, E. & Leroux, J. C. In situ-forming hydrogels - Review of temperature-sensitive systems. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **58**, 409–426 (2004).

30. De Jong, S. J. *et al.* Novel self-assembled hydrogels by stereocomplex formation in aqueous solution of enantiomeric lactic acid oligomers grafted to dextran. *Macromolecules* **33**, 3680–3686 (2000).
31. Hiemstra, C., Zhou, W., Zhong, Z., Wouters, M. & Feijen, J. Rapidly in situ forming biodegradable robust hydrogels by combining stereocomplexation and photopolymerization. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 9918–9926 (2007).
32. Maia, J., Ferreira, L., Carvalho, R., Ramos, M. A. & Gil, M. H. Synthesis and characterization of new injectable and degradable dextran-based hydrogels. *Polymer* **46**, 9604–9614 (2005).
33. Bulpitt, P. & Aeschlimann, D. New strategy for chemical modification of hyaluronic acid: Preparation of functionalized derivatives and their use in the formation of novel biocompatible hydrogels. *J. Biomed. Mater. Res.* **47**, 152–169 (1999).
34. Jin, R. & Dijkstra, P. J. in *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook c*, 203–225 (Springer New York, 2010).
35. Salinas, C. N., Cole, B. B., Kasko, A. M. & Anseth, K. S. Chondrogenic Differentiation Potential of Human Mesenchymal Stem Cells Photoencapsulated within Poly(Ethylene Glycol)–Arginine-Glycine-Aspartic Acid-Serine Thiol-Methacrylate Mixed-Mode Networks. *Tissue Eng.* **13**, 1025–1034 (2007).
36. Vanderhooft, J. L., Mann, B. K. & Prestwich, G. D. Synthesis and characterization of novel thiol-reactive poly(ethylene glycol) cross-linkers for extracellular-matrix-mimetic biomaterials. *Biomacromolecules* **8**, 2883–2889 (2007).
37. Tortora, M. *et al.* Michael-Type Addition Reactions for the In Situ Formation of Poly (vinyl alcohol) - Based Hydrogels. *Polymer*. 209–214 (2007).
38. Wathier, M., Jung, P. J., Carnahan, M. a, Kim, T. & Grinstaff, M. W. Dendritic macromers as in situ polymerizing biomaterials for securing cataract incisions. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 12744–12745 (2004).
39. Wathier, M., Johnson, C. S., Kim, T. & Grinstaff, M. W. Hydrogels formed by multiple peptide ligation reactions to fasten corneal transplants. *Bioconjug. Chem.* **17**, 873–876 (2006).
40. Rostovtsev, V. V., Green, L. G., Fokin, V. V. & Sharpless, K. B. A stepwise huisgen cycloaddition process: Copper(I)-catalyzed regioselective ‘ligation’ of azides and terminal alkynes. *Angew. Chemie - Int. Ed.* **41**, 2596–2599 (2002).
41. Jiang, Y., Chen, J., Deng, C., Suuronen, E. J. & Zhong, Z. Click hydrogels, microgels and nanogels: Emerging platforms for drug delivery and tissue engineering. *Biomaterials* **35**, 4969–4985 (2014).

42. Speers, A. E. & Cravatt, B. F. Profiling Enzyme Activities In Vivo Using Click Chemistry Methods. *Chem. Biol.* **11**, 535–546 (2004).
43. Lorand, L. & Graham, R. M. Transglutaminases: crosslinking enzymes with pleiotropic functions. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **4**, 140–156 (2003).
44. Sperinde, J. J. & Griffith, L. G. Synthesis and Characterization of Enzymically-Crosslinked Poly(ethylene glycol) Hydrogels. *Macromolecules* **30**, 5255–5264 (1997).
45. Hale, M. K. M. C., Setton, L. a, D, P. & Chilkoti, A. Cartilaginous Tissue Repair. *Tissue Eng.* **11**, 1768–1779 (2005).
46. Akpalo, E. & Larreta-Garde, V. Increase of fibrin gel elasticity by enzymes: A kinetic approach. *Acta Biomater.* **6**, 396–402 (2010).
47. Jin, R. & Dijkstra, P. J. in *Biomedical Applications of Hydrogels Handbook* 203–225 (Springer New York, 2010). doi:10.1007/978-1-4419-5919-5_11
48. Jin, R., Hiemstra, C., Zhong, Z. & Feijen, J. Enzyme-mediated fast in situ formation of hydrogels from dextran-tyramine conjugates. *Biomaterials* **28**, 2791–2800 (2007).
49. Sakai, S. & Kawakami, K. Synthesis and characterization of both ionically and enzymatically cross-linkable alginate. *Acta Biomater.* **3**, 495–501 (2007).
50. Ogushi, Y., Sakai, S. & Kawakami, K. Synthesis of enzymatically-gellable carboxymethylcellulose for biomedical applications. *J. Biosci. Bioeng.* **104**, 30–33 (2007).
51. Ifkovits, J. L. & Burdick, J. Review: photopolymerizable and degradable biomaterials for tissue engineering applications. *Tissue Eng.* **13**, 2369–2385 (2007).
52. Nguyen, K. T. & West, J. L. Photopolymerizable hydrogels for tissue engineering applications. *Biomaterials* **23**, 4307–4314 (2002).
53. Hill-West, J. L., Chowdhury, S. M., Dunn, R. C. & Hubbell, J. A. Efficacy of a resorbable hydrogel barrier, oxidized regenerated cellulose, and hyaluronic acid in the prevention of ovarian adhesions in a rabbit model.pdf. *Fertil. Steril.* **62**, 630–634 (1994).
54. West, J. L. & Hubbell, J. A. Separation of the arterial wall from blood contact using hydrogel barriers reduces intimal thickening after balloon injury in the rat: The roles of medial and luminal factors in arterial healing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 13188–13193 (1996).

-
55. Elisseeff, J. *et al.* Transdermal photopolymerization for minimally invasive implantation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **96**, 3104–3107 (1999).
 56. Bryant, S. J., Bender, R. J., Durand, K. L. & Anseth, K. S. Encapsulating chondrocytes in degrading PEG hydrogels with high modulus: Engineering gel structural changes to facilitate cartilaginous tissue production. *Biotechnol. Bioeng.* **86**, 747–755 (2004).
 57. Łukaszczuk, J. *et al.* Evaluation of oligo(ethylene glycol) dimethacrylates effects on the properties of new biodegradable bone cement compositions. *Macromol. Biosci.* **5**, 64–69 (2005).
 58. Williams, C. G., Malik, A. N., Kim, T. K., Manson, P. N. & Elisseeff, J. H. Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation. *Biomaterials* **26**, 1211–1218 (2005).
 59. Mironi-Harpaz, I., Wang, D. Y., Venkatraman, S. & Seliktar, D. Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity. *Acta Biomater.* **8**, 1838–1848 (2012).
 60. Mann, B. K., Gobin, A. S., Tsai, A. T., Schmedlen, R. H. & West, J. L. Smooth muscle cell growth in photopolymerized hydrogels with cell adhesive and proteolytically degradable domains: Synthetic ECM analogs for tissue engineering. *Biomaterials* **22**, 3045–3051 (2001).
 61. Hong, Y. *et al.* Covalently crosslinked chitosan hydrogel: Properties of in vitro degradation and chondrocyte encapsulation. *Acta Biomater.* **3**, 23–31 (2007).
 62. Hong, Y., Mao, Z., Wang, H., Gao, C. & Shen, J. Covalently crosslinked chitosan hydrogel formed at neutral pH and body temperature. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **79**, 913–922 (2006).
 63. Williams, D. F. *The Williams Dictionary of Biomaterials*. (Liverpool University Press, 2011). doi:10.5949/UPO9781846314438
 64. Liu, V. A. & Bhatia, S. N. Three-dimensional photopatterning of hydrogels containing living cells. *Biomed. Microdevices* **4**, 257–266 (2002).
 65. Lowe, A. B. Thiol-ene ‘click’ reactions and recent applications in polymer and materials synthesis. *Polym. Chem.* **1**, 17–36 (2010).
 66. Slaughter, B. V. & Shahana S. Khurshid, Omar Z. Fisher, Ali Khademhosseini, N. A. P. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Adv. Mater.* **21**, 3307–3329 (2009).
 67. Anderson, J. M. *Biocompatibility and the Relationship to Standards: Meaning and Scope of*
-

- Biomaterials Testing. Comprehensive Biomaterials 4*, (Elsevier Ltd., 2011).
68. Laschke, M. W. & Menger, M. D. Prevascularization in tissue engineering: Current concepts and future directions. *Biotechnol. Adv.* **34**, 112–121 (2015).
 69. Kharkar, P. M., Kiick, K. L. & Kloxin, A. M. Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments. *Chem. Soc. Rev.* **42**, 7335–72 (2013).
 70. Coury, A. J. *et al.* in *Biomaterials Science* 243–281 (Elsevier, 1996). doi:10.1016/B978-0-08-050014-0.50011-0
 71. Lin, C.-C. & Anseth, K. S. *The Biodegradation of Biodegradable Polymeric Biomaterials. Biomaterials Science* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00061-9
 72. Bajaj, P., Schweller, R. M., Khademhosseini, A., West, J. L. & Bashir, R. 3D Biofabrication Strategies for Tissue Engineering and Regenerative Medicine. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **16**, 247–76 (2014).
 73. Fairbanks, B. D. *et al.* A versatile synthetic extracellular matrix mimic via thiol-norbornene photopolymerization. *Adv. Mater.* **21**, 5005–5010 (2009).
 74. Lutolf, M. P. *et al.* Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 5413–5418 (2003).
 75. West, J. L. & Hubbell, J. a. Polymeric Biomaterials with Degradation Sites for Proteases Involved in Cell Migration. *Macromolecules* **32**, 241–244 (1999).
 76. Seliktar, D., Zisch, A. H., Lutolf, M. P., Wrana, J. L. & Hubbell, J. A. MMP-2 sensitive, VEGF-bearing bioactive hydrogels for promotion of vascular healing. *J Biomed Mater Res A* **68**, 704–716 (2004).
 77. Xiao, W. *et al.* Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta Biomater.* **7**, 2384–2393 (2011).
 78. Martens, P. J., Bryant, S. J. & Anseth, K. S. Tailoring the degradation of hydrogels formed from multivinyl poly(ethylene glycol) and poly(vinyl alcohol) macromers for cartilage tissue engineering. *Biomacromolecules* **4**, 283–292 (2003).
 79. Suri, S. & Schmidt, C. E. Photopatterned collagen-hyaluronic acid interpenetrating polymer network hydrogels. *Acta Biomater.* **5**, 2385–2397 (2009).
 80. Zhang, Y., Heher, P., Hilborn, J., Redl, H. & Ossipov, D. A. Hyaluronic acid-fibrin interpenetrating double

network hydrogel prepared in situ by orthogonal disulfide cross-linking reaction for biomedical applications. *Acta Biomater.* (2016). doi:10.1016/j.actbio.2016.04.041

81. Gonen-Wadmany, M., Oss-Ronen, L. & Seliktar, D. Protein-polymer conjugates for forming photopolymerizable biomimetic hydrogels for tissue engineering. *Biomaterials* **28**, 3876–3886 (2007).
82. Dikovsky, D., Bianco-Peled, H. & Seliktar, D. The effect of structural alterations of PEG-fibrinogen hydrogel scaffolds on 3-D cellular morphology and cellular migration. *Biomaterials* **27**, 1496–1506 (2006).
83. Oss-Ronen, L. & Seliktar, D. Polymer-conjugated albumin and fibrinogen composite hydrogels as cell scaffolds designed for affinity-based drug delivery. *Acta Biomater.* **7**, 163–170 (2011).
84. Lin, C.-C. & Metters, A. in *Biomaterials* **28**, 5–1–5–44 (CRC Press, 2007).
85. Metters, T., Anseth, K. S. & Bowman, C. N. Fundamental studies of a novel, biodegradable PEG-b-PLA hydrogel. *Polymer* **41**, 3993–4004 (2000).
86. Anseth, K. S. *et al.* In situ forming degradable networks and their applications in tissue engineering and drug delivery. *J. Cont. Rel.* **78**, 199–209 (2002).
87. Meyvis, T. K. L., De Smedt, S. C., Demeester, J. & Hennink, W. E. Rheological monitoring of long-term degrading polymer hydrogels. *J. Rheol. (N. Y. N. Y.)* **43**, 933 (1999).
88. Park, Y. D., Tirelli, N. & Hubbell, J. A. Photopolymerized hyaluronic acid-based hydrogels and interpenetrating networks. *Biomaterials* **24**, 893–900 (2003).
89. Liu, J., Zheng, H., Poh, P., Machens, H.-G. & Schilling, A. Hydrogels for Engineering of Perfusable Vascular Networks. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 15997–16016 (2015).
90. Ratner, B. D. New ideas in biomaterials science--a path to engineered biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* **27**, 837–850 (1993).
91. Oyen, M. L. Mechanical characterisation of hydrogel materials. *Int. Mater. Rev.* **59**, 44–59 (2014).
92. Berrier, A. L. & Yamada, K. M. Cell–matrix adhesion. *J. Cell. Physiol.* **213**, 565–573 (2007).
93. Zhu, J. & Marchant, R. E. Design properties of hydrogel tissue-engineering scaffolds. *Expert Rev. Med. Devices* **8**, 607–26 (2011).
94. Hoare, T. R. & Kohane, D. S. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer* **49**, 1993–2007 (2008).

95. Kasper, K, Singh, M F. & Mikos, A. G. in *Biomaterials Science* 1138–1159 (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00110-8
96. Kramschuster, A. & Turng, L. *17 Fabrication of Tissue Engineering Scaffolds. Handbook of Biopolymers and Biodegradable Plastics: Properties, Processing and Applications* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-1-4557-2834-3.00017-3
97. Hill-West, J. L., Chowdhury, S. M., Slepian, M. J. & Hubbell, J. a. Inhibition of thrombosis and intimal thickening by in situ photopolymerization of thin hydrogel barriers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **91**, 5967–5971 (1994).
98. Davey, A. K. & Maher, P. J. Surgical adhesions: A timely update, a great challenge for the future. *J. Minim. Invasive Gynecol.* **14**, 15–22 (2007).
99. Sawhney, A. S., Pathak, C. P., van Rensburg, J. J., Dunn, R. C. & Hubbell, J. A. Optimization of photopolymerized bioerodible hydrogel properties for adhesion prevention. *J. Biomed. Mater. Res.* **28**, 831–838 (1994).
100. Peppas, N. A., Hilt, J. Z., Khademhosseini, A. & Langer, R. Hydrogels in biology and medicine: From molecular principles to bionanotechnology. *Adv. Mater.* **18**, 1345–1360 (2006).
101. Sundararaghavan, H. G. & Burdick, J. *Cell Encapsulation. Comprehensive Biomaterials* (Elsevier Ltd., 2011). doi:10.1016/B978-0-08-055294-1.00163-X
102. Osada, Y., Ping Gong, J. & Tanaka, Y. Polymer Gels. *J. Macromol. Sci. Part C Polym. Rev.* **44**, 87–112 (2004).
103. Compañ, V., Andrio, A., López-Aleman, A., Riande, E. & Refojo, M. F. Oxygen permeability of hydrogel contact lenses with organosilicon moieties. *Biomaterials* **23**, 2767–2772 (2002).
104. Pedley, D. G., Skelly, P. J. & Tighe, B. J. Hydrogels in Biomedical Applications. *Br. Polym. J.* **12**, 99–110 (1980).
105. Trichet, E. *et al.* La kératoprothèse Alphacor™ : dispositif, technique chirurgicale et résultats cliniques. *J. Fr. Ophtalmol.* **36**, 393–401 (2013).
106. Lu, S. & Anseth, K. S. Photopolymerization of multilaminated poly(HEMA) hydrogels for controlled release. *J. Control. Release* **57**, 291–300 (1999).
107. Murphy, S. M., Skelly, P. J. & Tighe, B. J. Synthetic Hydrogels. *Online* **2**, 1007–1013 (1992).

108. Drury, J. L. & Mooney, D. J. Hydrogels for tissue engineering: Scaffold design variables and applications. *Biomaterials* **24**, 4337–4351 (2003).
109. Schmedlen, R. H., Masters, K. S. & West, J. L. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering. *Biomaterials* **23**, 4325–4332 (2002).
110. Noguchi, T. *et al.* Poly(vinyl alcohol) hydrogel as an artificial articular cartilage: evaluation of biocompatibility. *J. Appl. Biomater.* **2**, 101–7 (1991).
111. Kobayashi, M., Chang, Y. S. & Oka, M. A two year in vivo study of polyvinyl alcohol-hydrogel (PVA-H) artificial meniscus. *Biomaterials* **26**, 3243–3248 (2005).
112. Harris, J. M. *Poly(ethylene glycol) chemistry Biotechnical and Biomedical Applications. J. Chem Inf and Mod* **53**, (1992).
113. Elisseff, J. *et al.* Photoencapsulation of chondrocytes in poly(ethylene oxide)-based semi-interpenetrating networks. *J. Biomed. Mater. Res.* **51**, 164–171 (2000).
114. Merrill, E. W.; Salzman, E. W.; Wan, S.; Mahmud, N.; Kushner, L.; Lindon, J. N.; Curme, J. Platelet compatible hydrophilic segmented polyurethanes from polyethylene glycols and cyclohexane diisocyanate. *Trans. - Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **28**, 482–487 (1982).
115. Gombotz, W. R., Wang, G. H., Horbett, T. & Hoffman, S. Protein adsorption to poly(ethylene oxide) surfaces. *J. Biomed. Mater. Res.* **25**, 1547–1562 (1991).
116. Ratner, B, Hoffman, A, Schoen, F. *Biomaterials science. Biomaterials Science - An Introduction to Materials in Medicine* (Elsevier, 2004).
117. Lensen, M. C., Schulte, V. a. & Diez, M. Cell Adhesion and Spreading on an Intrinsically Anti-Adhesive PEG Biomaterial. *InTech* 397 – 414 (2007). doi:10.5772/24273
118. Chaves, C. de A. L., de Souza Costa, C. A., Vergani, C. E., Chaves de Souza, P. P. & Machado, A. L. Effects of Soft Denture Liners on L929 Fibroblasts, HaCaT Keratinocytes, and RAW 264.7 Macrophages. *Biomed Res. Int.* **2014**, 1–14 (2014).
119. King, P. A. & Ward, J. A. Radiation chemistry of aqueous poly(ethylene oxide) solutions. I. *J. Polym. Sci. Part A-1 Polym. Chem.* **8**, 253–262 (1970).
120. Huh, K. M. & Bae, Y. H. Synthesis and characterization of poly (ethylene glycol)/ poly (l -lactic acid) alternating multiblock copolymers. *Polymer.* **40**, 6147–6155 (1999).

121. Alexandridis, P., Zhou, D. & Khan, A. Lyotropic Liquid Crystallinity in Amphiphilic Block Copolymers: Temperature Effects on Phase Behavior and Structure for Poly(ethylene oxide)- b -poly(propylene oxide)- b -poly(ethylene oxide) Copolymers of Different Composition. *Langmuir* **12**, 2690–2700 (1996).
122. Bryant, S. J. & Anseth, K. S. Controlling the spatial distribution of ECM components in degradable PEG hydrogels for tissue engineering cartilage. *J. Biomed. Mater. Res. A* **64**, 70–79 (2003).
123. Burdick, J. A. & Anseth, K. S. Photoencapsulation of osteoblasts in injectable RGD-modified PEG hydrogels for bone tissue engineering. *Biomaterials* **23**, 4315–4323 (2002).
124. Godges, J. *et al.* Get the Big Picture RAND Review covers the big issues with an.
125. Williams, C. G. *et al.* In Vitro Chondrogenesis of Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells in a Photopolymerizing Hydrogel. *Tissue Eng.* **9**, 679–688 (2003).
126. Hern, D. L. & Hubbell, J. A. Incorporation of adhesion peptides into nonadhesive hydrogels useful for tissue resurfacing. *J. Biomed. Mater. Res.* **39**, 266–276 (1998).
127. Massia, S. P. & Hubbell, J. A. An RGD Spacing of 440nm is Sufficient for Integrin Alpha-V-Beta-3-Mediated Fibroblast Spreading and 140nm for Focal Contact and Stress Fiber Formation. *J. Cell Biol.* **114**, 1089–1100 (1991).
128. Graham, N. B. in *Polymeric Biomaterials* 170–194 (Springer Netherlands, 1986). doi:10.1007/978-94-009-4390-2_11
129. Kaetsu, I., Kumakura, M., Fujimura, T., Kasai, N. & Tamada, M. Immobilization of microbial cell and yeast cell and its application to biomass conversion using radiation techniques. *Int. J. Radiat. Appl. Instrumentation. Part C. Radiat. Phys. Chem.* **29**, 191–193 (1987).
130. Tanaka, a, Yasuhara, S., Osumi, M. & Fukui, S. Immobilization of yeast microbodies by inclusion with photo-crosslinkable resins. *Eur. J. Biochem.* **80**, 193–7 (1977).
131. Zhang, Z. & Christopher, G. F. The nonlinear viscoelasticity of hyaluronic acid and its role in joint lubrication. *Soft Matter* **11**, 2596–2603 (2015).
132. Kirker, K. R., Luo, Y., Nielson, J. H., Shelby, J. & Prestwich, G. D. Glycosaminoglycan hydrogel films as bio-interactive dressings for wound healing. *Biomaterials* **23**, 3661–3671 (2002).
133. Duranti, F., Salti, G., Bovani, B., Calandra, M. & Rosati, M. L. Injectable Hyaluronic Acid Gel for Soft Tissue Augmentation. *Dermatologic Surg.* **24**, 1317–1325 (1998).

-
134. Pape, L. G. & Balazs, E. A. The Use of Sodium Hyaluronate (Healon®) in Human Anterior Segment Surgery. *Ophthalmology* **87**, 699–705 (1980).
135. Ioelovich, M. Crystallinity and Hydrophilicity of Chitin and Chitosan. *J. of Chem.* **3**, 7–14 (2014).
136. Suh, J. K. & Matthew, H. W. Application of chitosan-based polysaccharide biomaterials in cartilage tissue engineering: a review. *Biomaterials* **21**, 2589–2598 (2000).
137. Lee, K. Y. & Mooney, D. J. Hydrogels for Tissue Engineering. **101**, (2001).
138. Ha, T. L. B., Quan, T. M., Vu, D. N. & Si, D. M. Naturally Derived Biomaterials : Preparation and Application. *Regen. Med. Tissue Eng.* 247–274 (2013). doi:10.5772/55668
139. Prestwich, G. D. & Atzet, S. *Engineered Natural Materials. Biomaterials Science* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-08-087780-8.00022-X
140. Shoichet, M. S., Li, R. H., White, M. L. & Winn, S. R. Stability of hydrogels used in cell encapsulation: An in vitro comparison of alginate and agarose. *Biotechnol. Bioeng.* **50**, 374–381 (1996).
141. Gulrez, S. K. H., Al-Assaf, S. & Phillips, G. O. Hydrogels : Methods of Preparation , Characterisation and Applications. *Prog. Mol. Environ. Bioeng.* **51**, 117 – 150 (2003).
142. Uludag, H., De Vos, P. & Tresco, P. Technology of mammalian cell encapsulation. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **42**, 29–64 (2000).
143. Stevens, M. M., Qanadilo, H. F., Langer, R. & Shastri, V. P. A rapid-curing alginate gel system: Utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering. *Biomaterials* **25**, 887–894 (2004).
144. Suzuki, Y. *et al.* In vivo evaluation of a novel alginate dressing. *J. Biomed. Mater. Res.* **48**, 522–527 (1999).
145. Gorgieva, S. & Kokol, V. in *Biomaterials Applications for Nanomedicine* 1–36 (InTech, 2011). doi:10.5772/24118
146. Friess, W. Collagen – biomaterial for drug delivery. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **45**, 113–136 (1998).
147. Ma, L., Gao, C., Mao, Z., Zhou, J. & Shen, J. Enhanced biological stability of collagen porous scaffolds by using amino acids as novel cross-linking bridges. *Biomaterials* **25**, 2997–3004 (2004).
148. Achilli, M. & Mantovani, D. Tailoring mechanical properties of collagen-based scaffolds for vascular tissue engineering: The effects of pH, temperature and ionic strength on gelation. *Polymers (Basel)*. **2**, 664–680 (2010).
-

149. Ma, L. *et al.* Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering. *Biomaterials* **24**, 4833–4841 (2003).
150. Park, S. N., Park, J. C., Kim, H. O., Song, M. J. & Suh, H. Characterization of porous collagen/hyaluronic acid scaffold modified by 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide cross-linking. *Biomaterials* **23**, 1205–1212 (2002).
151. Rowe, S. L. & Stegemann, J. P. Interpenetrating collagen-fibrin composite matrices with varying protein contents and ratios. *Biomacromolecules* **7**, 2942–2948 (2006).
152. Seliktar, D., Black, R. A., Vito, R. P. & Nerem, R. M. Dynamic mechanical conditioning of collagen-gel blood vessel constructs induces remodeling in vitro. *Ann. Biomed. Eng.* **28**, 351–362 (2000).
153. Gorgieva, S. & Kokol, V. in *Biomaterials Applications for Nanomedicine* 1–36 (InTech, 2011). doi:10.5772/24118
154. Vlierberghe, S. Van, Dubruel, P. & Schacht, E. Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue Engineering Applications : A Review. 1387–1408 (2011).
155. Ahmed, T. a E., Dare, E. V & Hincke, M. Fibrin: a versatile scaffold for tissue engineering applications. *Tissue Eng. Part B. Rev.* **14**, 199–215 (2008).
156. Wolberg, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure. *Blood Rev.* **21**, 131–142 (2007).
157. Berg, J., Tymoczko, J. & Stryer, L. *Biochemistry*. 1050 (2002).
158. Herrick, S., Blanc-Brude, O., Gray, A. & Laurent, G. Fibrinogen. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **31**, 741–746 (1999).
159. Mosesson, M. W., Siebenlist, K. R. & Meh, D. A. The Structure and Biological Features of Fibrinogen and Fibrin. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **936**, 11–30 (2006).
160. Sousa, R, Mano, J. F. & Reis, R. L. *Polymers of Biological Origin. Comprehensive Biomaterials* (Elsevier Ltd., 2011). doi:10.1016/B978-0-08-055294-1.00069-6
161. Shaikh, F. M. *et al.* Fibrin: A natural biodegradable scaffold in vascular tissue engineering. *Cells Tissues Organs* **188**, 333–346 (2008).
162. Ronfard, V. *et al.* Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds. *Burns* **17**, 181–184 (1991).
163. Ryan, E, Mockros, L. F., Weisel, J. W. & Lorand, L. Structural origins of fibrin clot rheology. *Biophys. J.*

- 77**, 2813–2826 (1999).
164. Collet, J.-P., Shuman, H., Ledger, R. E., Lee, S. & Weisel, J. W. The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **102**, 9133–9137 (2005).
165. Eyrich, D. *et al.* In Vitro and In Vivo Cartilage Engineering Using a Combination of Chondrocyte-Seeded Long-Term Stable Fibrin Gels and Polycaprolactone-Based Polyurethane Scaffolds. *Tissue Eng.* **13**, 2207–2218 (2007).
166. Lee, C. R. *et al.* Fibrin–Polyurethane Composites for Articular Cartilage Tissue Engineering: A Preliminary Analysis. **11**, 1562–1573 (2005).
167. Almany, L. & Seliktar, D. Biosynthetic hydrogel scaffolds made from fibrinogen and polyethylene glycol for 3D cell cultures. *Biomaterials* **26**, 2467–2477 (2005).
168. Peled, E., Boss, J., Bejar, J., Zinman, C. & Seliktar, D. A novel poly(ethylene glycol)-fibrinogen hydrogel for tibial segmental defect repair in a rat model. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **80**, 874–884 (2007).
169. Sudhakar, C. K. *et al.* *Hydrogels-Promising Candidates for Tissue Engineering. Nanotechnology Applications for Tissue Engineering* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-323-32889-0.00005-4
170. Sudhakar, C. K. *et al.* *Hydrogels-Promising Candidates for Tissue Engineering. Nanotechnology Applications for Tissue Engineering* (Elsevier Inc., 2015). doi:10.1016/B978-0-323-32889-0.00005-4
171. Klimov, M., Leavitt, T., Molnar, J. & Orgill, D. *Natural Biomaterials for Skin Tissue Engineering. Skin Tissue Engineering and Regenerative Medicine* **1**, (Elsevier Inc., 2016).
172. Jockenhoevel, S. *et al.* Fibrin gel - advantages of a new scaffold in cardiovascular tissue engineering. *Eur. J. Cardio-thoracic Surg.* **19**, 424–430 (2001).
173. Seliktar, D. Extracellular stimulation in tissue engineering. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1047**, 386–394 (2005).
174. Scheraga, H. A. The thrombin-fibrinogen interaction. *Biophys. Chem.* **112**, 117–130 (2004).
175. Peppas, N. A., Slaughter, B. V. & Kanzelberger, M. A. Hydrogels. *Polym. Sci. A Compr. Ref. 10 Vol. Set* **9**, 385–395 (2012).
176. Fuoco, C. *et al.* Injectable polyethylene glycol-fibrinogen hydrogel adjuvant improves survival and differentiation of transplanted mesoangioblasts in acute and chronic skeletal-muscle degeneration. *Skelet. Muscle* **2**, 24 (2012).
177. Frisman, I., Seliktar, D. & Bianco-Peled, H. Nanostructuring of PEG-fibrinogen polymeric scaffolds. *Acta*

- Biomater.* **6**, 2518–2524 (2010).
178. Oss-Ronen, L. & Seliktar, D. Photopolymerizable hydrogels made from polymer-conjugated albumin for affinity-based drug delivery. *Adv. Eng. Mater.* **12**, 45–52 (2010).
179. Kragh-Hansen, U., Chuang, V. T. G. & Otagiri, M. Practical aspects of the ligand-binding and enzymatic properties of human serum albumin. *Biol. Pharm. Bull.* **25**, 695–704 (2002).
180. Carter, D. C. *et al.* Three-Dimensional Structure of Human Serum Albumin. *Science (80-.)*. **244**, 1195–1198 (1989).
181. Baler, K., Michael, R., Szeifer, I. & Ameer, G. A. Albumin hydrogels formed by electrostatically triggered self-assembly and their drug delivery capability. *Biomacromolecules* **15**, 3625–3633 (2014).
182. Hirose, M., Tachibana, A. & Tanabe, T. Recombinant human serum albumin hydrogel as a novel drug delivery vehicle. *Mater. Sci. Eng. C* **30**, 664–669 (2010).
183. Sun, Y. & Huang, Y. Disulfide-crosslinked albumin hydrogels. *J. Mater. Chem. B* **4**, 2768–2775 (2016).
184. Langer, K. *et al.* Crystallographic analysis reveals common modes of binding of medium and long-chain fatty acids to human serum albumin. *Eur. J. Biochem.* **257**, 391–397 (2003).
185. D’urso, E. M., Jean-François, J., Doillon, C. J. & Fortier, G. Poly(ethylene glycol)- Serum Albumin Hydrogel as matrix for enzyme immobilization : biomedical applications. **23**, 587–595 (1995).
186. D’urso, E. M. & Fortier, G. New Hydrogel Based With on Polyethylene Bovine Serum Albumin. *Biotechnol. Tech.* **8**, 71–76 (1994).
187. Lee, S. H., Moon, J. J., Miller, J. S. & West, J. L. Poly(ethylene glycol) hydrogels conjugated with a collagenase-sensitive fluorogenic substrate to visualize collagenase activity during three-dimensional cell migration. *Biomaterials* **28**, 3163–3170 (2007).
188. Ehrbar, M. *et al.* Biomolecular hydrogels formed and degraded via site-specific enzymatic reactions. *Biomacromolecules* **8**, 3000–3007 (2007).
189. Bott, K. *et al.* The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels. *Biomaterials* **31**, 8454–8464 (2010).
190. Vigen, M., Ceccarelli, J. & Putnam, A. J. Protease-sensitive PEG hydrogels regulate vascularization in vitro and in vivo. *Macromol. Biosci.* **14**, 1368–1379 (2014).
191. Phelps, E. A., Headen, D. M., Taylor, W. R., Thulé, P. M. & García, A. J. Vasculogenic bio-synthetic

- hydrogel for enhancement of pancreatic islet engraftment and function in type 1 diabetes. *Biomaterials* **34**, 4602–4611 (2013).
192. Shekaran, A. *et al.* Bone regeneration using an alpha 2 beta 1 integrin-specific hydrogel as a BMP-2 delivery vehicle. *Biomaterials* **35**, 5453–5461 (2014).
193. Sperling, L. H. Interpenetrating Polymer Networks : An Overview. *Mater. Sci.* 3–38 (1994). doi:10.1021/ba-1994-0239
194. Jenkins, A. D., Kratochvíl, P., Stepto, R. F. T. & Suter, U. W. Glossary of basic terms in polymer science (IUPAC Recommendations 1996). *Pure Appl. Chem.* **68**, (1996).
195. Dragan, E. S. Design and applications of interpenetrating polymer network hydrogels. A review. *Chem. Eng. J.* **243**, 572–590 (2014).
196. Skaalure, S. C., Dimson, S. O., Pennington, A. M. & Bryant, S. J. Semi-interpenetrating networks of hyaluronic acid in degradable PEG hydrogels for cartilage tissue engineering. *Acta Biomater.* **10**, 3409–3420 (2014).
197. Lee, H., Sen, A., Bae, S., Lee, J. S. & Webb, K. Poly(ethylene glycol) diacrylate/hyaluronic acid semi-interpenetrating network compositions for 3-D cell spreading and migration. *Acta Biomater.* **14**, 43–52 (2015).
198. Kutty, J. K., Cho, E., Soo Lee, J., Vyavahare, N. R. & Webb, K. The effect of hyaluronic acid incorporation on fibroblast spreading and proliferation within PEG-diacrylate based semi-interpenetrating networks. *Biomaterials* **28**, 4928–4938 (2007).
199. Lee, H. J., Sen, A., Bae, S., Lee, J. S. & Webb, K. Poly(ethylene glycol) diacrylate/hyaluronic acid semi-interpenetrating network compositions for 3-D cell spreading and migration. *Acta Biomater.* **14**, 43–52 (2015).
200. Khoshakhlagh, P. & Moore, M. J. Photoreactive interpenetrating network of hyaluronic acid and Puramatrix as a selectively tunable scaffold for neurite growth. *Acta Biomater.* **16**, 23–34 (2015).
201. Cui, N. *et al.* Preparation, characterization, and biocompatibility evaluation of poly(Nε-acryloyl-L-lysine)/hyaluronic acid interpenetrating network hydrogels. *Carbohydr. Polym.* **136**, 1017–1026 (2016).
202. Kheirabadi, M. *et al.* In situ forming interpenetrating hydrogels of hyaluronic acid hybridized with iron oxide nanoparticles. *Biomater. Sci.* **3**, 1466–1474 (2015).

203. Nistor, M. T., Chiriac, A. P., Nita, L. E. & Vasile, C. Characterization of the semi-interpenetrated network based on collagen and poly(N-isopropyl acrylamide-co-diethylene glycol diacrylate). *Int. J. Pharm.* **452**, 92–101 (2013).
204. Madaghiele, M. *et al.* Development of semi- and grafted interpenetrating polymer networks based on poly(ethylene glycol) diacrylate and collagen. *J. Appl. Biomater. Funct. Mater.* **12**, 183–92 (2014).
205. Munoz-Pinto, D. J., Jimenez-Vergara, A. C., Gharat, T. P. & Hahn, M. S. Characterization of sequential collagen-poly(ethylene glycol) diacrylate interpenetrating networks and initial assessment of their potential for vascular tissue engineering. *Biomaterials* **40**, 32–42 (2015).
206. Branco da Cunha, C. *et al.* Influence of the stiffness of three-dimensional alginate/collagen-I interpenetrating networks on fibroblast biology. *Biomaterials* **35**, 8927–8936 (2014).
207. Hu, X., Lu, L., Xu, C. & Li, X. Mechanically tough biomacromolecular IPN hydrogel fibers by enzymatic and ionic crosslinking. *Int. J. Biol. Macromol.* **72**, 403–409 (2015).
208. Dinescu, S. *et al.* A 3D Porous Gelatin-Alginate-Based-IPN Acts as an Efficient Promoter of Chondrogenesis from Human Adipose-Derived Stem Cells. *Stem Cells Int.* **2015**, 252909 (2015).
209. Daniele, M. A., Adams, A. A., Naciri, J., North, S. H. & Ligler, F. S. Interpenetrating networks based on gelatin methacrylamide and PEG formed using concurrent thiol click chemistries for hydrogel tissue engineering scaffolds. *Biomaterials* **35**, 1845–1856 (2014).
210. Shikanov, A., Xu, M., Woodruff, T. K. & Shea, L. D. Interpenetrating fibrin-alginate matrices for in vitro ovarian follicle development. *Biomaterials* **30**, 5476–5485 (2009).
211. Zhou, H., Malik, M. A., Arab, A., Hill, M. T. & Shikanov, A. Hydrogel Based 3-Dimensional (3D) System for Toxicity and High-Throughput (HTP) Analysis for Cultured Murine Ovarian Follicles. *PLoS One* **10**, 0140205 (2015).
212. Lee, F. & Kurisawa, M. Formation and stability of interpenetrating polymer network hydrogels consisting of fibrin and hyaluronic acid for tissue engineering. *Acta Biomater.* **9**, 5143–5152 (2013).
213. Akpalo, E. *et al.* Fibrin-polyethylene oxide interpenetrating polymer networks: New self-supported biomaterials combining the properties of both protein gel and synthetic polymer. *Acta Biomater.* **7**, 2418–2427 (2011).
214. Bidault, L., Deneufchatel, M., Vancaeyzeele, C., Fichet, O. & Larreta-Garde, V. Self-Supported Fibrin-Polyvinyl Alcohol Interpenetrating Polymer Networks: An Easily Handled and Rehydratable

- Biomaterial. *Biomacromolecules* (2013). doi:10.1021/bm400991k
215. Bidault, L. *et al.* Fibrin-based interpenetrating polymer network biomaterials with tunable biodegradability. *Polymer* **62**, 19–27 (2015).
216. Mori, H. & Hara, M. Clusters of neural stem/progenitor cells cultured on a soft poly(vinyl alcohol) hydrogel crosslinked by gamma irradiation. *J. Biosci. Bioeng.* **121**, 584–590 (2016).
217. Higuchi, A., Ling, Q. D., Hsu, S. T. & Umezawa, A. Biomimetic cell culture proteins as extracellular matrices for stem cell differentiation. *Chem. Rev.* **112**, 4507–4540 (2012).
218. Wu, L. & Ding, J. Effects of porosity and pore size on in vitro degradation of three-dimensional porous poly(D,L-lactide-co-glycolide) scaffolds for tissue engineering. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **75**, 767–777 (2005).
219. Sarig-Nadir, O. & Seliktar, D. The role of matrix metalloproteinases in regulating neuronal and nonneuronal cell invasion into PEGylated fibrinogen hydrogels. *Biomaterials* **31**, 6411–6416 (2010).
220. Dikovsky, D., Bianco-Peled, H. & Seliktar, D. Defining the role of matrix compliance and proteolysis in three-dimensional cell spreading and remodeling. *Biophys. J.* **94**, 2914–2925 (2008).
221. Rouillard, A. D. *et al.* Methods for photocrosslinking alginate hydrogel scaffolds with high cell viability. *Tissue Eng. Part C. Methods* **17**, 173–179 (2011).
222. Chen, R. & Doolittle, R. F. Isolation, Characterization, and Location of a Donor-Acceptor Unit from Cross-Linked Fibrin. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **66**, 472–479 (1970).
223. Martens, P. & Anseth, K. . Characterization of hydrogels formed from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers. *Polymer.* **41**, 7715–7722 (2000).
224. Martinez, A. W., Caves, J. M., Ravi, S., Li, W. & Chaikof, E. L. Effects of crosslinking on the mechanical properties, drug release and cytocompatibility of protein polymers. *Acta Biomater.* **10**, 26–33 (2014).
225. Kundu, J., Poole-Warren, L. A., Martens, P. & Kundu, S. C. Silk fibroin/poly(vinyl alcohol) photocrosslinked hydrogels for delivery of macromolecular drugs. *Acta Biomater.* **8**, 1720–1729 (2012).
226. Nuttelman, C. R., Henry, S. M. & Anseth, K. S. Synthesis and characterization of photocrosslinkable , degradable poly (vinyl alcohol) -based tissue engineering scaffolds. **23**, 3617–3626 (2002).
227. Kurniawan, N. A., Chaudhuri, P. K. & Lim, C. T. Mechanobiology of cell migration in the context of

- dynamic two-way cell-matrix interactions. *J. Biomech.* **49**, 1355–1368 (2016).
228. Plotnikov, S. V. & Waterman, C. M. Guiding cell migration by tugging. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 619–626 (2013).
229. Lange, J. R. & Fabry, B. Cell and tissue mechanics in cell migration. *Exp. Cell Res.* **319**, 2418–2423 (2013).
230. Roca-Cusachs, P., Sunyer, R. & Trepats, X. Mechanical guidance of cell migration: Lessons from chemotaxis. *Curr. Opin. Cell Biol.* **25**, 543–549 (2013).
231. Huang, G. *et al.* Engineering three-dimensional cell mechanical microenvironment with hydrogels. *Biofabrication* **4**, 042001 (2012).
232. Burnouf, T. *et al.* Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev.* **27**, 77–89 (2013).
233. Liu, S. Q., Rachel Ee, P. L., Ke, C. Y., Hedrick, J. L. & Yang, Y. Y. Biodegradable poly(ethylene glycol)-peptide hydrogels with well-defined structure and properties for cell delivery. *Biomaterials* **30**, 1453–1461 (2009).
234. Henke, M., Tessmar, J. & Göpferich, A. *Biomimetic Polymers (for Biomedical Applications)*. *Polymer Science: A Comprehensive Reference* **9**, (Elsevier B.V., 2012).
235. Thasneem, Y. M. & Sharma, C. P. *In Vitro Characterization of Cell-Biomaterials Interactions*. *Characterization of Biomaterials* (Elsevier, 2013). doi:10.1016/B978-0-12-415800-9.00005-X
236. Sanborn, T. J., Messersmith, P. B. & Barron, A. E. In situ crosslinking of a biomimetic peptide-PEG hydrogel via thermally triggered activation of factor XIII. *Biomaterials* **23**, 2703–2710 (2002).
237. Abbate, V., Kong, X. & Bansal, S. S. Photocrosslinked bovine serum albumin hydrogels with partial retention of esterase activity. *Enzyme Microb. Technol.* **50**, 130–136 (2012).
238. Guvendiren, M., Purcell, B. & Burdick, J. A. *Photopolymerizable Systems*. *Polymer Science: A Comprehensive Reference, 10 Volume Set* **9**, (Elsevier B.V., 2012).
239. Yoshii, E. Cytotoxic effects of acrylates and methacrylates: relationships of monomer structures and cytotoxicity. *J. Biomed. Mater. Res.* **37**, 517–24 (1997).
240. Sabnis, A., Rahimi, M., Chapman, C. & Nguyen, K. T. Cytocompatibility studies of an in situ photopolymerized thermoresponsive hydrogel nanoparticle system using human aortic smooth

- muscle cells. *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **91**, 52–59 (2009).
241. Chien, H. W., Tsai, W. B. & Jiang, S. Direct cell encapsulation in biodegradable and functionalizable carboxybetaine hydrogels. *Biomaterials* **33**, 5706–5712 (2012).
242. Costerton, J. W., Geesey, G. G. & Cheng, K. J. How bacteria stick. *Sci. Am.* **238**, 86–95 (1978).
243. Flemming, H. & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 623–33 (2010).
244. Monroe, D. Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS Biol.* **5**, 2458–2461 (2007).
245. Ceri, H., Olson, M. E. & Turner, R. J. Needed, new paradigms in antibiotic development. *Expert Opin. Pharmacother.* **11**, 1233–7 (2010).
246. Madigan, M. & Martinko, J. *Brock ; Biologie des micro-organismes*. (Pearson Education, 2007).
247. Aminabhavi, T. M. *et al.* Controlled release of therapeutics using interpenetrating polymeric networks. *Expert Opin. Drug Deliv.* **12**, 669–688 (2014).
248. Ng, V. W. L. *et al.* Antimicrobial hydrogels: A new weapon in the arsenal against multidrug-resistant infections. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **78**, 46–62 (2014).
249. Jain, A. *et al.* Antimicrobial Polymers. *Adv. Healthc. Mater.* **3**, 1969–1985 (2014).
250. Boonkaew, B. *et al.* Development and Characterization of a Novel, Antimicrobial, Sterile Hydrogel Dressing for Burn Wounds: Single-Step Production with Gamma Irradiation Creates Silver Nanoparticles and Radical Polymerization. *J. Pharm. Sci.* 3244–3253 (2014). doi:10.1002/jps.24095
251. Palza, H. *et al.* Toward tailor-made biocide materials based on poly(propylene)/copper nanoparticles. *Macromol. Rapid Commun.* **31**, 563–567 (2010).
252. Wu, F., Wang, J., Pu, C., Qiao, L. & Jiang, C. Wilson’s disease: A comprehensive review of the molecular mechanisms. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 6419–6431 (2015).
253. Marcos, J. F. & Manzanares, P. in *Antimicrobial Polymers* **52**, 195–225 (John Wiley & Sons, Inc., 2011).
254. Tew, G. N. *et al.* De novo design of biomimetic antimicrobial polymers. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **99**, 5110–5114 (2002).
255. Alves, D. & Olívia Pereira, M. Mini-review: Antimicrobial peptides and enzymes as promising candidates to functionalize biomaterial surfaces. *Biofouling* **30**, 483–99 (2014).
256. Mitchell, B. a, Brown, M. H. & Skurray, R. a. QacA Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus* :

- Comparative Analysis of Resistance to Diamidines , Biguanidines , and Guanylhydrazones QacA Multidrug Efflux Pump from *Staphylococcus aureus* : Comparative Analysis of Resistance to Diamidines , Bigua. **42**, 2–5 (1998).
257. Shafer, W. M., Qu, X., Waring, J. & Lehrer, R. I. Modulation of *Neisseria gonorrhoeae* susceptibility to vertebrate antibacterial peptides due to a member of the resistance/nodulation/division efflux pump family. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **95**, 1829–1833 (1998).
258. Shafer, W. M., Martin, L. E. & Spitznagel, J. K. Cationic antimicrobial proteins isolated from human neutrophil granulocytes in the presence of diisopropyl fluorophosphate. *Infect. Immun.* **45**, 29–35 (1984).
259. Giano, M. C. *et al.* Injectable bioadhesive hydrogels with innate antibacterial properties. *Nat. Commun.* **5**, 4095 (2014).
260. Xue, Y., Xiao, H. & Zhang, Y. Antimicrobial polymeric materials with quaternary ammonium and phosphonium salts. *Int. J. Mol. Sci.* **16**, 3626–3655 (2015).
261. Delaviz, Y., Santerre, J. P. & Cvitkovitch, D. G. *Infection resistant biomaterials. Biomaterials and Medical Device - Associated Infections* (Woodhead Publishing Limited, 2015). doi:10.1533/9780857097224.2.223
262. Kenawy, E.-R., Worley, S. D. & Broughton, R. The Chemistry and Applications of Antimicrobial Polymers: A State-of-the-Art Review. *Biomacromolecules* **8**, 1359 (2007).
263. Dragan, E. S., Lazar, M. M., Dinu, M. V. & Doroftei, F. Macroporous composite IPN hydrogels based on poly(acrylamide) and chitosan with tuned swelling and sorption of cationic dyes. *Chem. Eng. J.* **204-205**, 198–209 (2012).
264. Dahlbäck, B. Blood coagulation. *Lancet* **355**, 1627–1632 (2000).
265. Davie, E. W. A brief historical review of the waterfall/cascade of blood coagulation. *J. Biol. Chem.* **278**, 50819–50832 (2003).
266. Palta, S., Saroa, R. & Palta, A. Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.* **58**, 515–523 (2014).
267. Flier, J. S., Underhill, L. H., Furie, B. & Furie, B. C. Molecular and Cellular Biology of Blood Coagulation. *N. Engl. J. Med.* **326**, 800–806 (1992).
268. Masoudi, E. A., Ribas, J., Kaushik, G., Leijten, J. & Khademhosseini, A. Platelet-Rich Blood Derivatives

- for Stem Cell-Based Tissue Engineering and Regeneration. *Curr. Stem Cell Reports* **2**, 33–42 (2016).
269. Radosevich, M., Goubran, H. I. & Burnouf, T. Fibrin sealant: scientific rationale, production methods, properties, and current clinical use. *Vox Sang.* **72**, 133–143 (1997).
270. Weisel, J. W. The mechanical properties of fibrin for basic scientists and clinicians. *Biophys. Chem.* **112**, 267–276 (2004).
271. Burnouf, T. *et al.* Human blood-derived fibrin releasates: Composition and use for the culture of cell lines and human primary cells. *Biologicals* **40**, 21–30 (2012).
272. He, L., Lin, Y., Hu, X., Zhang, Y. & Wu, H. A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endodontology* **108**, 707–713 (2009).
273. Chen, T. M., Tsai, J.-C. & Burnouf, T. A novel technique combining platelet gel, skin graft, and fibrin glue for healing recalcitrant lower extremity ulcers. *Dermatol. Surg.* **36**, 453–460 (2010).
274. Carter, M. J., Fylling, C. P. & Parnell, L. K. S. Use of platelet rich plasma gel on wound healing: a systematic review and meta-analysis. *Eplasty* **11**, e38 (2011).
275. Andia, I., Sánchez, M. & Maffulli, N. Joint pathology and platelet-rich plasma therapies. *Expert Opin. Biol. Ther.* **12**, 7–22 (2012).
276. Anitua, E., Sánchez, M., Orive, G. & Andía, I. The potential impact of the preparation rich in growth factors (PRGF) in different medical fields. *Biomaterials* **28**, 4551–4560 (2007).
277. Bishop, P., Lewis, K., Schultz, J. & Walker, K. Comparison of Recombinant Human Thrombin and Plasma-Derived Human α -Thrombin. *Semin. Thromb. Hemost.* **32**, 086–097 (2006).
278. Papanas, N. & Maltezos, E. Benefit-risk assessment of becaplermin in the treatment of diabetic foot ulcers. *Drug Saf.* **33**, 455–461 (2010).
279. Henderson, J. L. *et al.* The effects of autologous platelet gel on wound healing. *Ear. Nose. Throat J.* **82**, 598–602 (2003).
280. Pallua, N., Wolter, T. & Markowicz, M. Platelet-rich plasma in burns. *Burns* **36**, 4–8 (2010).
281. Jerome, W. G., Handt, S. & Hantgan, R. R. Endothelial cells organize fibrin clots into structures that are more resistant to lysis. *Microsc. Microanal. Off. J. Microsc. Soc. Am. Microbeam Anal. Soc. Microsc. Soc. Canada* **11**, 268–277 (2005).

282. Nair, C. H., Azhar, A. & Dhall, D. P. Studies on fibrin network structure in human plasma. Part one: Methods for clinical application. *Thromb. Res.* **64**, 455–476 (1991).
283. Laurens, N., Koolwijk, P. & de Maat, M. P. Fibrin structure and wound healing. *J. Thromb. Haemost.* **4**, 932–939 (2006).
284. Hahn, M. S., Teply, B. A., Stevens, M. M., Zeitels, S. M. & Langer, R. Collagen composite hydrogels for vocal fold lamina propria restoration. *Biomaterials* **27**, 1104–1109 (2006).
285. Brown, A. C. & Barker, T. H. Fibrin-based biomaterials: Modulation of macroscopic properties through rational design at the molecular level. *Acta Biomater.* **10**, 1502–1514 (2014).

Annexes

Annexe A

Résultats complémentaires au chapitre 5

1. Synthèse de RIP à base de protéines humaines

Les RIP sont constitués d'un réseau de fibrine et d'un coréseau formé par le polymère synthétique (ici le PVAm), lié de façon covalente avec l'albumine substituée par des groupements méthacrylate. La synthèse de RIP à base de protéines humaines implique donc de remplacer le fibrinogène bovin par du fibrinogène humain (le réseau de fibrine humaine ainsi obtenu est noté hFb), et l'albumine bovine par de l'albumine humaine (notée HSA). La fonctionnalisation de la HSAm a été réalisée dans un premier temps, en suivant exactement le même protocole que celui utilisé pour modifier la BSAm. Un taux de greffage identique est obtenu (70% des fonctions amine modifiée des groupements méthacrylate, déterminé par un dosage des amines libres, TNBS). Un test de gélification de la HSAm a été réalisé, en mélangeant 315 μL de tampon Tris, 100 μL de NaCl 1,5 M, 10 μL de CaCl_2 2 M, 70 μL d'I2959 et 500 μL de HSAm. La solution de précurseurs est placée sous UV pendant 1h à 37°C, et le matériau obtenu présente une légère coloration jaune, il est transparent et autosupporté. La polymérisation des fonctions méthacrylate de la HSAm semble donc se réaliser dans les mêmes conditions que celle de la BSAm. Suite à ce test, différents RIPs ont été synthétisés avec la HSAm. Le RS PVA(10) sert de contrôle négatif.

1.1. Vérification de la synthèse

Les RIPs PVA(10)/hFb, PVA(5)HSA(5)/hFb et HSA(10)/hFb à base d'albumine et de fibrine humaines ont été synthétisés suivant le même protocole que celui utilisé pour la synthèse des RIPs à base de protéines bovines (cf Chapitre 4). La Figure 132 présente leur aspect en sortie de synthèse, après 1h sous UV à 37°C : le RIP HSA(10)/hFb est transparent alors que les RIP PVA(5)HSA(5)/hFb et PVA(10)/hFb sont tous deux blancs, mais homogènes et aisément manipulables.

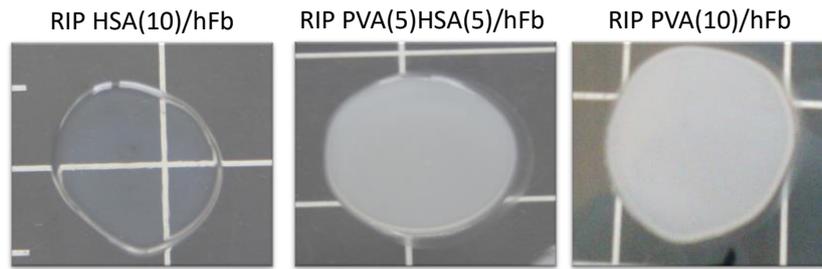


Figure 132 : aspect macroscopique en sortie de synthèse des RIP à base de de PVA et de protéines humaines

Pour vérifier la formation du réseau de fibrine, la technique du Western Blot a été utilisée. Après avoir été synthétisés, les matériaux sont immergés pendant 72h dans du tampon de dégradation chimique, à 37°C. Les surnageants sont ensuite analysés par électrophorèse. Un anticorps anti-fibrinogène est ensuite utilisé dans pour révéler la présence de la bande γ - γ , qui traduit la transformation du fibrinogène en fibrine (Figure 133).

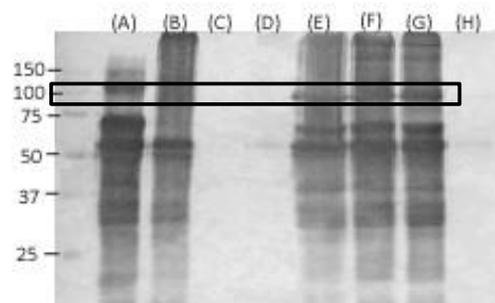


Figure 133 : Image de la membrane de nitrocellulose après dégradation chimique de la fibrine, révélée avec le kit AP Color de BioRad®. (A) RS hFb (B) hFg (C) RS PVA(10) (D) RS HSA(10) (E) RIP HSA(10)/hFb (F) RIP PVA(10)/hFb (G) RIP PVA(5)HSA(5)/hFb (H) PVA(5)HSA(5).

Pour tous les matériaux contenant un réseau de fibrine, une bande γ - γ est observée à 105 kDa. Cette bande traduit l'hydrolyse du fibrinogène en fibrine, sous l'action de la thrombine. En revanche, logiquement, la bande γ - γ n'est pas observée pour les réseaux simples PVA(10) et HSA(10) et le coréseau PVA(5)HSA(5), ainsi que pour le fibrinogène non polymérisé. La présence de la HSA_m, au même titre que celle de la BSA_m, n'empêche donc pas la formation du réseau de fibrine, puisque, une bande γ - γ est bien observée pour les RIPs PVA(5)HSA(5)/hFb.

Puisque la formation du réseau de fibrine humaine au sein des RIPs a été démontrée, la qualité de la copolymérisation entre le polymère synthétique PVAm et/ou la HSA_m a été évaluée par des mesures de fractions solubles synthétiques (extraction en Soxhlet) et protéiques (au moyen d'un test ELISA). La fraction de polymère non liée est calculée par différence de masse. Quant au fibrinogène

non lié, sa proportion est calculée en comparant à la gamme étalon de fibrinogène, d'équation $y = 0,281 x$ (Tableau 15).

	Fractions solubles synthétiques (%)	Fibrinogène extrait (%)
Gel de hFb	-	0,03
RIP PVA(10)/hFb	23	0,08
RIP PVA(5)HSA(5)/hFb	19	0,05
RIP HSA(10)/hFb	-	0,01
PVA(5)HSA(5)	8	0
RS PVA(10)	10	0

Tableau 15 : fractions solubles synthétiques et fibrinogène non réticulés pour les RIP à base de protéines humaines.

Concernant les extractibles protéiques, un gel de fibrine à 0,5% (P/V) est pris comme référence. Le RS PVA(10) présente une absorbance nulle, et constitue donc un témoin négatif. La fraction soluble contenue dans le gel de fibrine est inférieure à 0,01%, de même que toutes les formulations testées. Ce taux d'extractibles très faible est le reflet d'un réseau de fibrine bien formé, et traduit également le fait que la présence d'un réseau de PVA ne l'altère pas. Le PVAm ne constitue donc pas une gêne pour l'hydrolyse du fibrinogène en fibrine.

Le RS PVA(10) contient 8% de fractions solubles synthétiques, donc de PVAm non réticulé. Pour le RIP PVA(10)/hFb, cette valeur est 3 fois supérieure (23%). Ce taux est relativement élevé, surtout en comparaison des matériaux correspondant à base de protéines bovines (11%). Par contre, ce taux est plus faible dans le RIP PVA(5)HSA(5)/hFb, il y a donc bien coréticulation du PVAm avec la HSAm. Le fait que la fraction soluble contenue dans le co-réseau PVA(5) HSA(5), identique à celle du réseau simple de PVAm confirme cette hypothèse.

1.2. Propriétés viscoélastiques

Les matériaux conservés dans du tampon Tris sont analysés au rhéomètre, afin de déterminer leurs modules de stockage G' et de perte G'' (Figure 134).

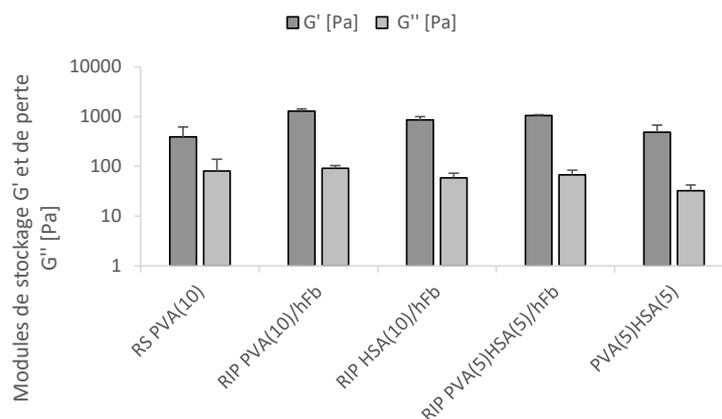


Figure 134 : propriétés viscoélastiques des RIP à base de protéines humaines.

Pour tous les hydrogels, le module de stockage est supérieur à celui de perte, ce qui est caractéristique de solides viscoélastiques. Le module de stockage du RIP PVA(10)/hFb est de 390 Pa et celui de perte est de 80 Pa. La synthèse d'un RIP associant un gel de fibrine au PVA(10) permet d'atteindre un module de stockage environ 3 fois plus élevée (1286 Pa). Le RIP HSA(10)/hFb a un G' de 860 Pa et le G' du RIP PVA(5)HSA(5)/hFb est de 1060 Pa, donc comprise entre celles des deux RIPs correspondant, et supérieure à celle du réseau simple de PVA. Cette valeur est légèrement inférieure à celle du RIP PVA(10)/hFb probablement en raison de sa plus faible proportion en polymère synthétique. Quant au coréseau PVAm(5)HSA(5), son module de stockage n'est que de 485 Pa. L'introduction du gel de fibrine, qui pourtant a des propriétés mécaniques très faibles ($G' = 30-80$ Pa) permet ainsi d'obtenir un RIP facilement manipulable dont le module est de 1059 Pa. Ces valeurs des modules de stockage ont été comparées à celles des matériaux synthétisés à partir de protéines bovines, et sont du même ordre de grandeur.

1.3. Biodégradabilité des RIP PVA-HSA/Fb

Le caractère biodégradable des matériaux est un élément crucial. En effet, un biomatériau implanté capable d'être dégradé au sein du corps du patient permet d'éviter une opération chirurgicale pour le retirer. De plus, le matériau s'adapte à l'évolution de la plaie en étant modifié par les molécules sécrétées au cours de la cicatrisation. L'intérêt des RIPs développés est justement que l'albumine sérique est hydrolysable par voie enzymatique. Le caractère biodégradable des RIPs PVA(10)/hFb, HSA(10)/hFb et PVA(5)HSA(5)/hFb ainsi que celle du coréseau PVA(5)HSA(5) a donc été vérifié. Pour cela, après leur synthèse, les matériaux sont incubés à 37°C dans un tampon de dégradation contenant de la thermolysine à 10 U.mL⁻¹, pendant 72h (Figure 135).

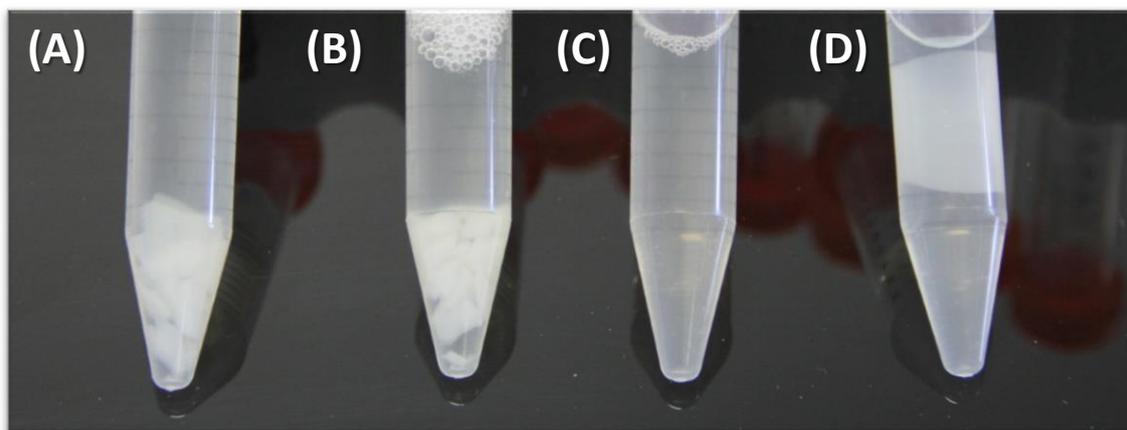


Figure 135 : dégradation enzymatique des RIPs (A) PVA(5)HSA(5) (B) PVA(5)HSA(5)/hFb (C) HSA(10)/hFb et (D) PVA(10)/hFb après 72 h d'incubation dans une solution de thermolysine à 10 U.mL^{-1} .

Comme attendu, le RIP PVA(10)/hFb conserve l'intégrité de son volume après incubation dans la solution de thermolysine, bien que le réseau de fibrine soit dégradé, comme cela avait été démontré dans le Chapitre 2 (cf § 2.3). En revanche, le RIP HSA(10)/hFb est totalement dégradé (solubilisation complète). Le RIP PVA(5)HSA(5)/hFb se désagrège, sa dégradation est donc seulement partielle. C'est également le cas du coréseau PVA(5)HSA(5).

La biodégradabilité des matériaux à base de protéines humaines a ainsi été vérifiée. L'introduction d'une protéine hydrolysable d'origine humaine copolymérisant avec le polymère synthétique permet bien d'obtenir des matériaux qui peuvent être dégradés de manière enzymatique.

2. Concentration du plasma par centrifugation

Dans un premier temps, le plasma total a été centrifugé, dans un tube avec un seuil de filtration à 6000-8000 Da, pendant 30 min à 4100 rpm. Le plasma n'ayant pas traversé le filtre correspond à une solution légèrement trouble qui est récupérée. La concentration en Fibrinogène dans le plasma concentré a été évaluée à $6,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ (au lieu de 5 mg.mL^{-1}) en tenant compte du liquide éliminé après la centrifugation. La gélification de ce plasma concentré a été vérifiée, comme précédemment, avoir des ajouts, soit de CaCl_2 , soit de thrombine, soit d'un mélange de CaCl_2 et de thrombine ((2)).

Alors que le plasma non traité ne gélifie pas, lorsque la thrombine est ajoutée sans calcium, le plasma concentré gélifie dans tous les cas. Toutefois, le gel de plasma concentré, contenant uniquement de la thrombine, se déstructure rapidement, preuve que la gélification est imparfaite et pas suffisante pour résister à des chocs. Cette gélification est peut être expliquée par la concentration de certaines espèces chimiques lors de la centrifugation, permettant à la thrombine de retrouver une

activité suffisante pour initier la formation d'un réseau. A ce stade, il aurait été pertinent de mesurer par rhéologie le temps de gel de ces matériaux afin de vérifier que la concentration en fibrinogène est réellement augmentée.

Ces résultats montrent qu'il est possible de concentrer le plasma par une simple étape de centrifugation sans induire sa gélification. Le plasma concentré pourrait être utilisé pour synthétiser un RIP dans lequel la concentration en fibrinogène serait la plus proche possible de la concentration physiologique.

3. Matériaux RIP à base de PVA et de plasma total

3.1. Synthèse des RIPs PVA/plasma

Plusieurs options ont été envisagées pour mélanger du PVAm au plasma. Dans un premier temps, le PVAm en poudre a été introduit directement (à 5 ou 10% w/v) dans le plasma non traité. La solution obtenue est alors très visqueuse et emprisonne beaucoup de gaz. L'amorceur, le calcium et la thrombine sont ensuite ajoutés, et le mélange est placé pendant 1h sous UV à 37°C. Des matériaux sont ainsi obtenus, mais ils ne sont pas homogènes et présentent des défauts. C'est pourquoi le PVAm a été, dans un second temps, solubilisé dans le tampon Tris (à 20% w/v, comme précédemment – cf Chapitre 3), et le plasma ajouté à la place du fibrinogène et du tampon Tris. Afin d'obtenir la concentration en fibrinogène la plus élevée possible dans le matériau, l'albumine est introduite sous forme lyophilisée dans le plasma. L'Irgacure est ensuite ajouté, ainsi du calcium (20 mM) et de la thrombine (0,2 U.mL⁻¹) afin de permettre la formation rapide du réseau de fibrine. La solution est placée sous UV, pendant 1h à 37°C. De cette façon, des RIPs PVA(10)/PL et PVA(5)BSA(5)/PL sont obtenus (Figure 136A et C). Afin d'augmenter la concentration en fibrinogène, ces mêmes RIP ont été synthétisés en utilisant du plasma concentré par centrifugation (cf § 2). Les deux mêmes formulations ont été synthétisées (Figure 136B et D). Que ce soit pour le plasma non traité ou centrifugé, le RIP HSA(10)/PL n'est pas autosupporté, et sa caractérisation n'a pas été réalisée.

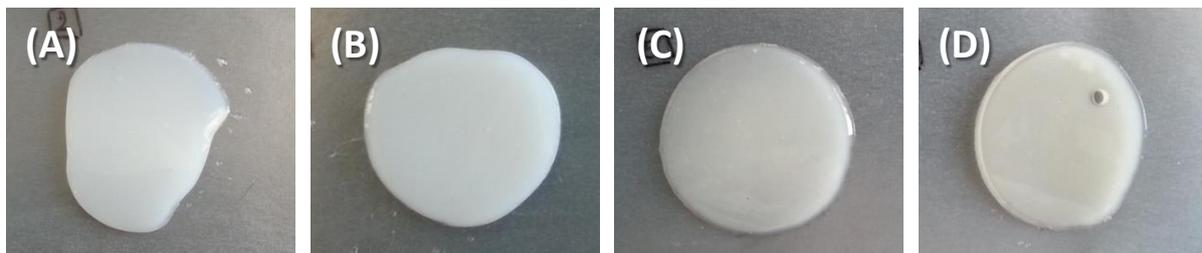


Figure 136 : matériaux à base de PVA et de PL (A) PVA(10)/PL (B) PVA(10)/PL concentré (C) PVA(5)BSA(5)/PL (D) PVA(5)BSA(5)/PL concentré.

Lorsque le plasma n'est pas traité, les RIP PVA(10)/PL sont manipulables, quoique plus fragiles que leurs équivalents à base de protéine humaine. Cela est sans doute dû au fait que la concentration en fibrinogène est inférieure à $1,6 \text{ mg.mL}^{-1}$, au lieu de 5 mg.mL^{-1} dans les RIPs PVA/Fb (cf. Chapitre 2). Lorsque le plasma est préalablement concentré, les matériaux sont également autosupportés. Aucune différence macroscopique ne peut être observée par rapport aux matériaux synthétisés à partir de plasma non traité. Tous sont cependant plus fragiles que leur équivalent à base de fibrinogène purifié à même concentration.

Des RIPs coréseaux, donc contenant à la fois du PVAm et de la HSAm, ainsi que du plasma, ont été synthétisés selon le même principe. Dans ce cas, la HSAm lyophilisée est solubilisée dans le plasma. Le volume de la solution de PVAm est simultanément diminué ce qui conduit à la concentration en fibrinogène la plus élevée ($2,8 \text{ mg.mL}^{-1}$). Ces matériaux sont homogènes et manipulables (Figure 13B) mais, tout comme les RIPs précédents, ils semblent bien plus fragiles que les RIPs PVA(5)BSA(5)/Fb correspondant (cf. Chapitre 2).

3.2. Vérification de l'architecture RIP

Pour vérifier la formation du réseau de fibrine, les matériaux sont immergés pendant 72h dans du tampon de dégradation chimique, à 37°C . Une électrophorèse suivie d'un Western-Blot contre le fibrinogène est réalisée sur les surnageants et révèle la présence de la bande $\gamma\text{-}\gamma$ dans tous les matériaux où du plasma a été introduit, traduisant la transformation du fibrinogène en fibrine (Figure 137).

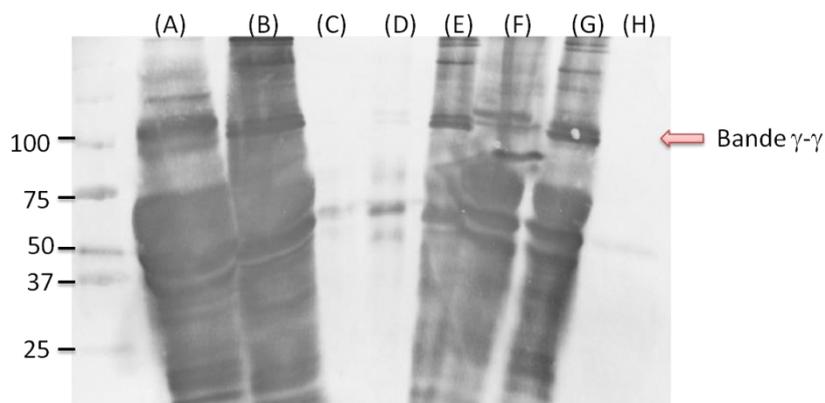


Figure 137 : image de la membrane de nitrocellulose après dégradation chimique du fibrinogène, révélée avec le kit AP Color de BioRad®. (A) plasma non gélifié (B) Plasma gélifié (C) RS PVA(10) (D) RS HSA(10) (E) RIP PVA(10)/plasma (F) RIP HSA(10)/plasma (G) RIP PVA(5)HSA(5)/plasma (H) Coréseau PVA(5)HSA(5).

Il est intéressant de constater que, d'une part, même au sein du plasma non gélifié, une bande $\gamma\text{-}\gamma$ est observée bien que le plasma utilisé soit déplété en calcium, le cofacteur de la thrombine. Il

semble donc que la thrombine est capable d'hydrolyser en partie certaines molécules de fibrinogène. D'autre part, même si les RIPs HSA(10)/PL ne peuvent pas être obtenus à partir de plasma, la bande γ - γ est observée. Le clivage du fibrinogène par la thrombine a donc bien eu lieu, en présence du polymère synthétique et de l'albumine modifiée.

La qualité des réseaux à base de PVA dans ces RIPs a été évaluée par extraction au Soxhlet pendant 96h avec de l'eau et par test ELISA contre le fibrinogène sur les surnageants de diffusion. Les résultats sont présentés dans le Tableau 16.

	Extractibles synthétiques (%)	Fibrinogène (%)
RIP PVA(10)/PL	11	0,1
RIP PVA(5)HSA(5)/ PL	13	0,05
PVA(5)HSA(5)	8	0
RS PVA(10)	8	0

Tableau 16 : fractions solubles synthétiques et fibrinogène non lié contenus dans les matériaux à base de plasma après 96h d'extraction au soxhlet (pour les extractibles synthétiques) ou 24h d'extraction à 37°C (pour le fibrinogène).

La fraction soluble synthétique contenue dans le RIP PVA(10)/plasma est d'environ 11% alors qu'elle est de 8% pour le RS PVA(10). Cette fraction est de 13% pour le RIP PVA(5)HSA(5)/plasma, ce qui est du même ordre de grandeur. Ces taux sont très satisfaisants pour des matériaux synthétisés à partir de solution diluée.

Concernant les extractibles protéiques, le RIP PVA(10)/plasma et le RIP PVA(5)HSA(5)/plasma en contiennent moins de 0,1%. Pour rappel, la fraction soluble d'un gel de fibrine est de l'ordre de 0,03% (cf Annexe A, § 1). Le réseau de fibrine est donc bien formé à partir du fibrinogène contenu dans le plasma et la présence du PVA et de la HSA n'en altère pas la formation.

Les valeurs de la fraction soluble synthétique est faible, et le fibrinogène semble être totalement réticulé : les deux réseaux (fibrine et réseau contenant le polymère) peuvent donc se former l'un en présence de l'autre, même dans un milieu complexe tel que le plasma.

3.3. Caractérisation rhéologique.

Les propriétés rhéologiques des matériaux ont ensuite été mesurées à 37°C, après avoir été stockés, en sortie de synthèse, pendant 12h dans du tampon Tris à température ambiante (Figure 138).

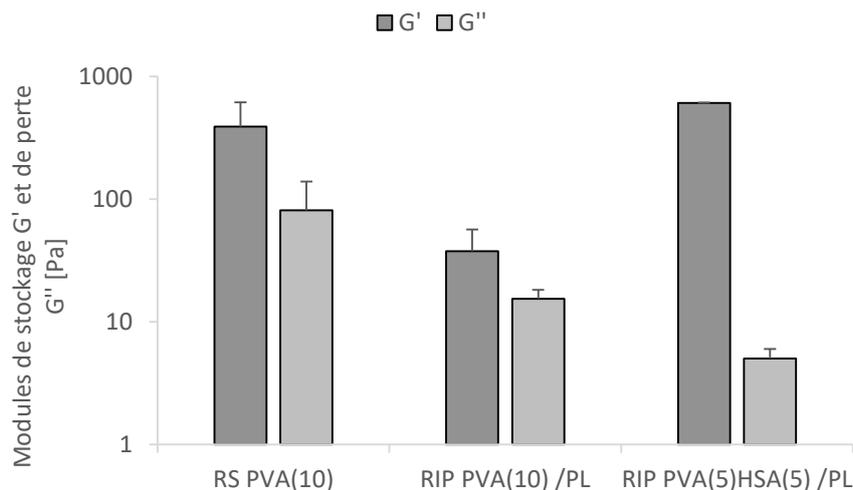


Figure 138 : propriétés viscoélastiques des matériaux à base de plasma.

Alors que l'introduction d'un réseau de fibrine humaine à la concentration de 5 mg.mL^{-1} provoque une augmentation d'un facteur 3 du module de stockage (cf. Chapitre 3) le contraire est observé lors de l'ajout du plasma. Ainsi, le module de stockage du RIP PVA(10)/plasma est 10 fois inférieur (380 Pa) à celui du réseau simple de PVA (390 Pa). Par contre, alors que le module de stockage du RIP PVA(5)HSA(5)/Fb (40Pa) est plus faible que celui du RIP PVA(10)/Fb (3243 Pa), le module du RIP PVA(5)HSA(5)/plasma est de 61 Pa, donc plus élevé.

Les mesures rhéologiques confortent donc les observations macroscopiques : les matériaux à base de plasma ont des modules mécaniques plus faibles que ceux à base de fibrinogène extrait (pour lesquels les modules étaient compris entre 300 et 1300 Pa). Macroscopiquement, une nette différence de résistance est constatée entre les matériaux à base de plasma non traité et concentré. En effet, les RIPs synthétisés avec du plasma concentré sont davantage résistants et peuvent être aisément déformés sans pour autant se casser. Ainsi, en augmentant la concentration en fibrinogène dans le plasma, la résistance à une sollicitation manuelle est améliorée. Cependant, les propriétés viscoélastiques devraient être mesurées afin de conclure quant au bénéfice apporté par la centrifugation du plasma.

3.4. Biodégradabilité

La biodégradabilité des matériaux à base plasma a été vérifiée, comme précédemment, en les immergeant dans une solution de thermolysine à 10 U.mL^{-1} pendant 24h à 37°C (Figure 139).

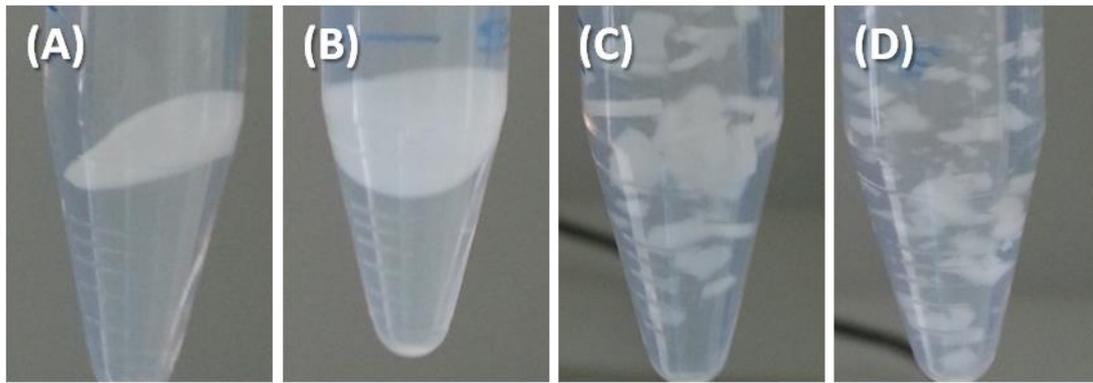


Figure 139 : résultats de dégradation par la thermolysine à $10\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$ pendant 24h des différents matériaux à base de PVA et de plasma, concentré ou non. (A) PVA(10)/PL (B) PVA(10)/PL concentré (C) PVA(5)BSA(5)/PL (D) PVA(5)BSA(5)/PL concentré

Conformément à ce qui avait été observé pour les matériaux à base de protéines humaines, les RIPs PVA(10)/plasma, que ce dernier soit concentré ou pas, gardent leur intégrité après avoir été incubés dans la solution enzymatique. Ils conservent leur taille, et leur épaisseur, au moins au niveau macroscopique. Par contre, le RIP PVA(5)HSA(5)/plasma se solubilise totalement. En revanche, les RIP PVA(5)BSA(5)/PL et PL concentré sont tous deux dégradés en fragments de petite taille. Aucune différence majeure ne peut être observée après la dégradation de ces deux échantillons, ce qui montre que l'architecture microscopique du réseau n'est pas modifiée par l'utilisation de plasma concentré, de sorte que l'enzyme protéolytique dégrade ces deux réseaux de façon très similaire.

La biodégradabilité des matériaux à base de plasma a donc bien été vérifiée.

A ce stade, nous avons montré que le plasma gélifie en présence de calcium, avec ou sans ajout de thrombine. Sa gélification est également possible en présence de PVAm solubilisé dans du tampon Tris. Lorsque ce dernier est, lui aussi, réticulé par photopolymérisation, des RIPs autosupportés sont obtenus. Dans chacun des matériaux, les formations des différents réseaux ont été vérifiées. En ajoutant de la HSAm dans le plasma, des RIPs PVA-BSA/plasma peuvent également être obtenus, et ceux-ci sont biodégradables. Cependant, ces matériaux présentent des modules 10 fois inférieurs à ceux obtenus avec des RIPs à base de fibrinogène bovin ou humain, ce qui constitue actuellement leur point faible.

Puisque le PVAm a été écarté de l'étude en raison du caractère peu reproductible de sa synthèse, de la durée nécessaire à sa modification, et des problèmes d'accréditation futurs risquant de se poser (cf. Chapitre 3 - § 3), le développement des matériaux à base de plasma a été réorienté. Ainsi, la synthèse de RIPs à base de POE a été mise au point. Les matériaux ainsi obtenus ont alors été caractérisés et cela sera présenté dans la suite de ce chapitre.

Annexe B : Partie expérimentale

1. Réactifs chimiques, solvants, enzymes et protéines utilisés

Les caractéristiques des réactifs chimiques sont répertoriées dans le Tableau 17. Ils ont tous été utilisés sans purification préalable.

Nom	Abréviation	Formule	Masse molaire (g.mol ⁻¹)	Pureté (%)	Fournisseur
Acétone anhydre	/	CH ₃ COCH ₃	58,08	99,8	VWR
Acide borique	/	H ₃ BO ₃	61,83	/	Merck
alcool polyvinylique (hydrolysé à 98%)	PVA	-(CH ₂ CHOH) _n -	16 000	/	Acros
azoture de sodium	/	NaN ₃	65,01	99,5	Sigma-Aldrich
bleu de Coomassie (Brillant Blue R)	/	C ₄₅ H ₄₄ N ₃ NaO ₇ S ₂	825,97	/	Sigma-Aldrich
Chlorure de Benzyl triméthyl Ammonium	BN ⁺	C ₆ H ₅ CH ₂ N(Cl) (CH ₃) ₃	185,69	97	Sigma-Aldrich
carbonate de sodium	/	Na ₂ CO ₃	105,99	99	Sigma-Aldrich
chlorure de calcium	/	CaCl ₂	110,98	/	Riedel-deHaën
chlorure de magnésium	/	MgCl ₂	203,3	/	Prolabo
chlorure de sodium	/	NaCl	58,44	/	Fisher
4',6'-diamidino-2-phénylindole	DAPI	C ₁₆ H ₁₅ N ₅	350,25	/	Sigma
diéthanolamine	/	HN(CH ₂ CH ₂ OH) ₂	105,14	99	Sigma-Aldrich
dodécylsulfate de sodium	SDS	C ₁₂ H ₂₅ O ₄ SNa	288,38	99	Fisher
glycine	/	C ₂ H ₅ NO ₂	75,06	/	Euromedex
hydroquinone	Hdq	C ₆ H ₆ O ₂	110,11	99,5	Acros
Irgacure 2959	I ₂₉₅₉	C ₁₂ H ₁₆ O ₄	224,25	98	Ciba
β-mercaptoéthanol	/	HSCH ₂ CH ₂ OH	78,13	99	Sigma-Aldrich
méthacrylate d'hydroxyéthyle	HEMA	CH ₂ =C(CH ₃)COOCH ₂ CH ₂ OH	130,14	97	Sigma-Aldrich
méthacrylate de N- hydrosuccinimide ester	NHSm	C ₈ H ₉ NO ₄	183,16	98	Sigma-Aldrich
méthacrylate de 2- isocyanatoéthyle	2-ICEMA	H ₂ C=C(CH ₃)CO ₂ CH ₂ C H ₂ NCO	155,15	98	Sigma-Aldrich
Mono laurate de poly(éthylène glycol)	Tween 20	C ₅₈ H ₁₁₄ O ₂₆	1228	/	Sigma-Aldrich
nitrate d'argent	/	AgNO ₃	169,87	99	Sigma-Aldrich
paraformaldéhyde	PFA	HO(CH ₂ O) _n H	/	/	Sigma-Aldrich
Phalloïdine FITC	Ph-FITC	C ₅₈ H ₆₃ N ₁₀ O ₁₄ S ₄	1252,44	/	Sigma

Phalloïdine Alexa 532	Ph-532	/	/	/	Invitrogen
phosphate de sodium	/	NaH ₂ PO ₄	163,94		Sigma-Aldrich
Poly(éthylène glycol) diméthacrylate	PEGDM750	C ₃ H ₅ C(O)(OCH ₂ CH ₂) _n OC(O)C ₃ H ₅	750	/	Sigma-Aldrich
Sel de disodium de 4- Nitrophenyle phosphate hexahydrate	pNPP	O ₂ NC ₆ H ₄ OP(O)(ONa)) ₂ · 6H ₂ O	371,14	99	Fluka
N-succinimide ester Alexa 488	/	C ₂₅ H ₁₅ Li ₂ N ₃ O ₁₃ S ₂	643,41	/	invitrogen
Sulfate de sodium	/	Na ₂ SO ₃	103,5	/	normapur
thiosulfate de sodium	/	Na ₂ S ₂ O ₃	158,11	99	Sigma-Aldrich
Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane	Tris	C ₄ H ₁₁ NO ₃	121,14	/	VWR
Urée	/	CH ₄ N ₂ O	60,05	/	VWR
Chlorure de Vinylbenzyl triméthyl ammonium	SN ⁺	H ₂ C=CHC ₆ H ₄ CH ₂ N(C H ₃) ₃ Cl	211,73	99%	Sigma-Aldrich

Tableau 17 : réactifs utilisés.

Le diméthylsulfoxyde (DMSO, 99%, Sigma-Aldrich) est séché 24h sur de l'oxyde de calcium. Il est ensuite distillé puis stocké à l'abri de la lumière en présence de tamis moléculaire activé et sous argon. L'éthanol (Fisher), le dichlorométhane (VWR), l'acide acétique (Sigma-Aldrich) et l'acétone (Fisher) sont utilisés sans traitement préalable.

Tous les tampons répertoriés dans le Tableau 18 sont préparés en solution aqueuse, à l'aide d'eau permutée et déionisée (18 MΩ) :

Nom	pH	Composition
Tampon Tris	7,4	50 mM Tris.
Tampon de stockage de la Tb	6,5	50 mM Tris, 0,1% (P/V) BSA
Tampon Borate	7,4-9	250 mM acide borique (pH ajusté au NaOH 6M).
Tampon de synthèse	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl ₂ .
Tampon hydratation	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl ₂ , 0,02% (P/V) NaN ₃ .
Tampon d'arrêt (TNBS)	7	3 mM NaSO ₃ , 200 mM NaH ₂ PO ₄ .
Tampon d'extraction (Elisa)	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,02% (P/V) NaN ₃
Tampon rinçage/dilution (Elisa)	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% (V/V) tween-20, 0,02% (P/V) NaN ₃ .
Tampon de saturation (Elisa)	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% (V/V) tween-20, 3% (P/V) lait.
Tampon diéthanolamine	9,8	1 M diéthanolamine, 0,5 mM MgCl ₂ .
Tampon de dégradation chimique	6,8	160 mM Tris, 8 M urée, 2% (P/V) SDS, 2% (V/V) β-mercaptoéthanol.
Tampon de migration (électrophorèse)	8,3	250 mM Tris, 200 mM glycine, 0,1%(P/V) SDS.
Bleu de charge	7,4	50 mM Tris, 12% (P/V) SDS, 200 mM glycine, 30% (P/V) glycérol, 0,05% (P/V) bleu de Coomassie G250
Tampon anode (électrophorèse Mini protean)	8,9	100 mM Tris
Tampon de transfert (Western Blot)	8,8	25 mM Tris, 20% (V/V) éthanol, 192 mM glycine
Tampon TBS (Tris buffer saline)	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl
Tampon carbonate	8,5	200 mM Carbonate
Tampon PBS	7,4	200 mM phosphate
Tampon perméabilisation	7,4	200 mM phosphate, 0,1%(V/V) triton
Tampon saturation (BSA)	7,4	200 mM phosphate, 0,5% (P/V) BSA
Tampon saturation (SVF)	7,4	200 mM phosphate, 10% (V/V) SVF
Tampon PBS-caséine	7,4	200 mM phosphate, 1% (P/V) caséine

Tableau 18 : Tampons utilisés dans l'étude.

Les caractéristiques des protéines utilisées sont répertoriées dans Tableau 19.

Nom	Abréviation	Masse molaire (kDa)	Pureté (%)	Concentration (U.mg ⁻¹)	Fournisseur
albumine de sérum bovin	BSA	66	98	-	Sigma-Aldrich
albumine de sérum humain	HSA	66,4	98	-	Sigma-Aldrich
Fibrinogène bovin	Fg	340	95	-	Calbiochem
Fibrinogène humain	hFg	340	>95	-	Calbiochem
Thermolysine	TL	34,6	40-60	30-175	Sigma-Aldrich
Trypsine	Trp	23,8	-	10000	Sigma-Aldrich
Thrombine de plasma bovin	Tb	36	-	2000	Fisher

Tableau 19 : caractéristiques de protéines utilisées.

Pour finir, le Tableau 20 récapitule les différents anticorps utilisés :

Abréviation	Cible	spécificité	Animal de production	Marqueur	Référence fournisseur
Ac-Fg	Fibrinogène et fibrine humaine	Polyclonale	Lapin	/	A0080, Dako
Ac-Fg FITC	Fibrinogène et fibrine humaine	Polyclonale	Lapin	FITC	F0111, Dako
Ac-Lapin Perox	immunoglobuline du lapin	Polyclonale	Chèvre	peroxydase	A6154, Sigma
Ac-Coll	Collagène de type I humain	monoclonal	Souris	/	MAB 3341, Millipore
AC-Ha	Acide hyaluronique humaine	polyclonale	Mouton	/	AB53842, Abcam
Ac-Fn	Fibronectine humaine	polyclonale	Lapin	/	F3648, Sigma
Ac-BSA	Sérum albumine bovine	polyclonale	Lapin	/	A4338, Sigma
Ac-Souris 488	Immunoglobuline (IgG) de souris	/	Chèvre	Alexa 488	A11029, Invitrogen
Ac-Mouton 568	Immunoglobuline (IgG) de mouton	/	Âne	Alexa 568	A11057, Invitrogen
Ac-Lapin 633	Immunoglobuline (IgG) de lapin	/	Chèvre	Alexa 633	A21071, Invitrogen
Ac-Lapin 350	Immunoglobuline (IgG) de lapin	/	Chèvre	Alexa 350	A11046, Invitrogen

Tableau 20 : récapitulatif des différents anticorps utilisés.

Les réactifs pour la synthèse des matériaux ont été stockés et conditionnés selon les protocoles suivants, les solutions étant réalisées sous hotte à flux laminaire :

- Le fibrinogène lyophilisé est stocké à 4°C. Il est mis en solution à 5% (P/V) dans du tampon Tris stérile, maintenu à 37 °C pendant 3h sans agitation pour obtenir la dissolution complète.
- La thrombine (Tb) est stockée à -20°C. La solution de thrombine est préparée à concentration de 20 U.mL⁻¹ dans le tampon de stockage de la Tb.

- L'Irgacure I₂₉₅₉ est solubilisé à 0,6% (P/V) dans du tampon Tris stérile sous agitation vigoureuse pendant au minimum 24h. La solution homogène est ensuite stérilisée par filtration avec un filtre de 0,22 µm.
- Les oligomères de PEGDM sont stérilisés par filtration sur filtre 0,22 µm sous hotte à flux laminaire.

Chacune de ces solutions sont ensuite fractionnées et stockées à -20°C.

Les réactifs utilisés pour la culture cellulaire eucaryote sont les milieux de culture, DMEM High glucose [+ Glutamax-I + 4,5g/L D-glucose + Pyruvate] (Gibco), penicilline (10000 U)/streptomycine (10000 U) (Gibco), PBS (Gibco), sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (Gibco), Trypsine EDTA (Prolabo), Kit LIVE/DEAD (invitrogen).

Les réactifs utilisés pour la culture cellulaire procaryote sont les milieux de culture, bouillon TS (Tryptic Soy Broth, BD™ Bacto®) et TS agar (Tryptic Soy Agar, BD™ Bacto®).

2. Modification des polymères

2.1. Fonctionnalisation du PVA

La verrerie est séchée au minimum 24h dans une étuve à 80°C et la fonctionnalisation est réalisée sous flux d'argon. Le PVA est solubilisé à 20% (P/V) dans du DMSO pendant 1h à 80°C sous agitation. La solution est ensuite refroidie à 60°C avant l'addition de 2.8% d'hydroquinone en masse par rapport au 2-ICEMA et de 3% (m/m) de méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle (2-ICEMA) (par rapport aux fonctions alcool du PVA), ajoutés goutte à goutte. Le mélange est agité à 60°C pendant 4h, puis à 20°C pendant 12h. Après réaction, le milieu réactionnel est dilué avec de l'eau déionisée jusqu'à une concentration de 3% (P/V) en PVA. Le PVA fonctionnalisé est ensuite précipité dans 10 fois son volume d'acétone et agité à température ambiante pendant 12h. Il est récupéré par filtration et rincé trois fois avec 250 mL d'acétone. Il est ensuite broyé au mortier et séché sous hotte avant d'être placé 48h sous vide à 30°C. L'alcool polyvinylique modifié par des fonctions méthacrylate est nommé PVAm dans l'ensemble de cette étude.

- Rendement de réaction : 65 ± 9 %
- Taux de fonctionnalisation théorique : 4,1% des fonctions alcool
- Taux de fonctionnalisation obtenu et calculé par RMN : entre 1,5 et 2,2% des fonctions alcool

- RMN ^1H dans le D_2O : δ 6,15 ppm (1H, s, $\text{CH}_2=\text{C}$), δ 5,58 ppm (1H, s, $\text{CH}_2=\text{C}$), δ 3,8-4,1 ppm (50H, m, CH_2) et δ 1,4-1,8 ppm (106H, m, CH).

Les analyses par résonance magnétique nucléaire (RMN) sont réalisées avec une RMN 250 MHz (Advance DPX-250 FT-NMR –Brüker-) avec l'interface logiciel TopSpin (Brüker). Les produits sont solubilisés à 2% (P/V) avec du D_2O (MagniSolv –Merck) dans un tube à hémolyse pendant au minimum 12h suivies d'une incubation de 30 min à 80°C pour le PVA et de 15 min à 60°C pour le PVAm afin d'obtenir une solution transparente. Les déplacements chimiques sont mesurés par rapport au déplacement chimique de la fraction non deutérée du solvant.

La poudre de PVAm est stockée sous vide à 30°C . La solution mère de PVAm est préparée à 20% (P/V) dans du tampon Tris préalablement autoclavé. Pour cela, la solution est agitée vigoureusement pendant un minimum de 4 jours, puis portée à 60°C pendant 15 min avant d'être dégazée à l'aide d'une pompe à membrane pendant 1 h. Les fractions aliquotes préparées sous hotte à flux laminaire sont stockées à température ambiante à l'abri de la lumière.

2.2. Modification de l'albumine de sérum bovin ou humaine (BSA ou HSA)

La fonctionnalisation de la BSA native par des groupements méthacrylate a été réalisée selon le protocole suivant : 0,7 mol de méthacrylate de N-succinimydile ester ($1,1 \times 10^{-2}$ % (P/V) dans l'acétone) par mol de lysine de la BSA sont ajoutés goutte à goutte dans la solution de BSA à 4% (P/V) dans du tampon Borate. La solution est incubée à 20°C pendant 12h, puis dialysée 72h contre 10 fois son volume de tampon Tris. La solution de BSA fonctionnalisée (notée BSAm) est ensuite stérilisée par filtration (filtre $0,22 \mu\text{m}$) sous hotte à flux laminaire avant d'être lyophilisée et stockée à -20°C .

Pour préparer les matériaux, la BSAm est remise en solution à une concentration de 20% (P/V) dans du tampon Tris. Elle est placée 3h à 37°C avant d'être stérilisée par filtration ($0,22 \mu\text{m}$) sous hotte à flux laminaire et stockée à -20°C .

L'albumine de sérum humain (HSA) est modifiée selon le même protocole et notée HSAm.

Pour le dosage des lysines fonctionnalisées, un test TNBS est effectué : des solutions de BSA (ou de HSA), modifiée ou non, sont réalisées à des concentrations variant de 0,1 à $2 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ dans du tampon borate. 250 μL de la solution de protéine sont dilués avec 250 μL de tampon Borate 250 mM pH 9. La réaction est amorcée par 10 μL TNBS à une concentration 5% (P/V). Après 5 min à température ambiante, puis la réaction est arrêtée par l'ajout 1 mL du tampon d'arrêt. L'absorbance est mesurée avec un spectrophotomètre (Uvikon XS double faisceau, Secomam) à 420 nm.

3. Synthèse des matériaux

Toutes les synthèses sont réalisées dans du tampon de synthèse. Avant toute utilisation, les réactifs sont incubés à 37°C pendant au moins 15 min.

Toutes les synthèses ont été réalisées dans le moule présenté sur la Figure 140. Les solutions de précurseurs sont déposées sur les plots de Téflon qui définissent la géométrie des matériaux. Le couvercle du moule est ensuite positionné à une hauteur fixée par des entretoises de Téflon qui fixent alors l'épaisseur des échantillons à 1.25 mm. Le moule est ensuite exposé à un rayonnement à 365 nm de puissance 1,16 mW/cm² (VL-6, Bioblock, 2X 5W, 365 nm, distance lampe-échantillon 5 cm) pendant 60 min. La température est réglée à 37°C. Les matériaux obtenus sont ensuite séparés du moule à l'aide d'un fin morceau de téflon. Pour les synthèses de matériaux utilisés en culture cellulaire, le moule est préalablement autoclavé et la solution des précurseurs est préparée sous hotte à flux laminaire.

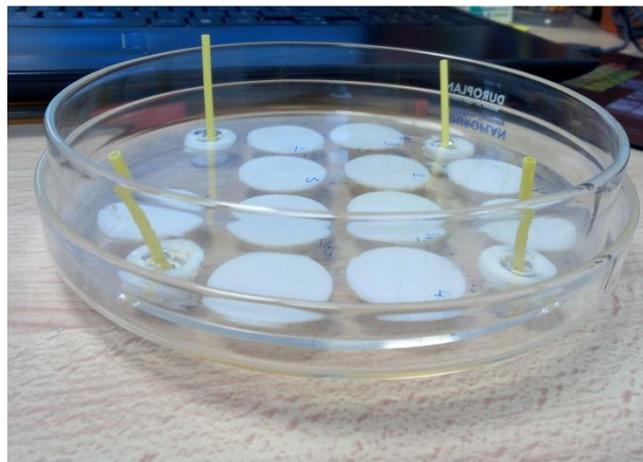


Figure 140 : photographie du moule dans lequel sont réalisées les synthèses : il est constitué d'une boîte de Petri, au fond de laquelle sont collés des supports de Téflon.

Selon leur composition, les matériaux sont synthétisés selon différents protocoles maintenant décrits.

3.1. Gel de fibrine

Un gel de fibrine à 0,5% (noté RS Fb) est formé en incubant 1 mL de tampon Tris contenant 5 mg de fibrinogène, 0,2 unités de thrombine par mL de fibrinogène, 150 mM de NaCl et 20 mM de CaCl₂. Le mélange est maintenu à 37°C pendant 1h (temps de gel : 5-10 min). Un gel mou et transparent est obtenu.

3.2. Matériaux à base de PVAm

Tous les RIPs à base de PVAm ont été synthétisés selon le même protocole. Seule la synthèse du RIP PVA(5)BSA(5)/Fb est décrite. Une solution composée de 210 μL de tampon Tris, 100 μL de NaCl 1,5 M, 10 μL CaCl_2 2 M, 70 μL de solution d'Irgacure I₂₉₅₉, 100 μL de fibrinogène à 5% (P/V) et 250 μL de la solution de BSAm 20% (P/V) est préparée. 250 μL de la solution de PVAm 20% (P/V) sont ensuite ajoutés. Le mélange est réalisé dans un tube de 2mL et d'une solution de 10 μL de thrombine à 20 U.mL⁻¹ sont ajoutés juste avant que le mélange ne soit placé dans le moule. Le moule est ensuite exposé aux UV (365 nm) à 37°C pendant 1h. Un matériau de couleur blanche, translucide et manipulable est obtenu.

Pour les autres compositions, la quantité d'I₂₉₅₉, l'ordre d'introduction des composés et les volumes de fibrinogène et de thrombine sont conservés et les volumes des autres précurseurs sont adaptés (Tableau 21).

Formulation	PVA(5)/ Fb	PVA(7,5)/ Fb	PVA(10)/ Fb	PVA(5) BSA(5)/ Fb	PVA(7) BSA(3)/ Fb
I ₂₉₅₉ (μL)	70				
PVAm (μL)	250	375	500	250	350
BSAm (μL)	0	0	0	250	150
Fibrinogène (μL)	100				
Thrombine (μL)	10				

Tableau 21 : Formulation des RIPs à base de PVAm (pour 1mL final).

Les RIPs à base de protéines humaines sont réalisées selon le même protocole ; seuls le fibrinogène est d'origine humaine et la HSAm remplace la BSAm.

3.3. Matériaux à base de PEGDM

Le gel de BSAm est synthétisé en mélangeant 224 μL de tampon Tris, 500 μL d'une solution de BSAm à 20% (P/V), 100 μL de NaCl à 1,5M, 10 μL de CaCl_2 et 166 μL d'I₂₉₅₉. La polymérisation se déroule sous UV (365 nm) pendant 1h à 37°C, et un matériau transparent très mou, non manipulable, légèrement jaune est obtenu.

Le RIP POE(10)/Fb est synthétisé en mélangeant 610 μL de tampon Tris, 100 μL d'une solution de NaCl à 1,5M, 10 μL d'une solution de CaCl_2 à 2M, 70 μL d'Irgacure I₂₉₅₉ à 6 mg.mL⁻¹. 100 μL d'une solution de fibrinogène à 5% et 100 μL de PEGDM sont ensuite ajoutés. Après homogénéisation, 10 μL d'une solution de thrombine à 20 U.mL⁻¹ sont ajoutés. La solution est placée sous UV à 37°C pendant

1h et un gel est obtenu en sortie de synthèse. Le RIP BSA(10)/Fb est obtenu de manière similaire, selon les volumes présentés dans le Tableau 22.

Formulations	RIP POE(10)/Fb	RIP BSA(10)/Fb
I ₂₉₅₉ (μL)	600	166
PEGDM (μL)	100	0
BSAm (μL)	0	500
Fibrinogène (μL)	100	
Thrombine (μL)	10	

Tableau 22 : formulation des RIP à base de POE ou de BSA et de fibrine (pour 1mL final).

Les RIPs obtenus après synthèse sont, soit translucides avec une légère coloration jaune (BSA), soit blanc opaque (PEGDM, $M = 750 \text{ g.mol}^{-1}$). Pour les réseaux simples correspondants, la seule différence est que les volumes des solutions de fibrinogène et de thrombine sont remplacés par du tampon Tris.

Les RIPs POE-BSA/Fb sont préparés selon le même protocole. A titre d'exemple, la synthèse du RIP POE(5)BSA(5) /Fb est décrite : 100 μL d'une solution de NaCl à 1,5 M et 10 μL d'une solution de CaCl₂ à 2 M, 424 μL d'une solution d'Irgacure I₂₉₅₉ à 0,6% (P/V), et 250 μL d'une solution de BSAm à 20% (P/V) sont mélangés à 56 μL de tampon Tris à 50 mM dans un eppendorf. 50 μL de PEGDM et 100μL d'une solution de fibrinogène à 5% (P/V) sont ajoutés. Après homogénéisation, 10 μL d'une solution de thrombine à 20 U.mL⁻¹ sont ajoutés. La solution est placée dans le moule sous UV à 37°C pendant 1h.

Le rapport molaire Irgacure/méthacrylate est maintenu constant à 1/16 pour les différentes compositions de RIP POE-BSA/Fb (Tableau 23).

Formulation	RIP POE(2) BSA(8)/ Fb	RIP POE(3) BSA(7)/ Fb	RIP POE(4) BSA(6)/ Fb	RIP POE(5) BSA(5)/ Fb	RIP POE(8) BSA(2)/ Fb
I ₂₉₅₉ (μL)	269	321	372	424	579
PEGDM (μL)	20	30	40	50	80
BSAm (μL)	400	350	300	250	200
Fibrinogène (μL)	100				
Thrombine (μL)	10				

Tableau 23 : Formulations de RIP POE-BSA/Fb (pour 1mL final).

Les coréseaux POE-BSA sont obtenus en remplaçant les volumes de fibrinogène et de thrombine par du tampon Tris.

Les RIPs POE-BSA/Fb contenant le styrène ammonium sont synthétisés selon un protocole similaire à celui décrit précédemment. Le styrène ammonium est introduit au début, après les sels. Le Tableau 24 récapitule les différentes compositions réalisées.

Formulation	RIP POE(2) BSA(8)SN ⁺ (x)/ Fb			RIP POE(5)BSA(5)SN ⁺ (x)/ Fb		
	SN ⁺ (1)	SN ⁺ (3)	SN ⁺ (5)	SN ⁺ (1)	SN ⁺ (3)	SN ⁺ (5)
I ₂₉₅₉ (μL)	269			424		
PEGDM (μL)	20			50		
BSAm (μL)	400			250		
SN ⁺ (μL)	13	38	63	13	38	63
Fibrinogène (μL)	100					
Thrombine (μL)	10					

Tableau 24 : Formulations de RIPs POE-BSA/Fb contenant le styrène ammonium (pour 1mL final).

Les matériaux contenant le benzyl ammonium sont synthétisés de la même manière que ceux contenant le Styrène Ammonium. Les compositions sont rassemblées dans le Tableau 25.

Formulation	RIP POE(2) BSA(8)BN ⁺ (x)/ Fb			RIP POE(5)BSA(5)BN ⁺ (x)/ Fb		
	BN ⁺ (1)	BN ⁺ (3)	BN ⁺ (5)	BN ⁺ (1)	BN ⁺ (3)	BN ⁺ (5)
I ₂₉₅₉ (μL)	269			424		
PEGDM (μL)	20			50		
BSAm (μL)	400			250		
BN ⁺ (μL)	14	42	69	14	42	69
Fibrinogène (μL)	100					
Thrombine (μL)	10					

Tableau 25 : Formulations de RIPs POE-BSA/Fb contenant le benzyl ammonium (pour 1mL final).

3.4. Matériaux à base de plasma

Le plasma sanguin humain nous a été généreusement donné par le Centre de Transfusion Sanguine des Armées (CTSA) de l'Hôpital d'Instruction des Armées (HIA) à Clamart.

Les gels de plasma sont synthétisés en mélangeant 20 mM de CaCl₂ avec du plasma, en présence ou non de thrombine à 0,2 U.mL⁻¹.

Pour synthétiser le RIP POE(10)/PL, 270 μL de solution d'I₂₉₅₉, 100 μL de PEGDM sont mélangés à 610 μL de plasma humain total. Après homogénéisation, 10 μL CaCl₂ 2M ainsi que 10 μL de thrombine à 20 U.mL⁻¹ sont ajoutés et la solution (1 mL) est immédiatement placée dans le moule qui est exposé à un rayonnement UV 365 nm à 37 °C pendant 1h.

Pour les RIPs POE-BSA/PL, la BSAm lyophilisée est préalablement solubilisée dans du plasma, à 37°C pendant au moins 1h30. Par exemple, pour un RIP POE(5)BSA(5)/PL, 60 mg de BSAm lyophilisée sont ajoutés à 822μL de plasma. Une fois la solution homogène, les autres composés sont ajoutés :

108µL d'une solution d'I₂₉₅₉ à 0,6%, 50µL de PEGDM, puis 10 µL CaCl₂ 2M ainsi que 10 µL de thrombine à 20 U.mL⁻¹. La solution placée dans le moule est ensuite exposé aux UV à 37 °C pendant 1h.

Pour tous ces matériaux à base de plasma, le rapport molaire entre l'I₂₉₅₉ et les fonctions méthacrylate reste inchangé, à 1 :40 (ce rapport a été déterminé pour obtenir une réticulation satisfaisante du PEGDM et de la BSA tout en conservant une concentration en fibrinogène la plus élevée possible).

Formulation	POE(2) BSA(8)/ PL	POE(3) BSA(7)/ PL	POE(4) BSA(6)/ PL	POE(5) BSA(5)/ PL
I ₂₉₅₉ (µL)	170	150	130	108
PEGDM (µL)	20	30	40	50
BSAm (mg)	94	82,4	70,5	60
Thrombine (µL)	10			
[Fibrinogène] finale mg.mL ⁻¹	3,95	4	4,05	4,11

Tableau 26 : Formulation des RIPs POE-BSA/PL (pour 1mL final).

4. Méthodes de caractérisation:

4.1. Quantification et analyse des fractions solubles :

4.1.1. Fractions synthétiques : Extraction par Soxhlet

Les matériaux sont préalablement séchés 24h dans une étuve à 37°C, puis sous vide dynamique (pompe à palette) à 30°C pendant au minimum 72h. Leur masse sèche ($m_{initiale}$) est ensuite mesurée. La proportion de précurseur synthétique non greffé au réseau de polymère est quantifiée par extraction solide/liquide pendant 48h dans un soxhlet avec de l'eau pour les matériaux à base de PVAm, du dichlorométhane pour les matériaux à base de POE ou de l'éthanol pour les matériaux contenant le Styrene Ammonium et le Benzyl Ammonium. Les protéines étant très peu solubles dans le dichlorométhane, elles ne sont pas extraites (cela a été vérifié en RMN). Elles le sont en revanche dans l'eau et dans l'éthanol. Les échantillons sont ensuite récupérés et séchés comme précédemment jusqu'à masse constante (m_{finale}). La fraction soluble contenue dans les matériaux ($T\%_{extractibles}$) est calculée comme :

$$T\%_{extractibles} = \frac{(m_{initiale} - m_{finale})}{m_{initiale}} \times 100$$

4.1.2. Fraction protéique

Les matériaux sont placés dans un volume 10 fois plus important de tampon Tris, pendant 72h à 37°C. Les fractions solubles protéiques (i.e. les protéines non greffées au réseau) sont quantifiées dans le surnageant soit par un dosage Bradford, soit par un test BCA (pour Acide Bicinchonique)

4.1.2.1. Dosage de Bradford

Le réactif de Bradford ($C_{47}H_{49}N_3NaO_7S_2$, H_3PO_4 , CH_3OH BioRad) est dilué au $1/5^e$ dans de l'eau déionisée. 10 μ L de solution à doser sont mélangés à 1 mL du réactif. La solution est laissée 5 min à température ambiante, puis l'absorbance est mesurée à 595 nm (Uvikon XS double faisceau, Secomam). Avant le dosage des solution, une gamme étalon de BSA a été préparée (0 - 1,4 mg.mL⁻¹) afin de définir la droite étalon dont l'équation est $ABS = 0,563$.

4.1.2.2. Dosage BCA

Pour déterminer la droite d'étalonnage, une gamme étalon de BSA est préparée (0 - 1,2 mg.mL⁻¹) et dosée. L'équation de cette droite est $ABS = 0,9453 C$. Pour doser la solution inconnue, 1 mL de réactif B ($CuSO_4.5 H_2O$ - Sigma-Aldrich) et 49 mL réactif A ($C_{20}H_{10}N_2O_4Na_2 + Na_2CO_3.H_2O + KNaC_4H_4O_6.4H_2O + NaOH + NaHCO_3$ -Sigma-Aldrich) sont mélangés. 50 μ L de solution à doser sont mélangés avec 1 mL du mélange de réactifs A et B. Après 30 min d'incubation à 37°C, l'absorbance de la solution est mesurée à 562 nm (UVmc², double faisceau, Safas).

4.1.2.3. Dosage ELISA du fibrinogène

Immédiatement après synthèse, les matériaux (600 μ L) sont incubés à 37°C pendant 12h dans 10 mL de tampon de fixation. 100 μ L de ce tampon sont transférés dans un puits d'une plaque (96 puits) traitée pour la culture cellulaire et incubés pendant 1 h à 37°C. Le puits est rincé 3 fois avec 200 μ L de tampon de rinçage. 200 μ L du tampon de saturation sont ajoutés et la plaque est incubée pendant 12h à 4°C. Le puits est ensuite rincé comme précédemment avant l'introduction de 100 μ L de solution d'anticorps primaires (dilution au 1/50000 de l'anticorps polyclonal anti fibrinogène produit chez le lapin avec du tampon de dilution). Après 1 h d'incubation à 37°C, le puits est à nouveau rincé avant l'introduction de 100 μ L de solution d'anticorps secondaire (dilution au 1/30000 d'anticorps (IgG) anti lapin couplé à l'alcaline phosphatase avec du tampon de dilution), puis la plaque est incubée 1 h à 37°C. Après rinçage, la réaction de développement est initiée par l'ajout de 200 μ L de la solution de 4-nitrophenyle phosphate hexahydrate disodique (pNPP) préparée extemporanément à 0,1% (P/V) dans un tampon diéthanolamine. Après 15 min de réaction à l'abri de la lumière, celle-ci est stoppée par l'ajout de 30 μ L de NaOH 3 M. La coloration obtenue est quantifiée par mesure d'absorbance à 405

nm sur un lecteur de plaques Bio Tek. Les courbes étalons sont réalisées pour chaque série de mesures. Chaque mesure est réalisée 3 fois pour chaque matériau issu de 3 synthèses différentes.

4.2. Dégradation chimique du réseau de fibrine

Le réseau de fibrine est extrait des différents matériaux par incubation dans du tampon de dégradation chimique, à 37C° pendant 48h.

4.2.1. Electrophorèse

Les gels de polyacrylamide à 10% sont formés d'un gel de concentration et d'un gel de résolution. Le gel de résolution est formé à partir d'un mélange contenant 375mM de Tris (pH 8.8), de l'acrylamide/bis acrylamide (Euromedex) à 10% (P/V) et 0,1% (P/V) de SDS. La polymérisation est amorcée par 0,1% (v/v) de Temed (GE Healthcare) et 0,05% (P/V) de persulfate d'ammonium. Le gel de concentration est ensuite ajouté au gel de résolution. Il contient 130 mM de Tris (pH 6.8), 4% (P/V) d'acrylamide/bis acrylamide (Euromedex) et 0,1% (P/V) de dodécyl sulfate de sodium (SDS 20%). La polymérisation est amorcée de la même manière que le gel de résolution.

8 µg de protéine présente dans la solution sont ajoutés à du tampon de Laemmli (BioRad) dans un rapport en volume de 1:1. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits. Les marqueurs de masses molaires utilisés sont « Precision plus protein all blue standards » (BioRad). La migration électrophorétique est réalisée avec le tampon de migration sous un ampérage constant de 30 mA.

Les gels sont colorés au moyen du kit AP Color (BioRad). Le tampon de développement est dilué au 25^{ème}. 1 mL de réactif AP Color A est mélangé à 1 mL de réactif AP Color B dans 100 mL de tampon de développement. La membrane est immergée dans la solution de développement ainsi préparée, et agitée à température ambiante jusqu'à l'obtention d'une coloration satisfaisante. La révélation est arrêtée en lavant la membrane dans de l'eau déionisée (2 x 10 min). Après coloration, les gels sont scannés à l'aide d'un scanner GS-800 calibrated Densitometer (BioRad). Les images sont ensuite analysées sur le logiciel Quantity one V : 4.6.7 (BioRad).

4.2.2. Western Blot :

Les échantillons de la solution de dégradation sont placés en migration sur le gel de polyacrylamide à 10% précédemment décrit. Les protéines sont ensuite transférées sur une membrane de nitrocellulose (BioRad) sous un voltage constant de 120 mV pendant 80 min dans un tampon de transfert. L'efficacité du transfert est vérifiée par une coloration au rouge ponceau. La membrane est ensuite saturée à l'aide d'un tampon de saturation pendant 1h, puis incubée 12h dans le tampon de

saturation comportant l'anticorps primaire anti fibrinogène humain dilué au 1/500. Elle est rincée 3 fois pendant 10 min avec le tampon de saturation avant d'être incubée pendant 2h à température ambiante avec une solution de tampon de saturation comportant l'anticorps secondaire anti lapin couplé avec l'ALP (Anti rabbit IgG + ALP). La membrane est à nouveau rincée 3 fois pendant 10 min avec le tampon de saturation, puis est rincée avec du tampon TBS afin d'éliminer le lait du tampon de saturation. La révélation des bandes est réalisée à l'aide du kit AP color (BioRad) et la membrane est scannée et les images sont analysées comme précédemment décrit.

4.3. Cycles séchage/hydratation :

Les matériaux sont synthétisés puis immergés dans le tampon de synthèse jusqu'à masse hydratée constante ($M_{hydratation 1}$). Les matériaux sont séchés 24h à température ambiante sous pression atmosphérique avant d'être placés sous vide à 30°C jusqu'à masse sèche constante (M_{sec1}). Le taux de gonflement initial (SR_1) est calculé selon la relation suivante :

$$SR_1 = \frac{M_{hydratation 1}}{M_{sec1}}$$

Les matériaux sont ensuite à nouveau immergés dans le tampon d'hydratation jusqu'à ce que la masse hydratée ($M_{hydratation 2}$) soit constante. Le taux d'hydratation (SR_2) a été déterminé après un nouveau séchage (M_{sec2}), par la relation :

$$SR_2 = \frac{M_{hydratation 2}}{M_{sec2}}$$

La réversibilité (%R) à la déshydratation peut être alors calculée en comparant les deux taux d'hydratation selon la relation :

$$\%R(1 \rightarrow 2) = \frac{SR_2}{SR_1} \times 100$$

4.3.1. Marquage du réseau de fibrine

Le réseau de fibrine a été visualisé dans les différents matériaux par immunofluorescence. Pour cela, le matériau est saturé dans un tampon PBS-caséine pendant 1h à 37°C. Il est ensuite incubé pendant 3h à 37°C dans une solution d'Ac-Fb FITC au 1/100^{ème} dans le PBS à 1% (P/V) de caséine. Le matériau est rincé 3 fois au tampon PBS avant d'être observé en microscopie confocale.

4.3.2. Microscopie

Les images de microscopie confocale ont été réalisées avec un microscope confocal inversé à balayage laser LSM 710 de Zeiss (Allemagne) équipé d'objectifs x10, x20 ou à immersion x63. Les images sont ensuite exploitées via le logiciel ImageJ.

Les images de microscopie électronique à balayage ont été réalisées avec microscope Philips XL 30 ESEM-FEG, à 20 kV et en mode « Low Vacuum ». Les hydrogels sont préalablement trempés dans de l'azote liquide et immédiatement placés sous vide avant de réaliser les clichés.

5. Analyses mécaniques

5.1. Analyse dynamique thermomécanique (DMA)

Ces analyses nécessitant des matériaux secs, les échantillons sont séchés à plat pendant 24h à 37°C dans une étuve, puis placés sous vide dynamique à 30°C pendant au moins 48h. Les matériaux d'une épaisseur moyenne de 0,5 mm sont découpés pour obtenir des rectangles d'environ 8-10 mm de longueur et de 5 à 8 mm de largeur. Les modules de conservation E' et de perte E'' sont mesurés de -70°C à 200°C avec une rampe de température de 3°C/min en appliquant une faible déformation de 0,05% à une fréquence fixe de 1Hz. Ces mesures sont réalisées à l'aide d'une DMA Q800 (TA instruments) en mode tension. Les données sont ensuite traitées sur le logiciel Universal Analysis V 4.3A (TA instruments).

5.2. Caractérisation rhéologique

Les modules de stockage G' et de perte G'' sont évalués sur un rhéomètre Physica MCR 301 (Anton Paar) équipé d'un four CTD 450 et d'un dispositif anti-évaporation à 37°C.

Les mesures *ex situ* sont réalisées sur des matériaux gonflés avec une géométrie plan/plan 25mm en aluminium. Les conditions de mesures sont une fréquence constante de 1 Hz et une déformation de 1% sans maintien de la force normale pendant 5 min ce qui permet de se trouver dans le domaine de linéarité des matériaux. Les valeurs de modules rapportées dans le manuscrit correspondent à une moyenne des mesures réalisées sur 4 échantillons et les barres d'incertitudes correspondent à l'écart-type.

Le suivi de la photopolymérisation *in situ* a été réalisé avec une géométrie cône (troncature : 2° soit 105µm)/plan (verre) couplé à une source U.V, (Figure 141 - Omnicure Serie 1000 -Exfo-puissance à 4% soit 4,46 mW/cm²). La solution des précurseurs est déposée sur le plan inférieur et est maintenue à 37°C. Le temps $t=0$ correspond à l'allumage des UV. Les paramètres G' et G'' sont mesurés à une déformation imposée de 1% appliquée à une fréquence de 1Hz.

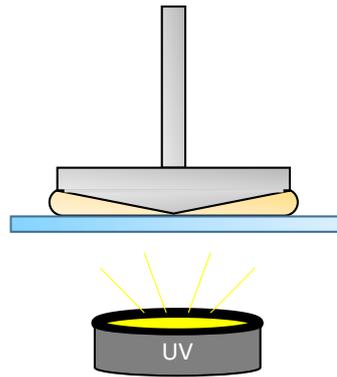


Figure 141 : système d'exposition aux UV in situ dans le rhéomètre.

6. Dégradation enzymatique des matériaux

La biodégradabilité des matériaux est étudiée en présence d'une enzyme modèle, la thermolysine, métalloprotéase d'origine bactérienne.

6.1. Suivi du relargage des fragments protéiques

Des matériaux de 100 μL sont synthétisés puis rincés dans 3 bains successifs de tampon Tris 50 mM de 10 mL (8h chaque). Les matériaux sont ensuite placés dans un volume de 10 mL de solution de thermolysine à $2\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$ dans du tampon Tris. Les échantillons sont incubés à 37°C sous agitation ($90 \text{ rpm} \cdot \text{min}^{-1}$). A des temps réguliers, 1 mL de la solution de dégradation est prélevé et l'absorbance à 280 nm est mesurée avec un spectrophotomètre UV/Visible double faisceau (UVmc², double faisceau, Safas). Ce prélèvement est ensuite réintroduit dans la solution de dégradation.

6.2. Evolution des modules viscoélastiques

Des matériaux de 1 mL (diamètre 2,6 cm) sont synthétisés et gonflés 24h dans du tampon Tris. Ils sont ensuite incubés dans une solution de thermolysine à $2\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Les modules de stockage et de perte sont mesurés avant mise en contact avec l'enzyme puis à des temps réguliers au moyen du rhéomètre. Par contre, la déformation de 1% sans maintien de la force normale n'est appliquée que pendant 30s pour que le temps de contact des matériaux avec la protéase soit le plus long possible. Après chaque mesure, le matériau est de nouveau placé dans la solution de thermolysine.

7. Biocompatibilité

7.1. Culture cellulaire

7.1.1. Mise en culture des lignées

La lignée cellulaire utilisée pour tester les matériaux à base de POE est la lignée FB-BJ qui sont des fibroblastes de derme humain issu de prépuce de nouveau-né (FB-BJ). Les conditions de culture sont présentées dans le Tableau 27.

Nom de la lignée	Type de milieu de culture		
	Milieu de culture minimum	Milieu de culture complet	Milieu de culture 2%
FB-BJ (ATCC CRL- 2522)	DMEM High glucose + Penicilline (20 U.mL ⁻¹)/ Streptomycine (20 U. mL ⁻¹)	DMEM High glucose + Penicilline(20 U.mL ⁻¹)/ Streptomycine (20 U.mL ⁻¹) + 10% (V/V) SVF	DMEM High glucose + Penicilline(20 U.mL ⁻¹)/ Streptomycine (20 U.mL ⁻¹) + 2% (v/v) SVF

Tableau 27 : lignée cellulaire et milieux de culture associés

Les lignées cellulaires sont cultivées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂. Les cellules sont utilisées à confluence et sont détachées de leur support de culture par un traitement à la trypsine EDTA. Après centrifugation et suspension du culot dans du milieu de culture complet, les cellules sont réensemencées à la concentration appropriée (FB-BJ : 13000 cellules/cm²). Il est recommandé d'éviter de travailler avec des FB-BJ dont le nombre de passages est supérieur à 15. Par conséquent, les populations de FB-BJ ont été utilisées entre 4 et 10 passages.

7.1.2. Conservation des cellules

Les cellules à confluence sont détachées des boîtes de culture par l'action de la trypsine-EDTA et sont centrifugées à 1000 rpm. Le culot cellulaire est repris dans un milieu de culture minimum avec 50 % (v/v) de SVF et 10 % (v/v) de diméthylsulfoxyde (DMSO). La suspension cellulaire est ensuite placée dans un cryotube (Corning) (1 à 2 x 10⁶ cellules/mL). Les tubes sont ensuite placés une nuit à -80°C dans un container « Mr Frosty » (Nalgene) afin d'assurer une baisse progressive de la température. Les cellules sont ensuite stockées dans l'azote liquide. La décongélation s'effectue rapidement en plongeant le cryotube directement dans un bain à 37°C. Les cellules sont ensuite mises en culture et le milieu est changé après 3h d'incubation à l'étuve à 37°C en atmosphère humide et 5% CO₂.

7.1.3. Ensemencement cellulaire sur les matériaux

Avant leur ensemencement, les matériaux sortis de synthèse sont placés dans des puits de plaque 24 puits et incubés pendant au minimum 24 h dans du milieu de culture complet pour les matériaux à base de POE, et dans du milieu minimum, pour les matériaux à base de plasma. Le milieu est ensuite aspiré et une suspension cellulaire de 1 mL à une concentration cellulaire de 10⁵ cellules.mL⁻¹

¹ est placée sur chacun des matériaux. Les FB-BJ sont cultivés entre 1 et 3 semaines sur les différents matériaux dans une étuve à 37°C en atmosphère humide et 5% de CO₂. Le milieu de culture complet est renouvelé toutes les semaines.

7.1.4. Viabilité cellulaire

Les surnageants des matériaux sont remplacés par une solution de PBS avec 0,2 µM de calcéine AM et de 0,2 µM de bromure d'éthidium homodimère. La plaque de culture est ensuite incubée à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO₂ pendant au minimum 30 min. Les matériaux sont ensuite extraits de leurs puits de culture et directement observés en microscopie confocale. Les émissions des deux fluorophores (Tableau 28) sont détectées simultanément (mode : séquentiel line).

Fluorophore	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Dichroïque	Plage d'émission mesurée (nm)
Calcéine AM	488	488/561	491-573
Homodimère d'éthidium-1	561	488/561	581-735

Tableau 28 : condition de mesure du test LIVE/DEAD.

7.1.5. Marquage des populations cellulaires

Les marquages fluorescents sont réalisés de la façon suivante : les cellules sont fixées dans une solution PBS-paraformaldéhyde à 3% (P/V) pendant 12h à 37°C, puis les matériaux sont rincés 3 fois avec du tampon PBS et sont conservés à 4°C. Les cellules sont ensuite perméabilisées grâce au tampon de perméabilisation durant 30 min à température ambiante et rincées 3 fois avec du tampon PBS. L'immunomarquage (Tableau 29) est effectué selon le protocole suivant: les échantillons sont tout d'abord saturés par une solution de saturation, pendant 45 min à température ambiante. 150 µL de solution d'anticorps primaires sont ensuite déposés sur chacun des matériaux. Après 45 min à 37°C et trois rinçages au tampon PBS, la solution secondaire est ajoutée comme précédemment. Après 45 min d'incubation, les échantillons sont rincés 3 fois avec du tampon PBS et stockés à 4°C.

Solution d'anticorps primaires	Solution secondaires
Ac-Coll, dilution au 1/200.	Ac-Souris 488, dilution 1/100.
Ac-Fn, dilution 1/200	Ac-Lapin 568, dilution 1/100.
	DAPI, dilution 1/10000
	Ph-532, dilution 1/100.

Tableau 29 : Combinaison de sondes pour l'immunomarquage des cellules cultivées en surface des différents matériaux.

Les observations sont réalisées au microscope confocal. La fluorescence des marqueurs est mesurée piste par piste sur les trois détecteurs (photomultiplicateur, PMT). La procédure d'acquisition

des images (composition des pistes, lasers et dichroïques associés) permettant de limiter les superpositions d'émission de fluorescence des marqueurs est résumée dans le Tableau 30.

Numéros de la piste	PMT	Fluorochrome	Longueur d'onde d'excitation (nm)	Dichroïque	Plage d'émission mesurée (nm)
1	Ch1	Dapi	405	488/561/633 + 405	394-491
2	ChS1	Alexa 488	488	488/561/633 + 405	494-533
3	ChS1	Alexa 532	514	458/514 + 405	552-591
4	Ch2	Alexa 568	561	488/561/633 + 405	630-750

Tableau 30 Paramètres d'acquisition pour la microscopie confocale du quadruple marquage

7.2. Cytotoxicité de l'amorceur

7.2.1. Détermination de la viabilité cellulaire par test au Bleu Trypan

Les cellules sont ensemencées dans des plaques 24 puits à raison de 40 000 cellules par puits et incubées pendant 24h à 37°C en présence de 5% CO₂. Le milieu de culture est ensuite remplacé par les mélanges présentés dans le Tableau 31. Pour chaque condition, 6 puits sont préparés. 3 puits sont exposés aux UV pendant 1 h, tandis que les 3 autres sont simplement incubés à 37°C pendant la même durée.

Condition n°	Contenu du puits
1	Milieu de culture
2	Milieu de culture + I ₂₉₅₉ 0,042 % (P/V)
3	Milieu de culture + I ₂₉₅₉ 0,21 % (P/V)
4	Milieu de culture + I ₂₉₅₉ 0,21 % (P/V) + PEGDM 5% (P/V) + BSAm 5% (P/V)
5	Milieu de culture + Staurosporine
6	Milieu de culture + Fibrine 0,5 % (P/V)

Tableau 31 : mélanges mis en présence des fibroblastes BJ en présence ou en absence d'UV.

À l'issue de l'incubation, le surnageant est récupéré, puis les cellules sont rincées avec du PBS et détachées par de la trypsine EDTA (5 min à 37°C). Après centrifugation et suspension du culot dans du milieu complet, les cellules sont mélangées à une solution de Bleu Trypan (20%). Les cellules dont les membranes sont intactes excluent le colorant et apparaissent incolores, tandis que celles colorées en bleu sont considérées comme non-viables. Une goutte de 20µL de ce mélange est déposée dans un hémacytomètre (cellule de Malassez) et les cellules viables et mortes sont comptées visuellement. Le pourcentage de viabilité est calculé de la façon suivante :

$$\% \text{ viabilité} = \frac{\text{Nombre de cellules vivantes}}{\text{Nombre de cellules total}}$$

8. Activité bactéricide

8.1. Souches bactériennes

Les bactéries utilisées proviennent de souches de référence de l'Institut Pasteur. Elles sont conservées à -20°C dans du milieu de culture contenant 30% de glycérol. Deux souches ont été utilisées :

- *Staphylococcus epidermidis* est un bacille Gram positif habituellement considéré comme membre de la flore commensale de la peau et des muqueuses saines, mais aussi un pathogène nosocomial chez les patients immunodéprimés. La souche CIP 68.21 est utilisée pour les expériences.
- *Escherichia coli* est un bacille intestinal Gram négatif généralement commensal. La souche CIP 56.117 est utilisée. Certaines souches pathogènes peuvent provoquer des gastro-entérites, des infections urinaires, ou des méningites.

Les deux souches bactériennes sont cultivées dans un milieu unique : Trypticase Soja (TS Broth) à 37°C.

8.2. Mesure de l'effet inhibiteur des traitements en culture planctonique

La concentration minimale inhibitrice (CMI) est définie comme la plus faible concentration en antiseptique permettant l'inhibition visible de la croissance bactérienne en 24h. La CMI est déterminée par la méthode des dilutions successives.

Les bactéries sont mises en culture pendant une nuit à 37°C et re-suspendues dans du milieu de culture TS afin d'obtenir une suspension bactérienne calibrée à 10^6 UFC.mL⁻¹ (soit une absorbance de 0,001 à 595 nm). Les plaques 24 puits sont inoculées avec la suspension bactérienne calibrée (500µL/puits). L'antiseptique à différentes concentrations est préparé dans une solution saline (NaCl 0,9% P/V), puis ajouté à l'inoculum bactérien (500 µL/puits). Au bout de 24h d'incubation à 37°C, la concentration en ammonium quaternaire pour laquelle il n'y a pas de trouble visible est déterminée.

8.3. Mesure de l'effet bactéricide des traitements en culture planctonique

La Concentration minimale bactéricide (CMB) est la plus faible concentration en produit pour laquelle au plus 0,01 % de bactéries par rapport à l'inoculum de départ (soit au maximum 1 bactérie pour 10 000 bactériesensemencées) survivent.

Après détermination de la concentration minimale inhibitrice, un prélèvement à l'anse calibrée de 10 μ L a été réalisé dans chacun des puits ne présentant aucun trouble visible. Chaque prélèvement a été déposé en strie sur gélose PCA. La boîte ensemencée est incubée 24h à 37°C.

Pour chaque strie, le nombre des colonies prélevées dans les puits contenant le traitement est comparée au nombre de colonies obtenues avec l'inoculum sans traitement dilué 0, 10, 100 et 1000 fois. On obtient ainsi le pourcentage de survie des bactéries au traitement.

8.4. Mesure de la diffusion de molécules vers un milieu gélosé

Les bactéries sont mises en culture pendant une nuit à 37°C et re-suspendues dans du milieu de culture afin d'obtenir au final une suspension bactérienne calibrée à 10⁶ UFC.mL⁻¹. 3mL de cette suspension calibrée sont ensemencés sur une gélose non spécifique pour dénombrement (gélose TS).

Le surplus est retiré, et la gélose est placée à 37°C pendant 15 min. Le matériau de 100 μ L (soit un diamètre de 6 mm) est déposé au centre de la gélose. Après 24h d'incubation à 37°C, le halo d'inhibition provoqué par le sel d'ammonium est visualisé.

8.5. Dénombrement des bactéries viables en contact avec le matériau

Après 24h d'incubation avec ou sans traitement, les puits des plaques 24 puits contenant des lamelles de verre sont rincés 2 fois avec une solution saline ([NaCl]=9 g.L⁻¹). Les plaques subissent une sonication de 2x10min avec changement du milieu à chaque nouveau bain (500 μ L de solution saline par puits). Les suspensions sont récupérées, puis aliquotées. Les prélèvements subissent une série de dilutions en cascade à raison de 8 dilutions testées de 10⁰ à 10⁻⁷(Figure 142).

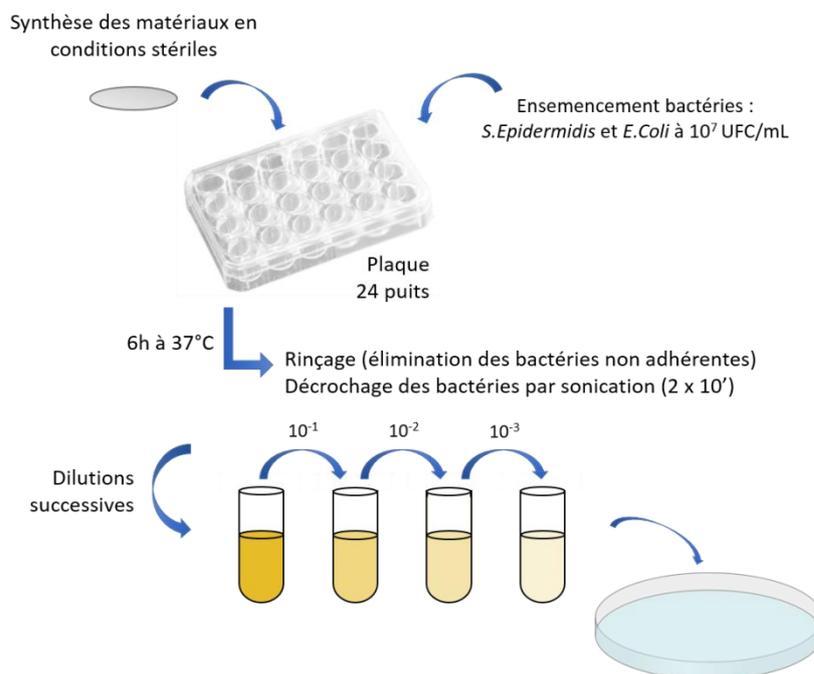


Figure 142 : protocole de dénombrement des bactéries viables en surface du matériau.

8.6. Evaluation de l'impact des fragments de dégradation des RIPs sur la viabilité bactérienne

Des matériaux contenant le sel d'ammonium sont incubés pendant 3 jours en présence de Thermolysine à 10 U.mL^{-1} . Le surnageant est alors mélangé à une suspension bactérienne calibrée à 10^6 UFC.mL^{-1} dans une plaque 24 puits et incubé 24h à 37°C . La quantité de bactérie présente dans chaque puits est évaluée par mesure de l'absorbance à 600 nm après homogénéisation du contenu de chaque puits.

9. Analyses statistiques

Les données sont exprimées par la moyenne \pm l'écart-type d'au moins 3 expériences indépendantes. Le test de Student (t.Student) est utilisé pour déterminer les différences significatives entre les résultats. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Liste des figures et des tableaux

1. Liste des figures

Figure 1 : représentation schématique des principaux composants de la matrice extracellulaire ¹⁰ ...	20
Figure 2 : représentation schématique de la structure de la fibronectine.	21
Figure 3 : représentation schématique de la laminine ¹²	22
Figure 4 : structure schématique des protéoglycanes ¹²	22
Figure 6 : structure générale d'un réseau de polymère dans un gel physique ou chimique	24
Figure 7 : classification des hydrogels d'après leurs différentes catégories de propriétés	25
Figure 8 : représentation schématique de la formation d'un hydrogel (superhélices)	27
Figure 9 : exemples de polymères thermosensibles	28
Figure 10 : hydrogels formés par stéréocomplexation de copolymères à blocs étoile PEG et PLA.....	28
Figure 11 : Macromolécules pour préparer des hydrogels par formation de bases de Schiff.....	29
Figure 12 :schéma de synthèse d'hydrogels par addition de type Michael ³⁴	30
Figure 13 : préparation d'hydrogels par formation de liaisons peptidiques.....	31
Figure 14 : préparation d'hydrogels par chimie click.	31
Figure 15 : schéma de réactions enzymatiques pour un polypeptidique ou un polysaccharide.....	32
Figure 16 : Décompositon de photoamorceurs de polymérisation radicalaire	34
Figure 17 : synthèse d'hydrogels par stéréocomplexation et photoréticulation.....	35
Figure 18 : illustration schématique de la formation de vaisseaux sanguins.....	38
Figure 19 : unités de répétition hydrolysables.....	39
Figure 20 : représentation schématique de la synthèse et de la dégradation enzymatique.....	40
Figure 21 : représentation schématique de l'érosion de surface et la dégradation dans la masse.....	41
Figure 22 : modules d'Young des tissus mous et organes <i>in vivo</i> (hydratés), en kPa.	42
Figure 23 : différentes méthodes de mesure des propriétés mécaniques	43
Figure 24 : stratégies d'amélioration de la survie cellulaire par modifications des hydrogels.....	45
Figure 25 : exemples de mécanismes de délivrance/relargage des hydrogels.....	48
Figure 26 : principe de l'encapsulation cellulaire.....	49
Figure 27 : polymères utilisés pour la synthèse des hydrogels en ingénierie tissulaire	50
Figure 28 : cellules L929 cultivées sur une surface recouverte de PEG et une surface de verre.....	52

Figure 29 : structure chimique de l'acide hyaluronique.....	54
Figure 30 : structure chimique du chitosane.....	55
Figure 31 : Gélification ionotropique de l'alginate.....	56
Figure 32 : représentation schématique de l'assemblage du collagène.....	57
Figure 33 : Structure tridimensionnelle du fibrinogène déterminée par diffraction des rayons X.....	59
Figure 34 : représentation schématique de la formation du réseau de fibrine in vivo ¹⁵⁷	60
Figure 35 : stratégies pour améliorer les propriétés des hydrogels	63
Figure 36 : illustration schématique de l'assemblage des hydrogels de fibrinogène PEGylé.	64
Figure 37 : structure tridimensionnelle de l'albumine humaine.....	65
Figure 38 : formation d'un réseau de PEG multifonctionnel catalysée par la transglutaminase.....	67
Figure 39 : macromère de PEG-maléimide à 4 bras.....	68
Figure 40 : représentation schématique de la synthèse simultanée et séquentielle des RIPs	69
Figure 41 : images CLSM de fibroblastes de derme humain dans un semi-RIP PEG/AH.....	70
Figure 42 : représentation schématique du RIP formé à partir de 4 AH fonctionnalisés.	72
Figure 43 : fabrication de matériaux par photolithographie et lyophilisation.....	74
Figure 44 : schéma de synthèse des RIP à base de PVAm et de fibrinogène.....	79
Figure 45 : schéma de synthèse des RIP coréseaux à base de PVA, BSAm et fibrinogène.	80
Figure 46 : Taux de gonflement des hydrogels à base de PVA (déshydratation/ hydratation)	82
Figure 47 : réversibilité à l'hydratation des matériaux à base de PVA.....	83
Figure 48 : Observation CLSM du réseau de fibrine après synthèse ou réhydratation	84
Figure 49 : évolution des RIPs à base de PVA dans une solution de thermolysine.....	86
Figure 50 : modules de stockage des RIP à base de PVA dans une solution de thermolysine.....	87
Figure 51 : absorbance à 280 nm de la solution de Termolysine à 10 U.mL ⁻¹	88
Figure 52 : représentation de Lineweaver-Burk pour les RIP à base de PVA.....	89
Figure 53 : photographies d'aliqouts de PVAm avant et après stérilisation	91
Figure 54 : schéma présentant la formation d'un réseau de POE	94
Figure 55 : photos des différents coréseaux POE-BSA	96
Figure 56 : fractions solubles protéiques et synthétiques contenues dans les coréseaux POE-BSA	96
Figure 57 : modules viscoélastiques des coréseaux POE-BSA.....	97
Figure 58 : schéma de la synthèse des RIPs coréseaux.....	98
Figure 59 : Extractibles synthétiques et protéiques en fonction du rapport méthacrylate/I ₂₉₅₉	99
Figure 60 : modules de stockage des RIPs POE-BSA/Fb en fonction du rapport méthacrylate/I ₂₉₅₉ . .	100
Figure 61 : extractibles synthétiques et protéiques en fonction du temps d'exposition aux UV	101
Figure 62 : modules de stockage en fonction du temps d'exposition aux UV (365 nm).....	102
Figure 63 : photos de matériaux exposés aux UV (365 nm) pendant 2h à 37°C.....	103

Figure 64 : Allure des courbes de G' au cours du temps et temps de gel des matériaux	104
Figure 65 : aspect des matériaux en sortie de synthèse.	105
Figure 66 : Western Blot contre Fg des différents RIPs POE(x)BSA(y)/Fb	106
Figure 69 : Modules des différents RIPs POE-BSA/Fb [albumine non modifiée].	108
Figure 68 : Module de stockage and $\tan\delta$ de RIPs POE-BSA/Fb secs.	109
Figure 70 : comparaison des modules de stockage des coréseaux et des RIPs POE-BSA/Fb.....	110
Figure 71 : immunomarquage du réseau de fibrine au sein des RIPs POE-BSA/Fb	112
Figure 72 : images MEB du RIP BSA(10)/Fb et du RIP POE(10)/Fb.....	113
Figure 73 : images MEB du RIP POE(2)BSA(8)/Fb ; POE(5)BSA(5)/Fb ; POE(8)BSA(2)/Fb.	114
Figure 74 : Taux de gonflement des différents matériaux	115
Figure 75 : réversibilité à l'hydratation des différentes formulations de RIPs POE-BSA/Fb.	116
Figure 76 : photos des différents RIPs après incubation dans une solution de thermolysine	117
Figure 77 : cinétique de dégradation des RIPs POE-BSA/Fb : absorbance à 280 nm	118
Figure 79 : comparaison des valeurs de l'absorbance du surnageant après 48h de dégradation.....	120
Figure 80 : linéarisation de Lineweaver-Burk pour la dégradation des RIPs POE-BSA/Fb	121
Figure 81 : valeurs normalisées des modules de stockage lors de la dégradation	122
Figure 82 : modules de stockage après 7h de dégradation	123
Figure 83 : images MEB du RIP POE(10)/Fb avant et après 24h d'incubation dans la TL	124
Figure 84 : images MEB des RIPs POE-BSA/Fb avant et après 24h d'incubation dans la TL	125
Figure 85 : viabilité cellulaire à la surface des RIPs.	128
Figure 86 : Observation CLSM morphologie cellulaire à 24, 72h, 1 et 3 semaines(côté Téflon)	130
Figure 87 : Observation CLSM de la répartition de la fibronectine à la surface « côté Téflon »	131
Figure 88 : Observation CLSM morphologie cellulaire - face exposée aux UV.	132
Figure 89 : Observation CLSM de la répartition de la fibronectine à la surface exposée aux UV.....	134
Figure 90 : cytotoxicité de l' I_{2959} sur des fibroblastes BJ	136
Figure 91 : formation d'un biofilm.	140
Figure 92 : structure chimique du poly- ϵ -lysine et polyéthylèneimine.	143
Figure 93: structure de quelques sels d'ammonium et de phosphoniums quaternaires	143
Figure 94 : structure chimique de SN^+ et BN^+	144
Figure 95 : détermination de la CMI de SN^+ et BN^+ sur <i>S. epidermidis</i> et <i>E. coli</i>	146
Figure 96 : schéma de la synthèse des coréseaux POE-BSA incorporant le styrène ammonium	147
Figure 97 : photos des RIPs POE-BSA/Fb contenant différentes proportions de SN^+ et BN^+	148
Figure 98 : solutions de SN^+ à différentes concentrations dans C_2H_6O et CH_2Cl_2	149
Figure 99 : images MEB du RIP POE(2)BSA(8) $SN^+(1)$ /Fb et du RIP POE(2)BSA(8) $SN^+(5)$ /Fb.....	151
Figure 100 : images MEB des RIP POE(5)BSA(5) $SN^+(1)$ /Fb et RIP POE(5)BSA(5) $SN^+(5)$ /Fb	152

Figure 101 : modules de stockage des RIPs POE(2)BSA(8)SN ⁺ (z)/Fb et POE(5)BSA(5)SN ⁺ (z)/Fb.....	153
Figure 102 : G' des RIPs POE-BSA/Fb avec du SN ⁺ , du BN ⁺ du PEGDM « supplémentaire »	154
Figure 103 : apparition des fragments protéiques lors de la dégradation des RIP avec SN ⁺ (x)	155
Figure 104 : Module de stockage des différents RIPs POE-BSA-SN ⁺ (z)/Fb lors de la dégradation.....	157
Figure 105 : comparaison de la dégradation du POE(2)BSA(8)SN ⁺ (3)/Fb et POE(5)BSA(5)/Fb.....	158
Figure 106 : pourcentage de BN ⁺ relargué des RIPs contre tampon à pH 2.....	160
Figure 107 : photographie de géloses recouvertes de colonies de <i>E.coli</i> ou <i>S.epidermidis</i>	161
Figure 108 : photographies de géloses [RIPs gonflés avec du PHMB à 0,2%, SN ⁺ 1% et SN ⁺ 5%].....	161
Figure 109 : bactéries viables après 6h contact avec les RIPs POE-BSA/Fb [3% SN ⁺ /BN ⁺].	163
Figure 110 : bactéries viables après 6h contact avec les RIPs.....	164
Figure 111 : biomatériaux dérivés du sang actuellement utilisés en clinique	169
Figure 112 : structure typique d'un réseau de fibrine (2,5 mg.mL ⁻¹)	170
Figure 113 : préparation de la fibrine riche en plaquette (PRF) d'après Masoudi <i>et al</i> ²⁶⁸	171
Figure 114 : tests macroscopiques de la gélification du plasma	174
Figure 115 : suivi rhéologique de la gélification du plasma.	175
Figure 116 : images CLSM du réseau de fibrine dans le plasma gélifié et le fg purifié	175
Figure 117 : images de différents RIPs POE-BSA/plasma total.....	177
Figure 118 : immunomarquage du réseau de fibrine au sein des RIPs POE-BSA/PL.....	178
Figure 119 : diamètre moyen des fibres de fibrine dans les différents RIPs POE-BSA/PL	179
Figure 120 : modules de stockage G' et de perte G'' des différents RIPs POE-BSA/PL.....	180
Figure 122 : évolution du module de stockage G' des RIPs POE-BSA/PL lors de la dégradation.	181
Figure 123 : module de stockage au plateau RIPs POE-BSA/PL.	182
Figure 124 : photos des RIPs POE-BSA/PL après 9h d'immersion dans la solution de TL.	182
Figure 125 : suivi du relargage des fragments protéiques RIPs POE-BSA/PL.....	183
Figure 126 : vitesse initiale calculée à t = 2h de dégradation et absorbance au plateau	183
Figure 128 : photographies des RIPs à base de plasma lyophilisés.....	184
Figure 129 : viabilité cellulaire et nombre de FB-BJ en surface des RIPs POE-BSA/PL.....	185
Figure 131 : observation CLSM de la morphologie des fibroblastes BJ.....	187
Figure 132 : images CLSM du collagène de type I et de la fibronectine.....	188
Figure 133 : viabilité cellulaire des fibroblastes BJ en surface des RIPs POE-BSA/PL (2% SVF).	190
Figure 134 : nombre de cellules par unités de surface RIPs POE-BSA/PL (2% SVF).	192
Figure 135 : observation CLSM de la morphologie des fibroblastes BJ (2% SVF) et Fibronectine	194
Figure 136 : observation CLSM de la morphologie des fibroblastes BJ (2% SVF)	195
Figure 137 : aspect macroscopique des RIP à base de de PVA et de protéines humaines	228
Figure 138 : Western Blot contre le Fg pour matériaux protéines humaines.....	228

Figure 139 : propriétés viscoélastiques des RIP à base de protéines humaines.....	230
Figure 140 : dégradation enzymatique protéines humaines.	231
Figure 141 : matériaux à base de PVA et de PL.....	232
Figure 142 : Western Blot pour matériaux PVA/PL.....	233
Figure 143 : propriétés viscoélastiques des matériaux à base de plasma.	235
Figure 144 : résultats de dégradation par la thermolysine à 10 U.mL ⁻¹	236
Figure 145 : photographie du moule dans lequel sont réalisées les synthèses.....	242
Figure 146 : système d'exposition aux UV in situ dans le rhéomètre.	251
Figure 147 : protocole de dénombrement des bactéries viables en surface du matériau.	257

2. Liste des Tableaux

Tableau 1 : tableau présentant les principales propriétés des hydrogels conçus pour une application en ingénierie tissulaire.	78
Tableau 2 : groupements réactifs terminaux des différents macromères de PEG disponibles commercialement	94
Tableau 3 : moles de méthacrylate, d'I ₂₉₅₉ , et rapport méthacrylate:I ₂₉₅₉ pour les deux séries de RIP POE-BSA/Fb synthétisées avec une masse d'I ₂₉₅₉ constante.....	99
Tableau 4 : Fractions solubles protéiques et synthétiques contenues dans les différents RIPs.....	106
Tableau 5 : absorbance des solutions de PEGDM, BSA et Fg à 1 mg.mL ⁻¹	120
Tableau 6 : valeurs des modules de stockage des RIPs POE-BSA/Fb en fonction du temps d'incubation à 37°C dans la solution de thermolysine à 2U.mL ⁻¹	122
Tableau 7 : concentrations finales en I ₂₉₅₉ introduites lors de la synthèse des différents RIPs POE-BSA/Fb.....	135
Tableau 8 : solutions mises en présence des fibroblastes BJ en présence ou en absence d'UV.	135
Tableau 9 : coefficients d'extinction molaire des sels d'ammonium utilisés, exprimés en L.mol ⁻¹ .cm ⁻¹	145
Tableau 10 : taux d'extractibles protéiques et synthétiques contenus dans les RIPs avec les différents sels d'ammonium.	149
Tableau 11 : taille approximative du cercle d'inhibition observé autour des matériaux gonflés dans différentes solutions de Styrène Ammonium et de PHMB (contrôle positif).	162
Tableau 12 : fractions solubles protéiques et synthétiques contenues dans les RIPs à base de plasma.	177

Tableau 13 : viabilité en % des fibroblastes cultivés en surface de RIPs à base de fibrinogène ou de plasma après 21 jours en milieu minimum (2% SVF).	191
Tableau 14 : nombre moyen de cellules/mm ² après 3 semaines de culture en milieu minimum (2% SVF) des fibroblastes BJ en surface de RIP à base de fibrinogène ou de plasma.....	193
Tableau 15 : fractions solubles synthétiques et fibrinogène non réticulés pour les RIP à base de protéines humaines.....	229
Tableau 16 : fractions solubles synthétiques et fibrinogène non lié contenus dans les matériaux à base de plasma après 96h d'extraction au soxhlet (pour les extractibles synthétiques) ou 24h d'extraction à 37°C (pour le fibrinogène).	234
Tableau 17 : réactifs utilisés.	238
Tableau 18 : Tampons utilisés dans l'étude.	239
Tableau 19 : caractéristiques de protéines utilisées.	239
Tableau 20 : récapitulatif des différents anticorps utilisés.	239
Tableau 21 : Formulation des RIPs à base de PVAm (pour 1mL final).....	243
Tableau 22 : formulation des RIP à base de POE ou de BSA et de fibrine (pour 1mL final).	244
Tableau 23 : Formulations de RIP POE-BSA/Fb (pour 1mL final).	244
Tableau 24 : Formulations de RIPs POE-BSA/Fb contenant le styrène ammonium (pour 1mL final).	245
Tableau 25 : Formulations de RIPs POE-BSA/Fb contenant le benzyl ammonium (pour 1mL final)...	245
Tableau 26 : Formulation des RIPs POE-BSA/PL (pour 1mL final).	246
Tableau 27 : lignée cellulaire et milieux de culture associés	252
Tableau 28 : condition de mesure du test LIVE/DEAD.	253
Tableau 29 : Combinaison de sondes pour l'immunomarquage des cellules cultivées en surface des différents matériaux.....	253
Tableau 30 Paramètres d'acquisition pour la microscopie confocale du quadruple marquage.....	254
Tableau 31 : mélanges mis en présence des fibroblastes BJ en présence ou en absence d'UV.	254

Résumé

L'ingénierie tissulaire vise à régénérer des organes ou des tissus lésés. Ainsi, les gels de fibrine sont largement utilisés pour la reconstruction de différents tissus. Cependant, à concentration physiologique, ils ne peuvent pas être manipulés. Pour améliorer leurs propriétés mécaniques, ils peuvent être combinés dans une architecture de Réseaux Interpénétrés de Polymères (RIP) à un réseau de polymère synthétique (PVA ou POE). Ces RIPs peuvent être rendus biodégradables en copolymérisant d'albumine bovine de sérum modifiée par des groupements méthacrylate (BSAm) avec le partenaire synthétique.

Selon leurs compositions, ces matériaux peuvent être complètement dégradés ou fragmentés après quelques jours en présence de thermolysine, une enzyme protéolytique. Ces cinétiques de dégradation de ces RIPs ont été étudiées en suivant le relargage des fragments protéiques hors du matériau, d'une part, et la diminution de leurs propriétés viscoélastiques, d'autre part. Leur biocompatibilité a été vérifiée : des fibroblastes cultivés à leur surface présentent une viabilité supérieure à 90% après 5 semaines de culture et leur prolifération est suivie de la synthèse de macromolécules de la Matrice Extracellulaire.

Afin de leur ajouter une action bactéricide et d'augmenter encore leur résistance mécanique, des sels d'ammonium ont également été incorporés à certains de ces RIPs. Enfin, la synthèse de tels RIP a été mise au point à partir de plasma sanguin. Les éventuels phénomènes de rejet lors de leur intégration au sein du corps devraient ainsi être limités. De plus, le plasma sanguin contenant un grand nombre de facteurs de croissance et de molécules bioactives, la réparation tissulaire devrait ainsi être améliorée.

Mots clefs : hydrogel, réseaux interpénétrés de polymères, fibrine, POE, PVA, Albumine, biodégradabilité, biocompatibilité, plasma, ingénierie tissulaire, rhéologie

Abstract

Tissue engineering aims to regenerate deficient tissues and organs. Fibrin gels are widely used for the reconstruction of various tissues. However, at physiological concentration, they can't be handled. To improve their mechanical properties, they can be combined with a synthetic polymeric network (PVA or PEO) in an Interpenetrating Polymer Network (IPN) architecture. These IPN can be made biodegradable by crosslinking the Bovine Serum Albumin modified by methacrylate groups (BSAm) with the synthetic partner.

Depending on the composition, these materials can be fully degraded or fragmented after several days of incubation with thermolysin, a proteolytic enzyme. The degradation kinetics of these hydrogels were studied by following the release of proteic fragments from the material and by the loss of viscoelastic properties. The biocompatibility was also verified: fibroblasts cultivated on the surface show a viability of over 90% after 5 weeks of culture and the proliferation is followed by the synthesis of Extracellular Matrix macromolecules.

To add a bactericide property, and to increase their mechanical resistance, ammonium salts were incorporated in those IPN. Lastly, the synthesis of these IPN were adapted, starting from whole blood plasma. Rejection phenomena upon implantation should thus be hindered. Moreover, blood plasma contains a wide variety of growth factors and bioactive molecules, which should improve tissue regeneration.

Keywords: hydrogel, interpenetrating polymer network, fibrin, PEO, PVA, albumin, biodegradability, biocompatibility, plasma, tissue engineering, rheology.