



**HAL**  
open science

# D'un matériau innovant vers un pansement actif et un substitut cutané

Laurent Bidault

► **To cite this version:**

Laurent Bidault. D'un matériau innovant vers un pansement actif et un substitut cutané. Médecine humaine et pathologie. Université de Cergy Pontoise, 2012. Français. NNT: 2012CERG0611 . tel-00844139

**HAL Id: tel-00844139**

**<https://theses.hal.science/tel-00844139v1>**

Submitted on 27 Nov 2014

**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.

THESE

Présentée pour l'obtention du grade de Docteur de l'Université de Cergy-Pontoise

## Science de la Vie et de la Santé

Spécialité : Biomatériaux

# D'un matériau innovant vers un pansement actif et un substitut cutané

Par

**Laurent BIDAULT**

Au sein de l'Institut des Matériaux de Cergy-Pontoise (Imat) :

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

Soutenance prévue le 19 décembre 2012

Devant le jury composé de :

<b>C. Egles</b>	Professeur de l'université de technologie de Compiègne	<i>Rapporteur</i>
<b>V. Langlois</b>	Professeur de l'université Paris 12	<i>Rapporteur</i>
<b>J.-J. Lataillade</b>	Professeur de l'hôpital Militaire Percy	<i>Examineur</i>
<b>B. Mortaigne</b>	Représentant de la DGA	<i>Examineur</i>
<b>C. Vancaeyzele</b>	Maître de conférences de l'université de Cergy-Pontoise	<i>Examineur</i>
<b>O. Fichet</b>	Professeur de l'université de Cergy-Pontoise	<i>co-Directrice de thèse</i>
<b>V.Larreta-Garde</b>	Professeur de l'université de Cergy-Pontoise	<i>co-Directrice de thèse</i>

# REMERCIEMENTS :

Ces travaux de thèse ont été réalisés au sein des équipes ERRMECe et LPPI, toutes deux membres de l'institut des matériaux de Cergy-Pontoise.

Je tiens à remercier la DGA pour avoir sélectionné ce sujet et l'avoir financé, me permettant ainsi de présenter ces travaux aujourd'hui.

Mes profonds remerciements aux professeurs Valérie Langlois et Christophe Egles pour avoir accepté la charge d'être rapporteurs de ces travaux. Un grand merci également au professeur Jean-Jacques Lataillade et au docteur Bruno Mortaigne pour avoir accepté de faire partie de mon jury. J'espère que ce manuscrit sera digne de leurs intérêts.

Mes remerciements les plus sincères aux professeurs Véronique Larreta-Garde et Odile Fichet pour m'avoir permis de réaliser cette thèse sous leur encadrement. Un remerciement tout particulier au maître de conférence Cédric Vancaeyzeele pour son aide de tous les instants !

Merci à Mathilde pour les indénombrables coups de main pour la biologie cellulaire et les décompressions confocale.

Un grand merci également à Rémy, couteau-suisse vivant de la biochimie.

Un grand merci enfin à tous les thésards du LPPI et d'ERRMECe pour leur bonne humeur, leur aide et leur soutien.

*A ma famille et à mes amis qui ont été toujours derrière moi pour me pousser quand les expériences ne voulaient pas. Et tout mon amour à Lucie, ma précieuse compagne qui, même en n'ayant rien signé, a passé également une thèse sur le renforcement moral quotidien d'un doctorant.*

# Liste des abréviations :

**Ac** : anticorps

**BSA** : sérum albumine bovine

**BSAm** : sérum albumine bovine méthacrylate

**CHD** : cyclohexanedione

**CHO** : cellules d'ovaire de hamster chinois

**CLSM** : microscopie confocale

**Coll** : collagène de type I

**DMA** : analyse mécanique dynamique

**DMEM High glucose**: milieu de culture adapté à la lignée de fibroblaste de derme humain issue de prépuce de nouveau né

**DSC** : scan de calorimétrie différentiel

**Fb** : fibrine

**FB-BJ** : lignée de fibroblaste de derme humain issue de prépuce de nouveau né

**FITC** : isothiocyanate de fluorescéine

**Fg** : fibrinogène

**Fn** : fibronectine

**FTIR** : spectroscopie à infrarouge

**Ha** : acide hyaluronique

**HAMF12** : milieu de culture adapté aux cellules d'ovaire de hamster chinois

**HEMA** : hydroéthyle méthacrylate

**RIP** : réseaux interpénétrés de polymères

**RIP POEX/Fb(Z%)** : réseaux interpénétrés de polymères entre un réseau de polyoxyde d'éthylène formé par un monomère de polyoxyde éthylène glycol diméthacrylate de masse molaire X et un réseau de fibrine à une concentration massique Z.

**RIP PVAm(Y%)/Fb**: réseaux interpénétrés de polymères entre un réseau d'alcool polyvinylique méthacrylate à une concentration massique Y et un réseau de fibrine à une concentration 0,5% (w/v)

**RIP PVAm(Y%)coBSAm(W%)/Fb** : réseaux interpénétrés de polymères entre un coréseau formé d'alcool polyvinilyque méthacrylate et de la sérum albumine bovine méthacrylate à des concentrations massiques respectives de Y et W et un réseau de fibrine à une concentration 0,5% (w/v)

**RMN** : spectroscopie de résonance nucléaire

**RS** : réseau simple

**RS POEX** : réseau simple de polyoxyde d'éthylène formé par un monomère de polyoxyde éthylène glycol diméthacrylate de masse molaire X

**RS PVAm(Y%)** : réseau simple d'alcool polyvinilyque méthacrylate à une concentration massique de Y

**RS BSAm(W%)** : réseau simple de sérum albumine bovine méthacrylate à une concentration massique de W

**SDS** : dodecylsulfate de sodium

**Semi RIP** : semi réseaux interpénétrés de polymère

**SVF** : sérum de veau foetal

**NHSm** : méthacrylate de N-hydrosuccinimydile ester

**PEGDMX** : polyoxyde d'éthylène glycol diméthacrylate à une masse molaire de X

**PHEMA** : polyhydroxyéthyl méthacrylate

**POE** : polyoxyde d'éthylène

**PVA** : alcool polyvinilyque

**PVAm** : alcool polyvinilyque méthacrylate

**Trp** : trypsine

**Trp-TPCK** : trypsine traité au N-tosyl-L-phenylalanyl chlorométhyle cétone

**U.V** : rayonnement ultraviolet

# Sommaire :

INTRODUCTION GENERALE .....	1
BIBLIOGRAPHIE.....	4
I] Introduction aux biomatériaux.....	5
I]1) Historique .....	5
I]2) Définitions .....	6
I]3) Contexte de l'étude .....	8
I]3)1. La peau .....	8
I]3)2. Blessures, cicatrisation et solutions pour la reconstruction cutanée .....	10
II] Biomatériaux pour la régénération cutanée .....	12
II]1) Propriétés des biomatériaux en tant que substituts cutanés .....	14
II]2) Les hydrogels .....	16
II]3) Hydrogels de biomacromolécules .....	17
II]3)1. Hydrogels de polysaccharide.....	18
II]3)1.A Alginate.....	18
II]3)1.B Dextran .....	19
II]3)1.C Chitosan.....	19
II]3)1.D Acide hyaluronique.....	21
II]3)2. Hydrogels de protéines .....	22
II]3)2.A Collagène .....	23
II]3)2.B Gélatine .....	24
II]3)2.C Soie .....	25
II]3)2.D Fibrinogène et Fibrine .....	26
II]4) Polymère synthétique en ingénierie tissulaire .....	30
II]4)1. Polymère d'acide poly( $\alpha$ -hydroxylés).....	30
II]4)2. Polycaprolactone.....	31
II]4)3. Polyméthacrylate de 2-hydroxyéthyle .....	32
II]4)4. Polyoxyde d'éthylène .....	33
II]4)5. Alcool polyvinylique.....	33
II]5) Hydrogels mixtes .....	34
II]6) Substituts cutanés actuels.....	38
III] Conclusion .....	41

MATERIELS ET METHODES .....	43
I] Réactifs chimiques, solvants, enzymes et protéines utilisées.....	44
II] Synthèse / modification des polymères.....	47
II]1)1. Fonctionnalisation du PVA .....	47
II]1)2. Modification de l'albumine de sérum bovin (BSA).....	48
II]1)2.A Digestion de la BSA.....	48
II]1)2.B Digestion ménagée de la BSA .....	48
II]1)2.C Fonctionnalisation de la BSA et de ses fragments.....	48
III] Synthèse des matériaux .....	49
III]1) Gel de fibrine .....	49
III]2) Matériaux à base de POE.....	50
III]3) Matériaux à base de PHEMA.....	50
III]4) Matériaux à base de PVAm .....	51
III]5) Matériaux à base BSAm.....	51
III]6) Matériaux obtenu par copolymérisation entre le PVA et la BSAm .....	52
IV] Méthodes de Caractérisation:.....	53
IV]1)1. Caractérisations du PVA et PVAm .....	53
IV]1)2. Dosage des amines libres par la phénanthrènequinone .....	53
IV]1)3. Dosage des amines par le TNBS .....	53
IV]1)4. Quantification et analyse des fractions solubles :.....	54
IV]1)4.A Réseau synthétique : Extraction par Soxhlet.....	54
IV]1)4.B Réseau protéique : test Elisa .....	54
IV]1)5. Coloration des matériaux au bleu de Coomassie.....	54
IV]1)6. Dégradation chimique du réseau de fibrine.....	55
IV]1)7. Electrophorèse .....	55
IV]1)8. Western Blot :.....	56
IV]1)9. Cycles séchage/hydratation : .....	56
IV]1)10. Marquage du réseau de fibrine .....	57
IV]1)11. Microscopie .....	58
V] Analyses mécaniques et thermiques.....	58
V]1)1. Analyse dynamique mécanique (DMA) .....	58
V]1)2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC) .....	58
V]1)3. Analyse thermogravimétrique.....	58
V]1)4. Caractérisation rhéologique .....	59

VI]	Biocompatibilité .....	59
VI]1)	Culture cellulaire .....	59
VI]1)1.	Mise en culture des lignées .....	59
VI]1)2.	Conservation des cellules .....	60
VI]1)3.	Ensemencement cellulaire sur les matériaux.....	60
VI]1)4.	Test Alamar Blue® .....	61
VI]1)5.	Test LIVE/DEAD® : .....	61
VI]1)6.	Marquage fluorescent des populations cellulaires .....	61
Chapitre I : Matériaux manipulables .....		64
I]	Le réseau de fibrine : .....	65
I]1)	Synthèse du réseau de Fibrine : .....	65
I]2)	Caractérisation du réseau de fibrine : .....	66
I]2)1.	Propriétés mécaniques des réseaux de Fb : .....	66
I]2)2.	Biocompatibilité des RS Fb(2,5%) .....	66
II]	Réseaux interpénétrés de polymères à base de fibrine.....	69
II]1)	Présentation des travaux antérieurs .....	69
III]	Optimisation de la synthèse des RIPs POE/Fb.....	71
III]1)	Mise en forme .....	71
III]2)	Préparation de la solution de précurseurs .....	72
III]3)	Variation des temps d'exposition aux rayonnement U.V.....	73
III]4)	Variation de la concentration en POE750 dans les RIPs.....	73
III]5)	Variation de la concentration en Fibrinogène.....	74
IV]	Caractérisation des RIPs POE/Fb optimisés.....	75
IV]1)	Propriétés des matériaux à l'état hydraté.....	75
IV]1)1.	Rhéologie .....	75
IV]1)2.	Mesure d'élongation à la rupture .....	77
IV]2)	Propriétés des RIPs à l'état sec.....	78
IV]2)1.	DMA.....	78
IV]2)2.	Réhydratation.....	79
V]	Biocompatibilité des RIPs POE/Fb .....	80
VI]	Conclusion .....	83
Chapitre II: Matériaux réhydratables .....		84
I]	Réseau de poly(oxyde d'éthylène- co -méthacrylate de 2-hydroxyéthyle) .....	85
II]	L'alcool polyvinylique .....	87



II]1)	Modification du PVA.....	88
II]2)	Synthèse du PVAm .....	89
II]3)	Purification du PVAm.....	89
II]4)	Caractérisation du PVAm.....	90
II]4)1.	RMN du proton.....	91
II]4)2.	Analyse enthalpique différentielle .....	91
III]	Réseau de PVAm.....	92
III]1)	Synthèse des réseaux simples PVAm .....	92
III]2)	Suivi de formation du réseau simple PVAm .....	93
III]3)	Quantification de la réticulation du réseau simple PVAm .....	95
III]4)	Caractérisation des réseaux simples de PVAm.....	95
IV]	Synthèse des RIP PVAm/Fb .....	96
IV]1)	Mélange des précurseurs .....	97
IV]2)	Formation des réseaux dans les RIPs : .....	97
IV]3)	Caractérisation de l'architecture RIP.....	99
IV]3)1.	Fraction soluble du réseau de PVAm.....	99
IV]3)2.	Extraction du réseau de fibrine .....	100
IV]3)3.	Répartition du réseau de fibrine dans les matériaux .....	102
V]	Propriétés des RIPs.....	105
V]1)	Propriétés thermiques.....	105
V]2)	Propriétés mécaniques.....	106
V]3)	Cycle hydratation/séchage .....	107
V]4)	Cytotoxicité et prolifération cellulaire.....	109
V]4)1.	Modèle cellulaire : lignée de fibroblaste de derme humain .....	109
V]4)2.	Culture cellulaire sur les hydrogels .....	113
V]4)3.	Suivi métabolique .....	113
V]4)4.	Morphologie cellulaire .....	114
V]4)5.	Densité nucléaire.....	116
V]4)6.	Taux de viabilité.....	117
VI]	Conclusion .....	119
Chapitre III : Matériaux biodégradables.....		121
I]	Précurseurs d'un matériau dégradé par une enzyme .....	123
I]1)	Stratégie : .....	123
I]2)	Précurseur protéique : le lysozyme :.....	124

I]2)1.	Choix de synthèse.....	124
I]2)2.	Protection des arginines par le CHD.....	125
I]3)	Précurseur protéique : la BSA :.....	127
I]3)1.	Protection des arginines de la BSA par le CHD.....	127
I]3)2.	Hydrolyse de la BSA par la trypsine.....	128
I]3)2.A	Rapport de concentration enzyme / substrat protéique .....	129
I]3)2.B	Durée de l'hydrolyse.....	130
I]3)3.	Préparation des peptides polymérisables .....	130
I]3)4.	Fonctionnalisation des peptides.....	131
I]3)5.	Caractérisation des réticulants hydrolysables :.....	133
I]3)6.	Synthèse d'hydrogel de peptides modifiés : .....	134
I]4)	Synthèse de co-réseaux dégradables avec le PVAm .....	135
I]5)	Analyse rhéologique des Co-réseaux PVAmcoBSAm .....	136
I]6)	Dégradation des matériaux.....	137
II]	Synthèse de RIP biodégradables .....	139
II]1)	Gélification du réseau de fibrine en présence de BSA .....	139
II]2)	Synthèse des RIP PVAmcoBSAm/Fb .....	140
II]2)1.	Formation du RIP .....	141
II]2)2.	Fraction soluble du réseau de fibrine en RIP.....	142
II]2)3.	Répartition du réseau de fibrine dans le RIP.....	143
II]2)4.	Réversibilité à la déshydratation des RIPs.....	144
II]2)5.	Cinétique de déshydratation des matériaux .....	145
II]2)6.	Dégradation enzymatique des RIPs.....	146
III]	Etude de la cytotoxicité des matériaux .....	147
III]1)	Approche en deux dimensions .....	147
III]1)1.	Suivi métabolique .....	147
III]1)2.	Morphologie cellulaire .....	148
III]1)3.	Densité nucléaire.....	150
III]1)4.	Taux de viabilité.....	151
III]1)5.	Protéines matricielles .....	152
III]2)	Encapsulation .....	156
III]2)1.	Suivi métabolique .....	156
III]2)2.	Taux de viabilité.....	157
III]2)3.	Morphologie cellulaire .....	159

III]2)4. Protéines matricielles .....	160
IV] Conclusion .....	164
CONCLUSION .....	165
REFERENCES .....	169
LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX.....	179
I] FIGURE :.....	179
II] TABLEAUX :.....	184

# **INTRODUCTION GENERALE**

La peau est l'organe le plus étendu de notre organisme. Outre son rôle esthétique, elle est le premier acteur de notre défense face au monde extérieur. Cet organe, à l'architecture complexe, est formé d'une matrice extracellulaire riche en protéines et de plusieurs types cellulaires. Ces différentes populations cellulaires coopèrent pour maintenir le rôle fonctionnel de la peau. Elle assure, à la fois, un rôle de barrière contre les agressions extérieures (bactérienne, abrasion, ...), une aide au maintien de notre équilibre interne (hydratation, ...), mais sert également d'organe sensitif (le toucher) et participe à la production de nombreux éléments essentiels à notre survie tels que la vitamine D.

Au cours de la vie, cet organe subit de nombreux dommages, plus ou moins graves et plus ou moins profonds : brûlures (température, radiation), traumatismes (abrasion, coupures), dommages consécutifs à des hospitalisations prolongées dues à des opérations (ulcère, escarre), dommages dus à l'âge ou à d'autres facteurs (diabète, ...). Heureusement, notre peau a la capacité, suite à un processus hautement régulé, de se régénérer : c'est la cicatrisation. La cicatrisation est un mécanisme complexe et séquentiel. De plus, elle est régie par de nombreuses interactions entre les cellules et une matrice extracellulaire temporaire formée pour la régénération tissulaire. Les relations cellules/matrice permettent aux cellules cutanées de se déplacer, de produire et de construire une nouvelle matrice extracellulaire permanente et saine afin de remplacer celle lésée ou détruite.

Cependant, dans le cas de blessure trop profonde avec une perte de substance importante, la cicatrisation ne peut pas se dérouler correctement. En effet, dans certains cas la peau est dans l'incapacité de se régénérer seule rapidement et d'assumer ses différents rôles. Le patient est alors exposé à de nombreux risques (infection, dessèchement des tissus, ...) pouvant amener à une détérioration de son état, voire à son décès. A l'heure actuelle, ces cas de lésions graves représentent par an pas moins de 500 000 brûlures dont 10 000 nécessitent une hospitalisation, 300 000 escarres, 600 000 ulcères à la jambe et 120 000 ulcères de pied diabétique dont 10 000 nécessiteront une amputation. En considérant le vieillissement de la population, ces derniers chiffres (escarres et ulcère) sont voués à augmenter.

Afin d'aider la peau à cicatriser le plus rapidement possible dans ces cas sévères, des matériaux ont été développés. Ces biomatériaux sont utilisés pour protéger le site de la plaie afin de garantir des conditions propices à la cicatrisation ; on peut les définir comme des pansements. Ces pansements peuvent être de différentes origines (naturelle ou synthétique) et peuvent être inactifs ou actifs. Les pansements actifs sont porteurs de stimuli aptes à influencer le processus de régénération.

Ces biomatériaux, lorsqu'ils sont porteurs de propriétés adaptées, peuvent être appliqués directement sur la peau pour sa reconstruction. Ils servent alors de support de culture pour les cellules épidermiques et vasculaires. En amenant un support de culture au contact direct avec la zone lésée, les cellules l'utilisent en tant matrice provisoire pour les premières étapes de la cicatrisation. L'établissement de ces premières étapes permet ensuite le bon déroulement de la cicatrisation dans un temps réduit.

Une autre classe de biomatériaux, les substituts cutanés, ont des propriétés biologiques suffisantes pour se substituer, tout du moins en partie, à la peau saine. Ces matériaux sont utilisés en tant que greffe de peau, permanente ou temporaire.

A l'heure actuelle, la mise au point de ces matériaux consiste à mimer au mieux la matrice extracellulaire permanente afin que la peau puisse s'en servir comme de support pour se reformer. Sur ce principe, un grand nombre de pansements et plus d'une vingtaine de substituts cutanés sont disponibles, allant d'hydrogels de polymère à de la peau de cadavre ou à des biomatériaux de haute technologie. Cependant, actuellement, et malgré de grandes avancées dans ce domaine, la cicatrisation de la peau avec ce type de matériaux reste perfectible.

Afin de proposer une alternative innovante aux matériaux actuels pour la réparation cutanée, la possibilité de produire une matrice mimant la matrice extracellulaire temporaire de cicatrisation a été envisagée. En effet, au vu des interactions complexes entre les matrices extracellulaires et les cellules, se rapprocher au plus près d'un mécanisme physiologique est le meilleur moyen de le reproduire. L'originalité de cette étude a donc été de mimer non pas la matrice extracellulaire permanente telle qu'elle est formée dans un tissu sain, mais celle temporaire qui apparaît lors de la cicatrisation. Le protagoniste majeur de cette étape est alors le gel de fibrine qui sert de support à la formation des nouveaux tissus et permet le déplacement cellulaire le long de son réseau. De par son rôle physiologique dans la cicatrisation, cette protéine et le gel qui lui est associé, ont déjà été largement étudiés pour la reconstruction de tissu. Cependant, peu de matériaux à base de fibrine ont pu être mis au point en raison de ses propriétés mécaniques décevantes.

Afin de produire des matériaux à base de fibrine pouvant être facilement manipulés pour être utilisés dans la régénération cutanée, le laboratoire ERRMECe et le laboratoire LPPI de la Fédération des matériaux (I-mat) de l'université de Cergy-Pontoise, ont mis en commun leurs savoir-faire sur la matrice extracellulaire et les interactions cellules/matériaux (ERRMECe), et sur la synthèse et la caractérisation de matériaux polymères, notamment sous forme d'architecture de réseaux interpénétrés de polymères ou RIP (LPPI). Ce rapprochement de connaissances a permis démontrer au cours de la thèse d'Edéfia Akpalo qu'il était possible de synthétiser des RIPs associant un gel de fibrine à une concentration physiologique et un réseau de polyoxyde d'éthylène. Ces matériaux innovants, permettaient d'obtenir un réseau de fibrine manipulable à une concentration physiologique en protéine.

Dans un premier temps, mes travaux de thèse ont consisté à optimiser la formation de ces premiers matériaux. La seconde étape a été ensuite, d'amener ce matériau à acquérir des propriétés permettant son utilisation en tant que pansement. Pour finir, la possibilité de conférer à ce matériau des propriétés biologiques adéquates pour constituer un support de culture pour la régénération cutanée a été envisagée. Cependant, ces améliorations ne devaient pas engendrer de modification du réseau physiologique de fibrine ce qui imposait une optimisation du réseau synthétique, qui a été réalisée.

Ce manuscrit de thèse s'articule autour de 5 parties distinctes. La première, la partie bibliographique, vise à introduire d'une manière générale les biomatériaux pour ensuite se concentrer plus spécifiquement sur le domaine cutané. Cette partie sera suivie d'un chapitre décrivant les matériels et méthodes utilisés. Suivront ensuite 3 chapitres de résultats concentrés, respectivement sur, l'obtention d'un matériau manipulable, réhydratable et dégradable par des activités protéasiques.

# **BIBLIOGRAPHIE**

## I] Introduction aux biomatériaux

### I]1) Historique

Le développement de biomatériaux comme nous l'entendons aujourd'hui représente un champ de recherche multidisciplinaire en constante évolution depuis le milieu du 20<sup>ème</sup> siècle. En effet, il y a une cinquantaine d'années, le terme de « biomatériaux » n'existait pas. Son industrie se limitait à quelques fabricants de prothèses externes (jambe artificielle, dispositif de maintien pour fracture, dispositif dentaire, ...), et le secteur ne dépendait d'aucune commission de régulation et de contrôle. La notion de « biocompatibilité » n'était pas définie et aucune formation académique n'était proposée.

La volonté de suppléer aux dysfonctionnements du corps humain ou de le réparer a amené l'homme à utiliser des filaments d'or pour faciliter la cicatrisation dès l'époque antique (130-200 apr. J.C.), concept repris en 1849 par J. Marion Sims avec des fils d'argent en tant que suture. Des fragments en fer (Europe, 200 apr. J.C.) ou de coquillages (civilisation maya aux environs de 600 apr. J.C.) ont été utilisés comme implants dentaires [1]. La seconde guerre mondiale a permis la mise au point de nouveaux matériaux de hautes performances : céramiques, métaux et surtout polymères. Ces nouveaux matériaux (nylon, titane, acier inoxydable, silicone, polyuréthane, téflon, polyméthacrylate de méthyle, ...) ont été largement adoptés par les cliniciens. Cela a permis l'évolution progressive de ces matériaux vers les biomatériaux et dispositifs utilisés aujourd'hui en médecine. Cette évolution, timide au début du XX<sup>ème</sup> siècle s'est accentuée au fil des années (Tableau 1).

Application	Inventeur	Date	Matériaux
Implant dentaire	Maggiolo	1809	Or
Prothèse de hanche	T. Gluck	1891	Ivoire
Prothèse de hanche	S. Peterson	1925	Verre
Implant dentaire	Strock	1937	Vitallium
Grefe vasculaire	Blackmore	1942	Vitallium
Rein artificiel	W. Kolff	1943	Cellulose
Lentille intra oculaire	Sir H. Ridley	1949	Poly (méthyle méthacrylate)
Grefe vasculaire	A. Voorhees	1952	Vinyon N
Cœur artificiel	W. Kolff	1957	Polychlorure de vinyle
Prothèse de hanche	Dr Charnley	1958	Teflon / Metal
Valve Cardiaque	L. Edward	1960	Silicone / Poly(méthacrylate de méthyle)
Implant mammaire	T. Cronin, F. Gerow	1960	Silicone
Prothèse de hanche	Dr Charnley	1961	Polyéthylène / Métal
Cœur artificiel	Dr D. Cooley	1969	Polyuréthane
Stent coronarien	Dr J. Palmaz	1987	Acier

Tableau 1 : présentation des premiers cas d'implantations réussies dans un système vivant [5].

Le paramètre déterminant qui a permis cette évolution jusqu'aux biomatériaux actuels de 3<sup>ème</sup> génération, est la compréhension des interactions entre le système vivant et le matériau, autrement dit la notion de biocompatibilité. Aujourd'hui, cette notion est définie comme: « *L'habilité d'un matériau à faire produire par l'hôte une réponse appropriée à une situation spécifique* » [2].



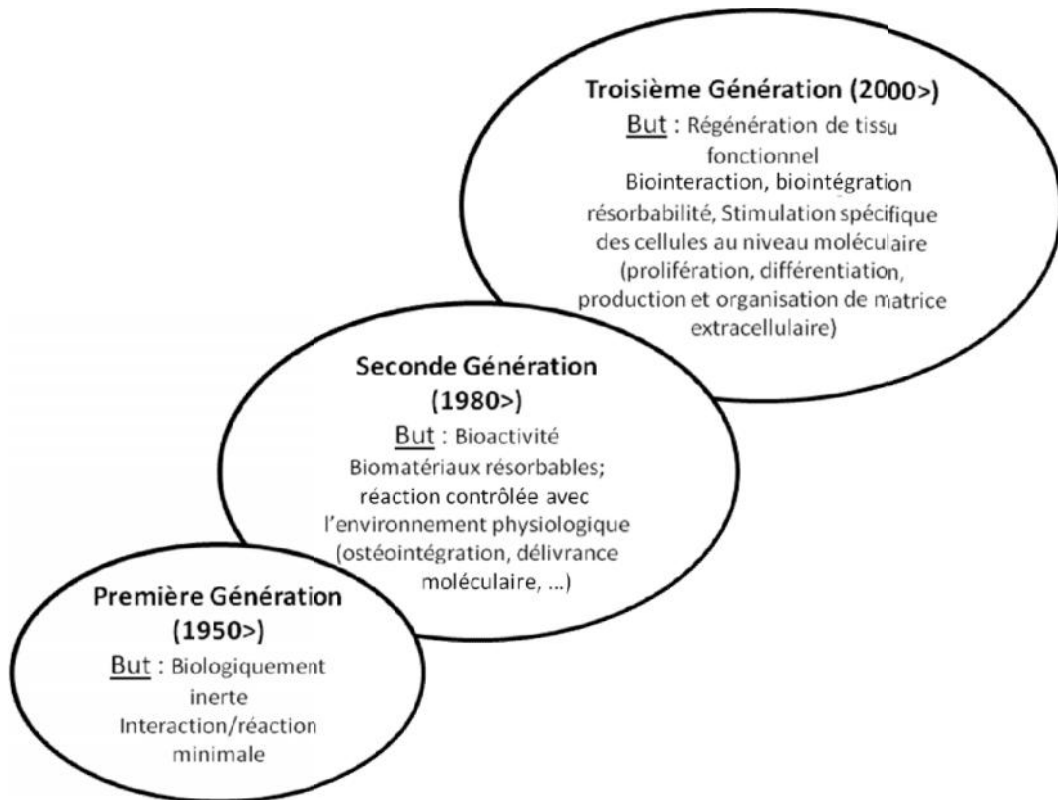


Figure 1 : Evolution des biomatériaux de 1950 à nos jours [3].

## I]2) Définitions

Du fait de leur diversité, les de biomatériaux restent difficile à définir. Une première définition a été proposée lors de la conférence de Chester de la société Européenne des Biomateriaux en 1987 : « matériaux non vivants, utilisés dans un dispositif médical, destinés à interagir avec les systèmes biologiques » [4]. Cependant, cette définition est en constante évolution en raison de celle des connaissances sur les interactions entre ces matériaux et le système vivant. Récemment, D.F. Williams a étoffé cette définition [5] : « un biomatériau est une substance qui a pu être travaillée pour prendre une forme qui, seule ou interagissant avec un système complexe, est utilisée pour diriger, par le contrôle des interactions avec des éléments du système vivant, le déroulement de n'importe quelle procédure thérapeutique ou diagnostique, dans la médecine humaine ou vétérinaire ». Cette définition peut sembler large, mais elle permet de recouvrir l'ensemble des domaines dans lesquels des biomatériaux sont utilisés aujourd'hui (Tableau 2).

Domaine	Définition	Exemple
<b>« Manipulation cellulaire »</b>	Technologie des micro- et nano-systèmes permettant la manipulation précise et systématique du microenvironnement cellulaire en termes biochimiques et physiques et le développement de systèmes pour la manipulation individuelle de cellule [6]	« Biopuces à cellules » [7], ...
<b>Dispositifs médicaux</b>	Élément utilisé seul ou en association chez l'homme à des fins de diagnostic, de prévention, de contrôle d'une maladie, d'un handicap ou l'étude, le remplacement ou la modification de l'anatomie ou d'un processus et dont l'action principale voulue sur le corps humain n'est pas obtenue par des moyens pharmacologiques [8]	Prothèse [9], cathéter [10], compresse [11], stent [12, 13], nanoparticule pour imagerie [14], biocapteur [15], ....
<b>Délivrance moléculaire</b>	Système permettant de délivrer des substances pharmaceutiques à une concentration et sur une durée optimale selon l'application visée [5]	Délivrance de médicaments [16],...
<b>Ingénierie tissulaire</b>	La création (ou formation) d'un nouveau tissu pour la reconstruction thérapeutique d'une part du corps humain, par l'action délibérée et la stimulation contrôlée d'une cible cellulaire [5]	Substitut cutané [17], organe artificiel [18], « organ printing » [19], délivrance de cellules [20] ...

Tableau 2 : Définition des domaines impliquant l'utilisation de biomatériaux

L'ingénierie tissulaire et la délivrance moléculaire sont deux domaines particuliers appartenant aux dispositifs médicaux. Cependant ceux-ci ayant des spécificités propres, ils ont été présentés à part afin de mieux les définir.

Pour chacun des domaines d'application visés, la conception du biomatériau est différente, car ses propriétés doivent être spécifiques et adaptées. Dans cette étude, le but est de développer un matériau pouvant servir de pansement et/ou de support de culture cellulaire pour la reconstruction cutanée. Selon le Tableau 2, il entrerait dans le domaine des dispositifs médicaux et/ou de l'ingénierie tissulaire. Le domaine d'application visé déterminera les propriétés nécessaires à conférer au biomatériau à créer (Figure 2).

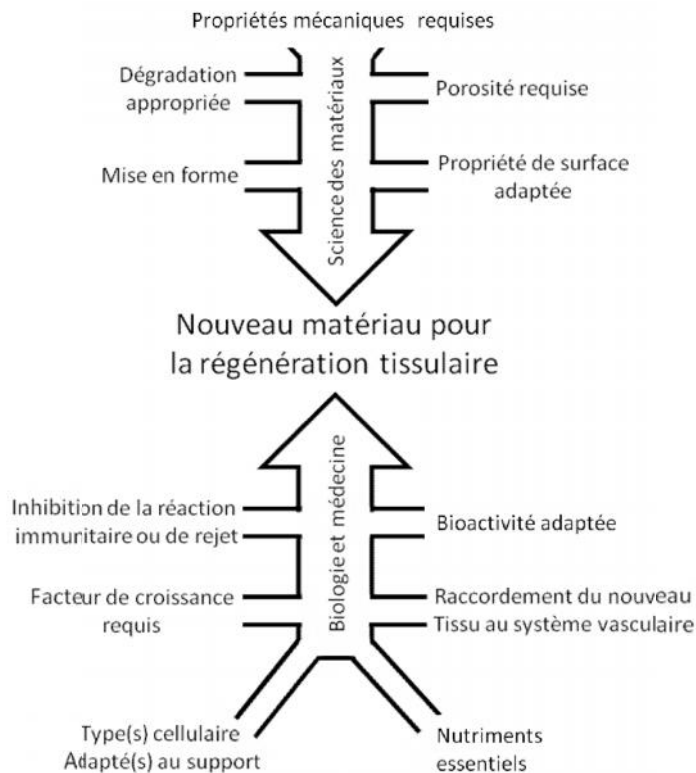


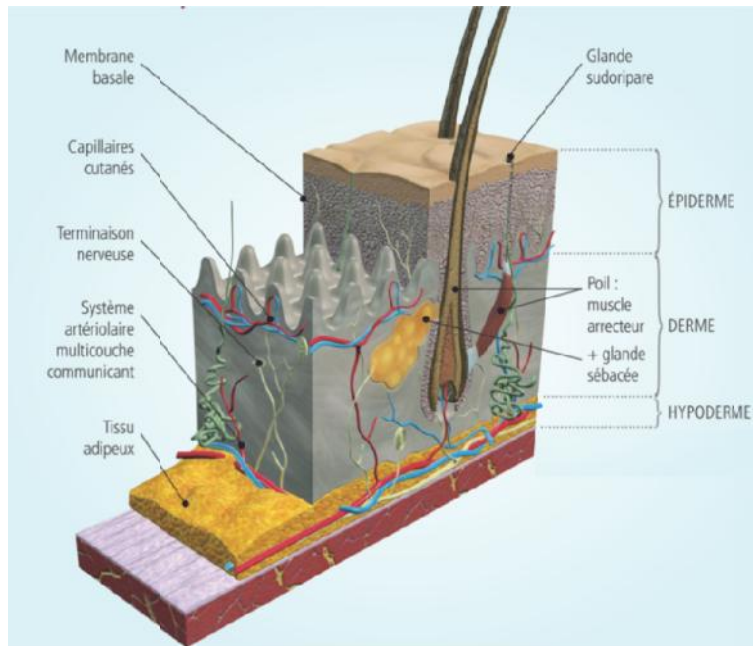
Figure 2 : représentation schématisée des paramètres d'un biomatériau utilisé en ingénierie tissulaire [21].

Afin de déterminer les propriétés qu'il convient de conférer au matériau, il est tout d'abord nécessaire de connaître l'application à laquelle il est destiné.

### I]3) Contexte de l'étude

#### I]3)1. La peau

La peau recouvre l'ensemble du corps et ne joue pas uniquement le rôle d'enveloppe. C'est le plus gros organe du corps humain ; elle représente 16% de la masse totale d'un individu pour une surface moyenne de 1,8 m<sup>2</sup>. Cet organe a une structure complexe :



**Figure 3 : Représentation schématique des différentes couches de la peau humaine [22].**

Les trois couches principales de la peau sont, de l'extérieur vers l'intérieur, l'épiderme, le derme et l'hypoderme.

L'épiderme est une structure composée à 95% de kératocytes auxquels il faut ajouter les mélanocytes (production de mélanine), les cellules de Langerhans (cellules immunitaires) et les cellules de Merkel (mécanorécepteurs). Cette première couche de la peau a une épaisseur variant de 0,05mm (paupière) à 1,5mm (pied, main) en fonction des zones du corps. Elle est elle-même organisée en quatre sous-couches : le stratum basal, le spinosum, le granulosum et le corneum (extérieur) qui se distinguent en fonction de la maturation des kératinocytes.

La jonction dermo-épidermique, aussi appelée lame basale épidermique, est un tissu permettant la cohésion entre le derme et l'épiderme. Elle est composée de nombreuses molécules d'ancrage empêchant la délamination de la peau par des forces de cisaillement. Elle est constituée de trois sous-couches (lamina lucida, lamina densa et la couche fibro réticulaire). Elle joue un rôle clef dans le renouvellement des kératinocytes et dans le passage des nutriments entre le derme et l'épiderme.

Le derme a une fonction primordiale dans le soutien de l'épiderme tant mécanique (matrice extracellulaire) que dans la viabilité de la couche épidermique (vascularisation, nutriments, facteurs de croissances...). Cette couche variant de 0,6 à 3 mm en fonction des parties du corps est structurée en derme papillaire et réticulaire, tous deux constitués d'une matrice extracellulaire (MEC) dense et variée. La composition de cette MEC est reportée dans le Tableau 3.

Composant	Fonction
Collagène	Architecture des tissus, forces de tension, interactions cellule-matrice, interactions matrice-matrice
Elastine	Architecture et élasticité des tissus
Protéoglycane	Interaction cellule-matrice, interaction matrice-matrice, prolifération tissulaire, accrochage et stockage de facteur de croissance
Acide hyaluronique	Interaction cellule-matrice, interaction matrice-matrice, prolifération et migration cellulaire

Tableau 3 : Principaux constituants de la matrice extracellulaire du derme [23].

Les cellules constituant le derme sont essentiellement des fibroblastes, tissu vascularisé comportant de nombreuses cellules nerveuses (corpuscules de Pacini, Meissner et cellules de Merkel) et immunitaires (mastocyte, macrophage...).

Enfin, l'hypoderme est un tissu dit grasseux, constitué majoritairement d'adipocytes. Cette structure est la plus profonde de la peau et joue un rôle clef dans la thermorégulation, l'absorption des chocs et la réserve d'énergie.

Le maintien de l'intégrité de la peau est vital pour la survie du corps humain comme résumé dans le Tableau 4.

Rôle de la peau [24]	Fonction assurée par [25, 26]
Fournir une protection contre les agressions mécaniques, physiques, thermiques et les agents toxiques	Epiderme, derme, hypoderme
Prévenir la perte d'humidité	Epiderme
Réduire les effets négatifs des rayonnements U.V	Epiderme
Siège du sens et du toucher	Epiderme, derme
Aider à réguler la température corporelle	Derme
Participer aux défenses immunitaires	Epiderme, derme
Synthèse de la vitamine D <sub>3</sub>	Epiderme

Tableau 4 : Rôle et acteurs impliqués dans les fonctions de la peau

Outre son rôle de protection contre les agressions extérieures, la peau a également un rôle dans la synthèse de molécules ainsi que dans le maintien de l'homéostasie. De plus, ces différents rôles ne sont pas obligatoirement assumés par une seule de ces structures mais peuvent l'être par 2 ou 3 des couches composant la peau.

### ***1)3)2. Blessures, cicatrisation et solutions pour la reconstruction cutanée***

La peau est un organe essentiel au maintien de l'homéostasie du corps humain dans son ensemble. Cependant, étant la première barrière face à l'environnement extérieur, elle peut être facilement abimée, entraînant ainsi la formation d'une blessure. La gravité de ces blessures est variable et dépend des couches de la peau touchées. Qu'elles soient dues à une ablation (chirurgicale

ou accidentelle), une plaie (escarre, ulcère) ou encore issue d'une brûlure (chaleur ou radiation), les blessures sont classifiées selon 4 grades ou « degrés » en fonction des couches de la peau atteintes.

Degré de la blessure	Description
I	Peau intacte mais érythème persistant ne blanchissant pas à la pression
II	Perte partielle d'épaisseur de la peau impliquant l'épiderme et/ou le derme. Elle est superficielle et peut se présenter comme une abrasion, une ampoule, ou une cavité peu profonde.
III	Perte totale de l'épaisseur de la peau impliquant des dommages dans les tissus sous cutanés. Se présente cliniquement comme une cavité profonde avec ou sans déstabilisation des tissus adjacents.
IV	Perte totale de l'épaisseur de la peau avec une extension des dégâts sur les muscles, os et autres structures de support. Risque d'infection des tissus mous et d'ostéomyélite.

Tableau 5 : Différents degrés de blessure en fonction de la profondeur [27]

Dans le cas de blessures superficielles (degré I et II superficiel), la peau est capable de se régénérer elle-même, c'est-à-dire de cicatriser. La cicatrisation est un phénomène extrêmement complexe et régulé qui peut être résumé en 5 grandes phases [28] :

-L'hémostase : dès les premières secondes, les vaisseaux sanguins subissent une vasoconstriction. Le flux sanguin approvisionne le site en plaquettes qui adhèrent aux parois de la blessure et au collagène de la matrice extracellulaire. L'activation des plaquettes induit la formation du réseau de fibrine en une matrice provisoire stoppant le flux sanguin et génère les chemoattractants et les facteurs de croissance nécessaires aux phases suivantes. Les fibroblastes présents dans le derme intact migrent rapidement sur la matrice de fibrine et produisent une nouvelle matrice extracellulaire.

-La phase inflammatoire : les cellules immunitaires (monocytes, neutrophiles, macrophages) sont attirées et mobilisées par les diverses cytokines présentes sur le lieu de la plaie où elles combattent les éventuelles infections. Les macrophages, à l'aide de nombreuses protéases, assurent la déterision de la plaie (élimination des cellules mortes : épithéliales, dermales, immunitaires) et produisent les chemoattractants nécessaires à la phase suivante.

-La phase proliférative : la latence entre les phases inflammatoire et proliférative peut être plus ou moins importante en fonction des individus. Lors de la phase proliférative se forme le « tissu de granulation » impliquant une importante vascularisation par des capillaires. Cette angiogénèse est guidée par la matrice extracellulaire néoformée par les fibroblastes.

-La phase de contraction : elle n'intervient que dans les cas de blessure ouverte et son mécanisme est encore actuellement débattu. Elle implique la transformation des fibroblastes en myofibroblastes et permet de réduire la surface de la plaie.

-La phase de réépithélisation : Phase finale de la clôture de la plaie, elle correspond à la migration des kératinocytes à partir des berges de la plaie pour recouvrir la surface de la blessure et ainsi reformer l'épithélium. Cette migration n'a lieu que si un tissu de granulation sain a pu se former, c'est-à-dire un tissu humide et vascularisé.

Lors de blessure plus grave (degré II aigu ou supérieur), le derme n'est plus capable de se régénérer correctement. La cicatrisation est alors retardée et les risques d'infection et de mortalité augmentés. Dès lors, une intervention est nécessaire pour permettre la cicatrisation selon deux types distincts (Figure 4).

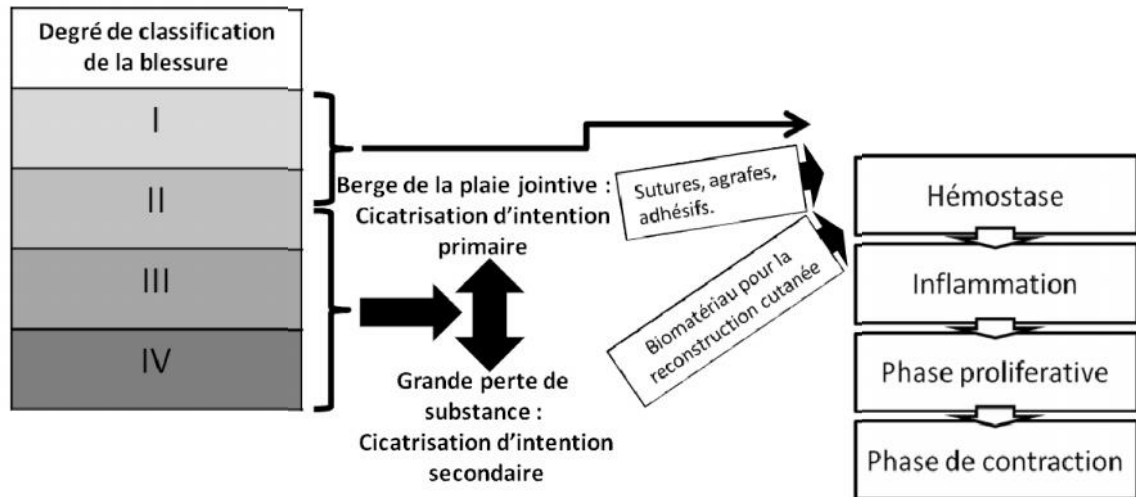


Figure 4 : récapitulatif de la gestion des plaies en fonction de leur gravité

La cicatrisation d'intention primaire est possible si les berges de la blessure sont très rapprochées. Généralement due à des lacérations ou une incision chirurgicale, elle est traitée par des sutures, agrafes ou encore des adhésifs. Par contre, la cicatrisation d'intention secondaire correspond à une blessure trop grave pour être fermée correctement. En effet, le mécanisme physiologique de cicatrisation est soit plus long, soit stoppé en cas de brûlure. Ces plaies non cicatrisées sont sujettes à de nombreuses complications telles que des infections sévères pouvant amener à une détérioration de la plaie, voire à une mortalité. Afin de protéger ces plaies et leur permettre de cicatriser, il est nécessaire d'utiliser des biomatériaux pouvant accélérer et diriger la cicatrisation : les substituts cutanés.

## II] Biomatériaux pour la régénération cutanée

Lors de brûlures importantes par la chaleur, des rayonnements ou des substances chimiques, la cicatrisation totale de la peau par des processus physiologiques n'est plus possible. Ce type de blessure n'induisant pas d'écoulement, le clou hémostatique ne peut pas se former. Les éléments permettant la régénération épithéliale sont détruits. La cicatrisation de ce type de plaie a lieu par contraction de la zone lésée et épithélialisation concentrée sur les bords de la plaie. Cette cicatrisation, très longue, amène à la formation d'un tissu épithélial incomplet n'étant plus capable d'assurer les fonctions physiologiques de la peau (Tableau 4). Le traitement standard [29] de ces plaies consiste à débrider les tissus nécrotiques et à protéger les tissus ainsi exposés par un substitut cutané. Celui-ci permet la formation d'un tissu de granulation et conduit à la cicatrisation. Sans la présence de cette barrière, les risques d'infection bactérienne et de mortalité [30] sont élevés. La Figure 5 décrit une classification possible des substituts cutanés en fonction de cinq paramètres : leur

durée d'utilisation, leur origine (biologique ou synthétique), la présence ou non de cellules ainsi que leur provenance et la structure de la peau qu'ils visent à mimer.

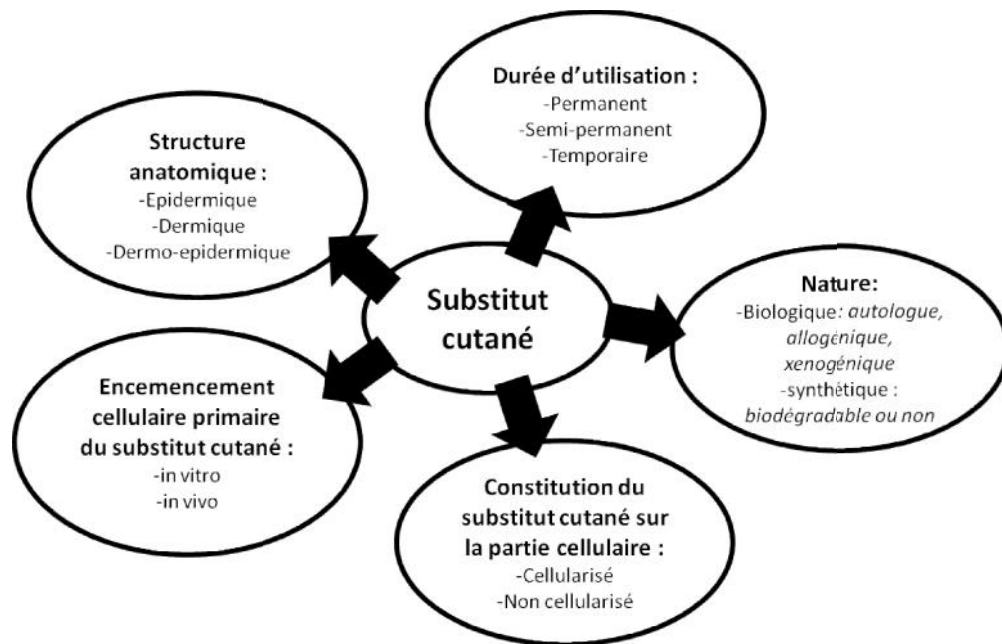


Figure 5 : Classification des substituts cutanés [30]

A l'heure actuelle, le meilleur des substituts cutanés est fourni par le patient lui-même, c'est l'auto-greffe de peau [31]. Elle consiste à prélever de l'épiderme avec une partie superficielle du derme à l'aide d'un dermatone (Figure 6A). Ce prélèvement est ensuite implanté sur la zone lésée. La greffe survit pendant 72 h grâce à la diffusion des nutriments entre la zone lésée et la greffe, puis la néovascularisation permet l'implantation de la greffe. En cas de brûlures très étendues, il est possible d'étendre la surface du greffon (Figure 6B), mais l'inconvénient majeur est la conservation à long terme de « peau de crocodile » [30] sur les zones greffées (Figure 6C). L'utilisation d'autogreffe implique des soins à la zone prélevée qui sera de nouveau disponible environ 3 semaines après le premier prélèvement. Le nombre de prélèvements de greffon sur une même zone est donc très limité.

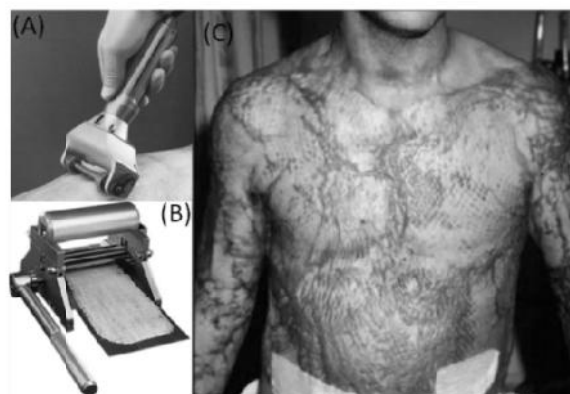


Figure 6 : (A) Récolte, (B) extension [1] et (C) application d'autogreffe de peau humaine [29].



Par ailleurs, dans le cas de brûlures très étendues, la surface de peau saine disponible pour le prélèvement peut ne pas être suffisante, l'utilisation de barrières temporaires est alors nécessaire. La greffe allogénique (provenant d'un autre organisme humain), issue des banques de peau de cadavre, est une solution temporaire efficace pour protéger la plaie [1]. Même si le risque de transmission d'agents pathogènes a été réduit, il reste présent et comme pour toutes les greffes d'origine humaine, la disponibilité de ces matériaux reste problématique. De plus, ces greffes sont rarement permanentes puisqu'elles sont rejetées le plus souvent par l'organisme receveur après environ 3 semaines.

L'auto-greffe et la greffe allogénique de peau sont soumises à des problèmes importants de disponibilité. Afin de fournir des substituts cutanés, temporaires ou permanents, facilement disponibles et permettant une bonne reconstruction cutanée, l'utilisation de biomatériaux est nécessaire.

### **II]1) Propriétés des biomatériaux en tant que substituts cutanés**

Les matériaux utilisés en tant que substitut cutané sont définis comme des « *produits formés ou modifiés artificiellement quelle que soit la méthode, incluant la modification de substance naturelle, tel que le derme dans le but de remplacer totalement ou partiellement, temporairement ou de manière permanente, et possédant des similarités avec la peau humaine, aussi bien anatomiques que fonctionnelles* ». Les propriétés idéales pour un substitut cutané ont été déjà décrites et peuvent être rassemblées de la manière suivante :

Propriétés du substitut cutané idéal [32] :	Propriétés du biomatériau associé [21] :
Résiste aux forces de cisaillement	Propriétés mécaniques adaptées
Facile à utiliser	
Stabilise la blessure sur le long terme	Temps de dégradation du biomatériau adapté
Fournit une couverture à la blessure	
Capable de résister à l'hypoxie de la blessure	Porosité adaptée
Adaptable en épaisseur	Conformabilité
Facile à préparer	
Absence d'antigénicité	Non immunogène
Recréer la composition dermique et épidermique	Bioactivité adaptée
	Support adapté aux types cellulaires
	Connexion du nouveau tissu au système vasculaire
	Facteur de croissance requis
Cout faible	*
Facile à stocker	*

**Tableau 6 : Propriétés requises du substitut cutané idéal et propriétés correspondantes du biomatériau obtenu par ingénierie tissulaire. \* correspond à des propriétés liées au type de monomère [32].**

Les exigences actuelles pour un substitut cutané ne sont plus uniquement centrées sur la possibilité de le manipuler et de le placer sur la plaie pour la protéger sans qu'il y ait une réaction de rejet. Il est dorénavant nécessaire que le matériau soit actif par rapport à la reconstruction de la peau tout en conservant son intégrité. L'aspect économique et de facilité de production sont également des facteurs qu'il ne faut pas négliger lors de la mise au point de tels matériaux.

Les hydrogels sont les plus largement utilisés, car en plus de rassembler l'ensemble de ces propriétés, ils miment au mieux les propriétés de la matrice extracellulaire [33].

La barrière entre pansement et substitut cutané peut être floue en fonction de l'utilisation du matériau. En effet, un pansement est un dispositif médical complexe pouvant avoir de nombreuses propriétés : barrière contre l'environnement extérieur, moyen de délivrance de principes actifs (médicament, antibactérien) ou en tant qu'absorbant (exsudats, ...). En ce qui concerne les substituts cutanés, leur rôle principal est de restaurer les fonctions de la peau. Cependant, certains substituts cutanés sont utilisés de manière provisoire et sont parfois qualifiés de pansements car ils servent de barrière pour le maintien de l'équilibre des tissus afin de promouvoir la formation du tissu de

granulation. C'est pour cela, que dans ces travaux, le terme de pansement peut être occasionnellement être utilisé, mais uniquement dans ce cadre spécifique.

## II]2) Les hydrogels

La définition d'un hydrogel a été établie en 1987 par Peppas [34], puis complétée [35]. Un hydrogel est un réseau en 3 dimensions d'homopolymère ou de copolymère, gonflé d'eau. La réticulation peut être chimique, après formation de liaisons covalentes, ou physique, générée par des enchevêtrements, des associations par liaisons faibles (liaisons hydrogène ou interactions de van der Waals) ou la formation de zones cristallines. Un hydrogel peut être formé avec des polymères d'origine biologique [36], synthétique [37] ou d'un mélange de ces derniers. La nature du polymère (ionique ou non) et son type de réticulation (densité, chimique ou physique) impose les propriétés du biomatériau (gonflement dans l'eau, cinétique de dégradation). Moduler les propriétés d'un hydrogel permet de mimer au mieux les caractéristiques de la matrice extracellulaire [33]. En raison du large éventail de propriétés possibles, la classification des hydrogels est complexe (Figure 7).

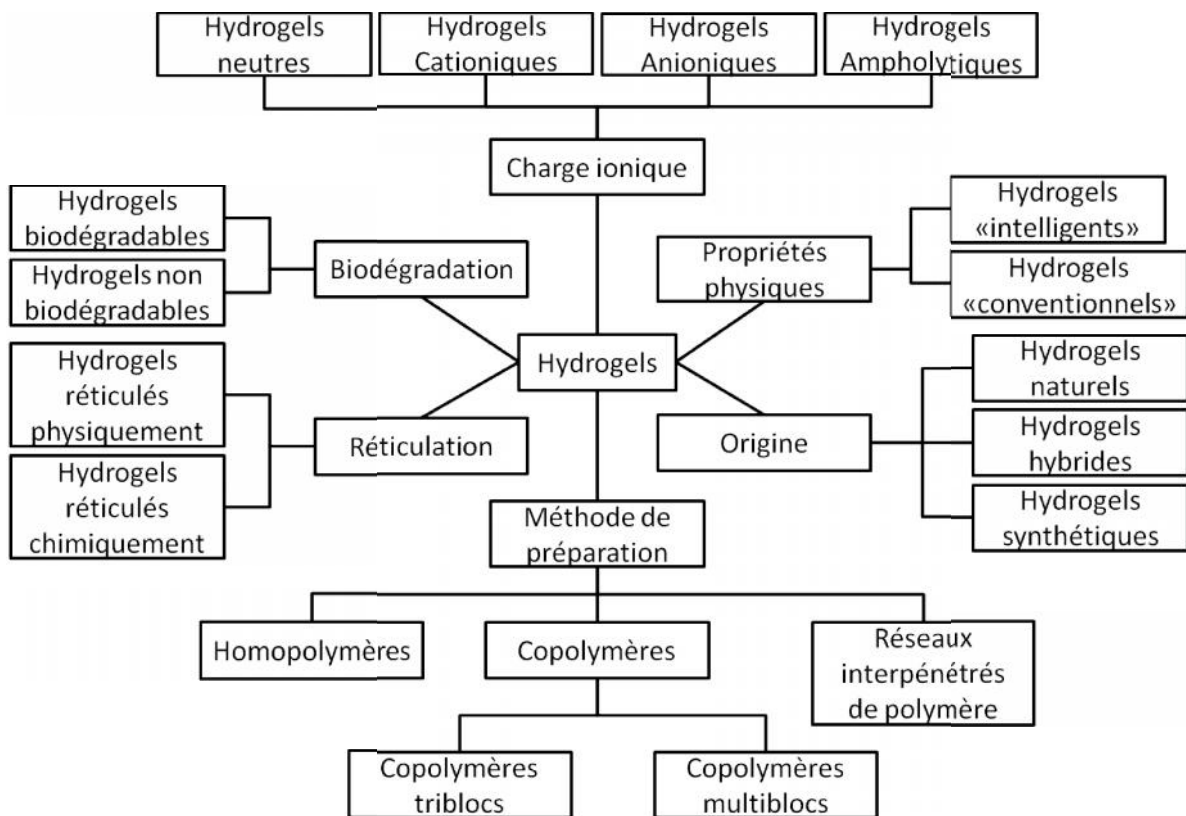


Figure 7 : Classification des hydrogels selon R. Fazel [38]

Les propriétés d'un hydrogel dépendent de la structure de son réseau qui varie en fonction du type de liaisons mises en jeu et de sa méthode de préparation. Les propriétés élastiques du matériau et son taux de gonflement en solvant aqueux dépendent de la taille des pores du gel, espaces entre chaînes de polymère, occupés par la phase sol. L'architecture des hydrogels est le plus

souvent irrégulière et la taille des pores est exprimée en masse molaire moyenne entre points de réticulation. Ce paramètre est un facteur important dans la migration cellulaire [39, 40, 41].

La structure poreuse et la nature du polymère influencent la diffusion des nutriments et des facteurs de croissance [42, 43], donc la survie cellulaire et la croissance des tissus. La dégradabilité de l'hydrogel est également déterminante pour une croissance cellulaire homogène à l'intérieur du biomatériau et la conservation du phénotype cellulaire physiologique [44]. Pour finir, la nature (affinité, énergie de surface) du ou des polymères constitutifs de l'hydrogel conditionnera la bioactivité du biomatériau [36, 45], et la formation et le maintien d'un tissu cellulaire sain. La diversité des hydrogels mis au point est conséquente. Dans la suite de ce manuscrit, seuls les hydrogels ayant été développés pour une utilisation cutanée sur lesquels des tests de cytotoxicité concluant ont été réalisés, seront donc décrits. La présentation des différents hydrogels correspondant à ce cahier des charges est ordonnée selon la classification de N. A. Peppas à savoir selon la nature des polymères entrant dans la formation de l'hydrogel, quelle que soit la méthode de réticulation utilisée ou la fonctionnalisation apportée. Ainsi, seront détaillés les hydrogels de biomacromolécules, synthétiques et mixtes.

### **II]3) Hydrogels de biomacromolécules**

Les hydrogels de biomacromolécules sont issus de la réticulation chimique ou physique de biomacromolécules. Ce type de matériaux présente l'avantage d'être très proches de la matrice extracellulaire (MEC) si leurs constituants sont issus de celle-ci. Cette similitude leur permet d'être facilement intégrés lors des processus métaboliques. Pour ces matériaux, la toxicité ne dépend que des conditions de réticulation et les réactions inflammatoires sont très limitées. Leur dégradation est rapide et les produits de cette dégradation fréquemment métabolisés. Ces hydrogels sont reportés comme ayant des meilleures propriétés comme pansement que la plupart de leurs homologues synthétiques sur de nombreux points [46]. En effet, ils :

- constituent une barrière limitant la déshydratation des tissus.
- limitent la perte de chaleur par évaporation.
- limitent la perte de protéines et de polyélectrolytes dans les exsudats.
- augmentent la protection contre les infections de la plaie.
- permettent un changement de pansements sans arrachement de la plaie.
- facilitent le débridement de la plaie.
- permettent une meilleure formation du tissu de granulation.
- diminuent le temps de cicatrisation.
- augmentent la qualité de la cicatrisation.

Cependant les polymères d'origine naturelle induisent des risques d'immunogénécité et leur structure complexe les rend difficiles d'utilisation. Les hydrogels de biomacromolécules peuvent être classés en fonction de leur nature, polysaccharidique ou protéique.

### II]3)1. Hydrogels de polysaccharide

Les polysaccharides sont constitués d'un enchainement de monosaccharides identiques (homopolysaccharides) ou différents (hétéropolysaccharides) liés entre eux par des liaisons glycosidiques. Ils présentent des structures « branchées » ou linéaires en fonction des liaisons glycosidiques présentes [47]. En fonction de leur composition en monosaccharide, des formes des chaines, et de leur masse molaire, les polysaccharides présentent des propriétés physiques (solubilité, gélification et propriétés de surface) très différentes [36]. Ils sont majoritairement extraits [48]. Ils présentent généralement une bonne hémocompatibilité et ne sont pas cytotoxiques lorsqu'ils sont réticulés par une méthode adéquate [49, 48].

#### II]3)1.A Alginate

L'alginate est un hétéropolysaccharide constitué de l'enchainement séquentiel ou alterné de deux monosaccharides, l'acide  $\beta$ -D-mannuronique (M) et l'acide  $\alpha$ -L-guluronique (G) (Figure 8). Une zone riche en bloc M présente une structure linéaire alors qu'une région riche en bloc G montre une succession de cavités. Cette répartition et la masse molaire de l'alginate dépendent de la source dont il est extrait, algues ou microorganismes bactériens [50]. Ce polymère naturel est capable de gélifier par interactions ioniques des blocs G avec des cations bivalents tels que  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  ou  $\text{Ba}^{2+}$  selon le modèle de la « boîte à œufs » [51].

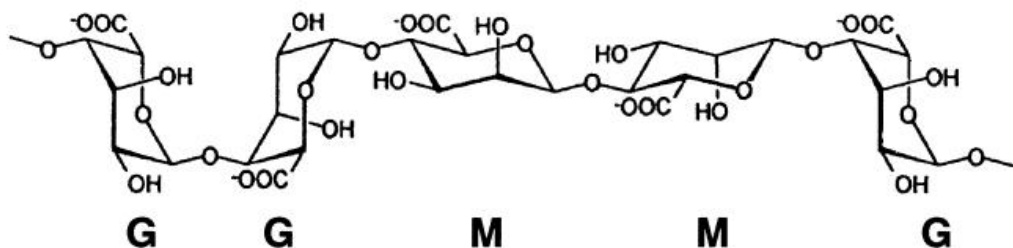


Figure 8 : Exemple de structure de l'alginate [52]

La résistance des gels et la taille de leurs pores sont liés à la composition de l'alginate en bloc G, mais aussi du pH, de la température et de la concentration en ions bivalents utilisés lors de la gélification.

Ce polymère est utilisé en tant que biomatériau pour sa non-toxicité. La présence de groupements carboxylate le long de chaîne polymérique lui conférant des propriétés mucoadhésives [53] et sa non-immunogénicité, même si une forte proportion en bloc M peut modérer ce point [54]. L'alginate n'est que peu dégradé par l'organisme, la solubilisation du matériau est, le plus souvent, due à un échange de cation. Les propriétés de gonflement et de diffusion dans les matrices d'alginate sont facilement ajustables ce qui en fait un polymère de choix pour la délivrance moléculaire et permet leur utilisation en tant que pansements pour les plaies très exsudatives [55]. Cependant, les cellules ne sont pas capables d'adhérer sur ce polymère. Le greffage de motifs RGD

favorise les interactions entre alginate et cellules [55] sans permettre une application comme substitut cutané. La gélification par interactions électrostatiques, c'est-à-dire en condition douce, en fait également un bon candidat pour la vectorisation de fibroblastes [56, 57].

### II]3)1.B Dextran

Le dextran est un homopolysaccharide formé par un enchainement de motifs D-glucose reliés par des liaisons glycosidiques  $\alpha$ -(1-6) (Figure 9). Le dextran peut également adopter une structure branchée par des liens osidiques de type  $\alpha$ -(1-3). Ce polymère est produit chez de nombreux microorganismes bactériens tels que *Leuconostoc mesenteroides* [58] par l'action enzymatique de la dextransucrase [59].

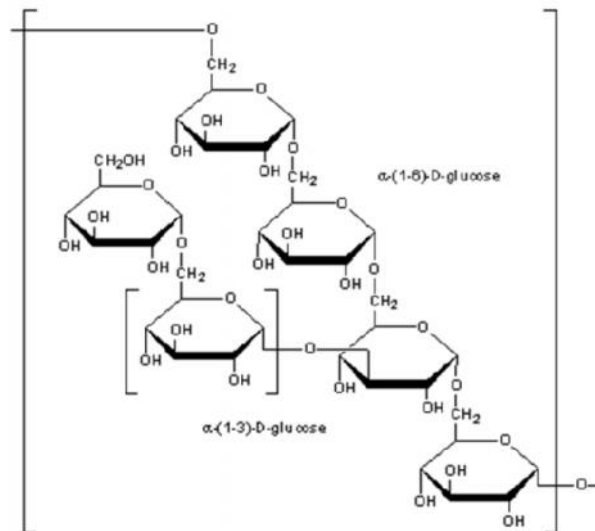


Figure 9 : Structure du dextran

De masse molaire variable, le dextran est décrit comme étant biodégradable et biocompatible. La gélification du polymère n'est pas spontanée mais peut être obtenue par réticulation chimique (N, N'-méthylènebisacrylamide ou glutaraldéhyde) ou en le fonctionnalisant avec des groupements photoréticulables [60]. Actuellement, la photoréticulation du dextran est la voie la plus utilisée du fait de sa faible toxicité. Le dextran est capable d'absorber les exsudats de la plaie et promeut la cicatrisation. Ces diverses propriétés ont permis de nombreuses applications du dextran pour la délivrance moléculaire et l'augmentation de volume dermique et sous cutané (produit de comblement) [61].

### II]3)1.C Chitosan

Le chitosan est un polysaccharide, copolymère de  $\beta$ (1-4)-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine (Figure 10). Le chitosan, issu de la desacétylisation partielle ou totale de la chitine,

polysaccharide naturel présent dans la carapace des crustacés et des insectes ainsi que dans le champignon, donc bon marché.

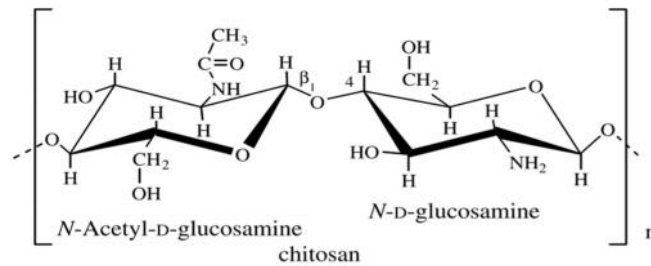


Figure 10 : structure du chitosan [62]

Le chitosan est très utilisé dans le domaine de la délivrance moléculaire ou de l'ingénierie tissulaire pour la peau, les os, le cartilage et les implants vasculaires. En effet, il a été reporté par Khor et al. comme étant biodégradable par le lysozyme, biocompatible, non immunogène, non toxique et bioactif [63]. Cependant ses propriétés sont dépendantes de la proportion relative de N-acétyl-D-glucosamine et de D-glucosamine [64].

La réticulation du chitosan est possible par voie chimique (glutaraldéhyde) ou par fonctionnalisation des fonctions d'amine avec des groupements photoréactifs [65].

Le chitosan, soluble à pH acide et insoluble à pH physiologique, est difficilement utilisable en association avec des protéines ayant des conformations sensibles au pH et pour les encapsulations cellulaires. Toutefois, il peut être utilisé sur les plaies et la reconstruction cutanée car il est décrit comme étant hémostatique [66]. Il augmente les fonctions des cellules inflammatoires (leucocyte et macrophage), la formation du tissu de granulation par les fibroblastes [66], possède une action anti bactérienne naturelle [67] et permet l'accélération de la cicatrisation. De plus, ce polymère est connu pour avoir des propriétés adhésives qui lui permettent de rester en place sur le site lésé [53]. Les hydrogels de chitosan développés par Ribeiro et al. peuvent promouvoir l'adhérence et la prolifération cellulaires de fibroblastes [68]. Chargé positivement, le chitosan interagit avec les glycoaminoglycanes et les facteurs de croissances [69].

Des travaux décrivant l'utilisation de chitosan modifié sont rassemblés dans Tableau 7.

Nom du polymère	Modification du chitosan	Apport induit par la modification
WS-chitosan [70]	Désacétylisation partielle	Soluble à pH physiologique Augmentation de la rapidité de la cicatrisation
Chitosan-coton [71]	Réticulation physique sous forme de fibre	Augmentation de l'infiltration des cellules inflammatoires et de la vitesse de cicatrisation
Az-CH-LA [72]	Fonctionnalisation avec des groupements photoréactifs. Polymérisation radicalaire par U.V	Soluble à pH physiologique. Augmentation de la vitesse de cicatrisation sur test <i>in vivo</i>
CM-chitosan [73]	Greffage de groupements carboxyméthyle.	Solubilité du polymère accrue dans les solvants organiques Impact sur la régulation des fibroblastes cheloïdes.
Eponge de chitosan [74]	Réticulation physique par évaporation de bon solvant (pH acide) et suspension mauvais solvant (pH physiologique)	Contrôle de l'infection bactérienne et accélération de la cicatrisation.
WGA-chitosan [75]	Fonctionnalisation avec du « wheat germ agglutinin » (WGA) via une réaction avec de l'EDC et formation d'un film de chitosan (réticulation physique)	Augmentation de l'adhérence des fibroblastes à la surface du film de chitosan

Tableau 7 : exemple de modification du chitosan pour des applications cutanées

Les modifications du chitosan ont pour principaux buts d'augmenter la solubilité du chitosan et de permettre sa réticulation chimique.

Le chitosan est utilisé, en association avec d'autres composés comme, la gélatine [76] ou l'alginate [77], dans des pansements induisant des coagulations très rapides même en cas d'hémorragie sévère. Actuellement, 17 pansements à base de chitosan (Chitodine®, Chitopoly, Tegisorb, ...) ou de chitine (Beschitin®, Chtipack P®, ...) sont déjà disponibles dans le commerce [78].

### II]3)1.D Acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un polysaccharide linéaire de type hétérosaccharide, présent *in vivo* sous la forme polyanion ou hyaluronane. Il est formé d'une alternance d'acide  $\alpha$ -1,4-D-glucuronique et de  $\beta$ -1,3-N-acétyl-D-glucosamine liés entre eux par des liaisons  $\beta$  (1-3) (Figure 11) [79].

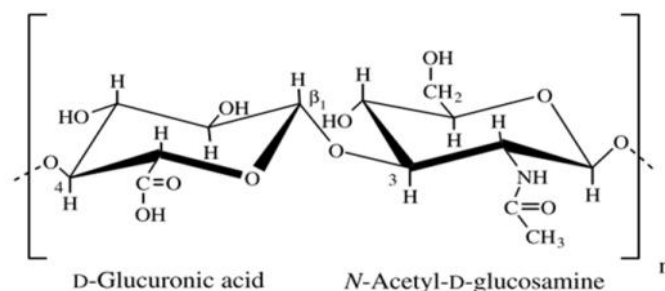


Figure 11 : structure de l'acide hyaluronique [62].



L'acide hyaluronique est produit par voie enzymatique (hyaluronan synthase) chez de nombreux organismes tels que *Streptococcus* et chez les animaux par les fibroblastes. Il est présent dans tous les tissus du corps humain. C'est le polysaccharide le plus répandu dans les MEC conjonctives. Il est dégradé par les hyaluronidases, enzymes sécrétées également par les fibroblastes [80].

L'acide hyaluronique joue de nombreux rôles physiologiques : absorption des chocs au niveau des articulations, gel de l'humeur vitrée de l'œil, maintien de l'humidité dans les tissus grâce à son importante affinité avec l'eau et maintien structurel de la MEC. Il présente de nombreuses interactions avec les constituants de la matrice tels que la fibronectine [81] ou la fibrine [82]. Le hyaluronan joue un rôle actif dans la transmission de signaux physiologiques et il est capable de réguler l'inflammation, la prolifération et les sécrétions des fibroblastes. Ses fragments présentent des propriétés pro angiogéniques et jouent un rôle clef dans la cicatrisation [83].

L'acide hyaluronique fonctionnalisé est largement utilisé en médecine régénérative [84]. Campoccia et al. ont rendu le hyaluronan hydrophobe en lui greffant des groupements ester de benzyle [85]. Il peut alors être facilement mis en forme par électrospinning, extrusion ou mis sous forme d'éponge par évaporation de solvant. Ces biomatériaux sont déjà commercialisés en tant que pansement ou substitut cutané sous les appellations Laserskin® et Hyalograft 3D®. Le hyaluronan thiolé (HA-SH) réticulé avec du diacrylate de poly(éthylène glycol) forment des hydrogels en conditions douces [86]. Enfin, Park et al. ont modifié l'acide hyaluronique avec le N-3-aminopropyl méthacrylamide via l'utilisation d'EDC pour pouvoir ensuite réaliser une réticulation radicalaire amorcée photochimiquement. Celle-ci peut avoir lieu avec ou sans diacrylate poly(éthylène glycol) ou motif RGD afin de modifier les propriétés de l'hydrogel final.

### ***II]3)2. Hydrogels de protéines***

Les protéines sont les constituants majeurs de la MEC, quel que soit le tissu. Leur nature, leur ultrastructure et leur répartition diffèrent en fonction de l'organisation du tissu considéré. Outre leur rôle passif dans le maintien de l'intégrité des tissus, les protéines de la MEC sont impliquées dans la régulation de l'adhérence, la prolifération et la survie cellulaires [87].

Les hydrogels à base de protéines sont d'un grand intérêt pour l'ingénierie tissulaire car ils reproduisent les conditions physiologiques. Ils sont utilisés lors de la reconstruction de tissus lésés pour favoriser la prolifération cellulaire ou jouer le rôle de vecteurs de cellules. Les protéines utilisées sont le plus souvent d'origine allogénique ou xénogénique ce qui peut conduire à des différences de composition, de structure et des risques de réaction immunitaire [36]. Dans certains cas, les protéines peuvent être produites par des microorganismes après modification génétique [88].

## II]3)2.A Collagène

Le collagène représente 30% de la masse des protéines présentes dans le corps humain, c'est la protéine la plus abondante de la MEC. Il est structuré en triple hélice grâce à une abondante proportion en motif Gly-X-Y. Cette protéine possède au moins 27 formes différentes qui varient en fonction du tissu considéré [46]. La formation du collagène débute par la synthèse par les fibroblastes de procollagène qui est excrété dans la MEC. Les propeptides situés aux extrémités des faisceaux de collagène sont hydrolysés et après un processus de maturation, le collagène s'agrège en une structure complexe fibrillaire (Figure 14) [89].

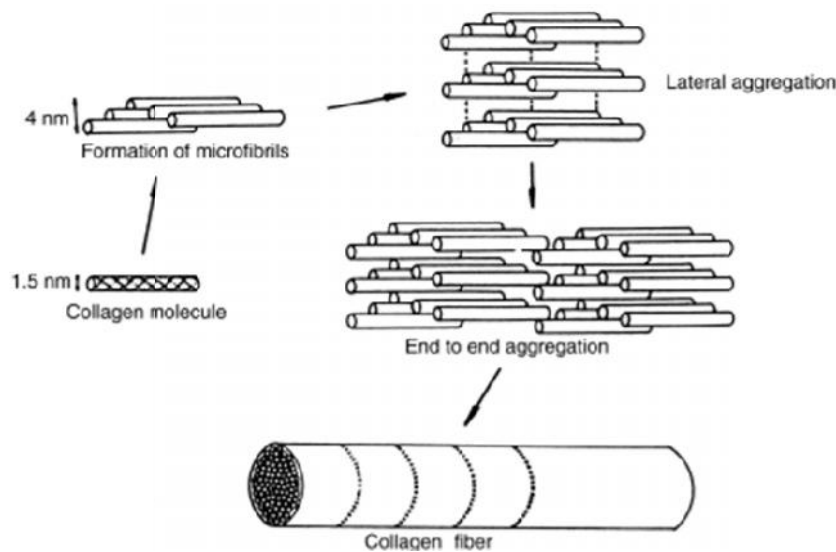


Figure 12 : Formation des fibres de collagène de type I. [1]

Le collagène a une fonction primordiale de soutien mécanique des MEC dans la peau, les tendons, les os et les vaisseaux sanguins. De plus, en raison de son affinité avec d'autres constituants de la matrice tels que la fibronectine [90] ou la vitronectine [91], il permet de structurer la MEC. Lors de la cicatrisation, le collagène peut induire l'agrégation plaquettaire réduisant le temps de coagulation. Il montre des propriétés chemoattractantes pour les fibroblastes, permettant ainsi leur migration plus rapide dans la zone lésée.

Sa place dans la MEC et ses propriétés physiologiques lors de la cicatrisation ont fait de cette biomacromolécule un candidat idéal en ingénierie tissulaire pour la mise au point de pansements et de suppléments cutanés et comme modèle pour l'étude des plaies [92]. Pour cela, il est extrait des tissus animaux, puis un traitement enzymatique est employé pour limiter la présence de télépeptides pouvant induire une réaction immunogénique [93]. Son origine animale fait qu'une attention particulière au risque de transmission de virus et de prion doit être conservée.

Le collagène réticulé physiquement, proche du mécanisme physiologique, présente des propriétés mécaniques faibles et une dégradation difficile à contrôler lors de l'implantation [94]. Afin d'optimiser ses propriétés mécaniques et de contrôler sa dégradation, le collagène est réticulé [89] par voie chimique (glutaraldéhyde [95], diphenylphosphoryl azide [96] et 1-éthyl-3-(3-

diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC) [ 97 ]) naturelle (genipin [ 98 ]) ou enzymatique (transglutaminase [99]). D'autres stratégies ont été reportées comme la formation d'éponge par évaporation de solvant [97], l'augmentation de la concentration de la protéine [100] ou encore électrospinning à partir d'une solution de collagène dans du 1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol [101]. A l'heure actuelle, de nombreux produits commerciaux à base de collagène sont disponibles pour la reconstruction cutanée (Tableau 8).

Nom	Composition	Application
Alloderm®	Derme acellulaire originaire de peau de cadavre	Greffe pour le recouvrement de brûlure en reconstruction [102]
Integra®	Collagène de tendon bovin et glycoaminoglycane de requin	Greffe de peau épaisse ; traitement d'ulcère de la jambe et la fermeture de brûlure sévère [103]
Promogram®	Collagène animal (55%) avec cellulose oxydée régénérée	Absorbe les excès de protéase de la surface de la plaie [104]
Puraply®	Reconstruction de collagène de type I de porc	Blessure partielle ou profonde incluant les blessures chroniques, les sites donneurs pour les autogreffes [105]
Fibrocol Plus®	Collagène animal (90%) avec alginate (10%)	Blessure partielle, ulcère veineux, blessure traumatique aigüe et brûlure second degré.
Apligraf®/Graftskin®	Fibroblaste humain et collagène de tendon bovin	Ulcère de jambe veineux et ulcère diabétique au pied [106]
Orcel®	Kératynocyte humain d'épiderme et fibroblaste de derme cultivé dans une éponge de collagène de type I	Excision chirurgical aigüe [107]

Tableau 8 : tableau regroupant les pansements à base de collagène disponibles sur le marché [108].

Les problèmes liés à l'origine animale du collagène pourrait être contourné par l'utilisation de collagène autologue. Cependant, l'utilisation de collagène humain n'est pas envisageable en raison de sa rareté et par conséquent de son coût. De plus, il a été rapporté que les fibroblastes au contact des matrices de collagène perdent leur capacité de réponse au facteur de croissance TGF- $\beta$ . Cette inhibition empêche ainsi l'augmentation de la sécrétion de collagène [109]. Cet effet du collagène exogène sur la population de fibroblastes peut ainsi engendrer un ralentissement dans la formation d'une nouvelle matrice extracellulaire. Il est à noter que cette inhibition de la réponse au TGF- $\beta$  n'est pas constatée avec les hydrogels à base de fibrine. De plus les hydrogels de collagène sont connus pour se rétracter lors de la migration et de la prolifération des fibroblastes à l'intérieur de cette matrice. Ce comportement limite donc le bon contact entre le matériau et la zone lésée.

## II]3)2.B Gélatine

La gélatine est un polymère naturel linéaire dérivé du collagène. Elle est préparée par la dénaturation acide ou basique de la triple hélice de collagène [13]. Selon le protocole d'extraction, les propriétés de la gélatine varient.

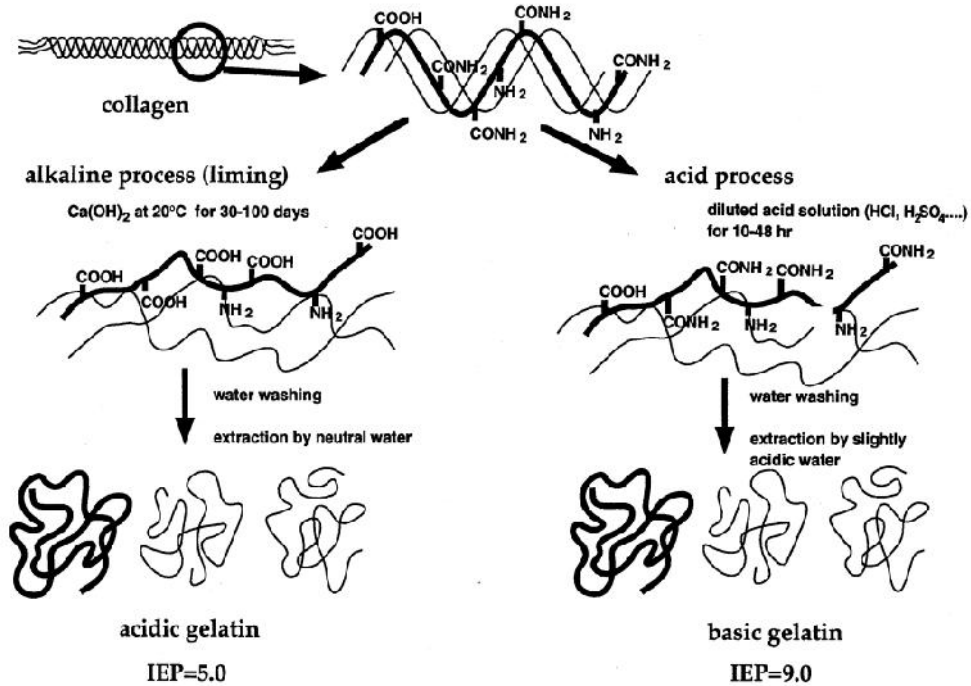


Figure 13 : méthode de préparation de la gélatine à partir du collagène [110].

La gélatine est biocompatible et biodégradable. Tout comme le collagène, elle gélifie de manière spontanée à température ambiante. La charge de la gélatine acide, lui permet de former des complexes polycationiques faisant de ce polymère un outil efficace pour la délivrance moléculaire [110]. A la température du corps, la gélatine ne gélifie pas, il est donc nécessaire de la réticuler pour l'utiliser. Un gel chimique peut être obtenu par réticulation chimique (glutaraldéhyde [111], EDC-NHS [112], iodure de 2-chloro-1-méthylpyridinium [113], genipine [114]), enzymatique (transglutaminase [115]) ou en la fonctionnalisant (fonction photoréactive [116], groupement tyrosine [117]...).

La gélatine étant facile à mettre en forme, elle est souvent utilisée en tant que matière principale pour les pansements. Sa bioactivité en fait un excellent matériau hémostatique pour la couverture provisoire de plaie. Plusieurs pansements à base de gélatine sont disponibles commercialement (Gelaspon, Gelastyp, Spongostan, Styprosteril, Gelfoam, Floseal, ...).

### II]3)2.C Soie

La soie est issue de cocon de larve d'organisme tel que le *Bombyx Mori* ou encore des toiles d'araignée. Elle est constituée de fibres de fibroïne (chaines légères et chaines lourdes reliées entre elles par des ponts disulfures) enrobées d'une substance collante appelée séricine [108]. Ces fibres s'organisent entre elles via des liaisons hydrogène pour former des phases cristallines en feuillet beta, ce qui donne la résistance de la soie. Cette organisation est illustrée sur la Figure 14.

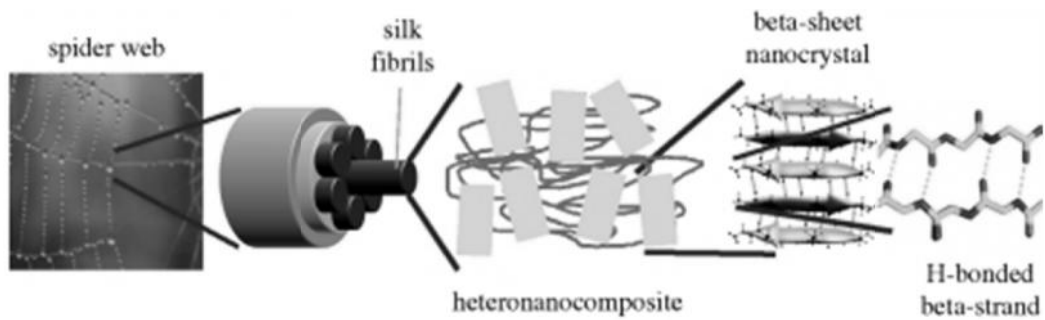


Figure 14: structure des fibres de soie [118].

De par sa résistance mécanique exceptionnelle, la soie a été utilisée en tant que suture. De plus, elle présente une bonne biocompatibilité, une biodégradabilité et permet l'adhérence, l'étalement et la prolifération cellulaires à sa surface [119]. Elle peut être mise en forme par diverses méthodes : electrospinning [120], éponge [121], hydrogels [122], couche par couche [123] ou encore en films [122]. L'exemple le plus abouti dans l'utilisation de la soie en tant que pansement a été reporté dans l'étude de Schneider et al [120] qui l'a solubilisée dans du bromure de lithium avant de la dessaler par dialyse. Des facteurs de croissances (EGF) ont ensuite été incorporés dans la solution avant de la déposer par électrospinning. Ces matériaux, étudiés *in vitro* sur des modèles de plaie, ont démontré leur faculté à accélérer la fermeture de la plaie.

Pour finir, de nombreuses études sur la soie pour la reconstruction cutanée sont déjà rapportées :

Type de pansement	Résultats
Film de soie	Réduction de la plaie par 10, réparation de la plaie plus rapide de 7 jours par rapport au pansement DuoActive, plus grande régénération du collagène et réduction de l'inflammation [124]
Film amorphe de soie combiné avec de la poudre de séricine	Inhibition de la formation d'œdème [125]
Fibres de soie	Séquestration sélective des protéases issues des exsudats de la plaie [126]
Fibres électrospinnés de soie	Incorporation de facteur de croissance (EGF) améliorant la vitesse de cicatrisation de 90% [127]
Film de soie et de kératine	Incorporation de petits peptides réduisant l'activité élastase [128]

Tableau 9 : Exemples d'application de biomatériaux à base de soie en tant que pansements [108]

### II]3)2.D Fibrinogène et Fibrine

Le fibrinogène est un polymère protéique linéaire de 45nm de long pour une masse molaire de 340 kDa. Cette protéine est circulante dans le sang à une concentration physiologique comprise entre 2 et 4 mg/mL. Elle est synthétisée par les cellules hépatiques. Elle se présente sous forme de dimère (Figure 15), chaque chaîne étant composée de trois chaînes polypeptidiques ( $A\alpha$ ,  $B\beta$  et  $\gamma$ ) stabilisées par 29 ponts disulfures [129].

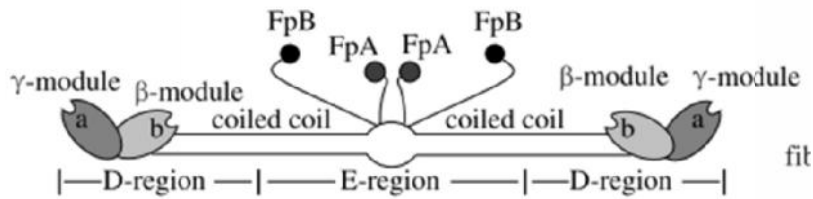


Figure 15 : représentation schématique de la structure du fibrinogène.[<sup>129</sup>]

Dans un contexte de cicatrisation, le fibrinogène, sous l'action d'une enzyme spécifique, la thrombine forme un hydrogel insoluble : le réseau de fibrine. La formation du réseau de fibrine est un processus très hiérarchisé (Figure 16). Lors d'un écoulement sanguin, le contact avec l'air amorce une cascade enzymatique permettant l'activation de la prothrombine en thrombine. Celle-ci reconnaît et hydrolyse spécifiquement le fibrinopeptide A (FpA). Suite à cette hydrolyse, les protéines s'associent deux à deux et forment des protofibrilles qui induisent un changement conformationnel de la protéine permettant une hydrolyse par la thrombine. Cette seconde hydrolyse excise le fibrinopeptide B (FpB) ce qui permet l'appariement des protofibrilles entre elles et la formation du réseau tridimensionnel de fibrine [<sup>130</sup>, <sup>129</sup>]. Pour finir, le réseau de fibrine est réticulé par le facteur XIIIa (transglutaminase) [<sup>131</sup>]. Au cours de la cicatrisation, le réseau de fibrine est naturellement dégradé par des protéases telles que la plasmine.

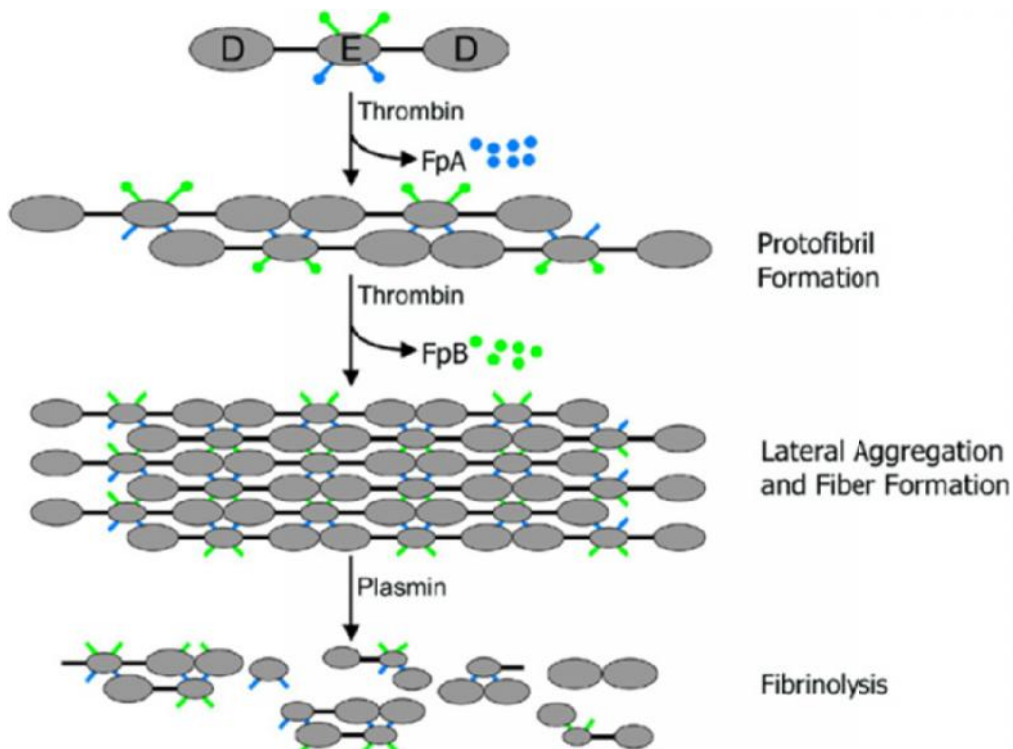


Figure 16 : représentation schématique de la formation du réseau de fibrine physiologique [<sup>129</sup>].

Le réseau de fibrine est donc bioactifs avec de nombreuses sections reconnaissables par les cellules (Tableau 10). Grâce à ses sections reconnaissables par les plaquettes, le réseau de fibrine assume un rôle physiologique essentiel dans la réponse hémostatique suite à une lésion.

Récepteur engagé	Type cellulaire	fonction
$\alpha_{IIb}\beta_3$	Plaquette	Adhérence, agrégations et réaction au clou hémostatique
$A_v\beta_3$	Endothéliale, fibroblaste	Adhérence, étalement
$A_5\beta_1$	Endothéliale	Adhérence
$A_m\beta_2$	Monocyte, neutrophile	Phagocytose, Adhérence
$A_x\beta_2$	neutrophile B lymphocyte	Adhérence
Récepteur 130 kD	Endothéliale	Sécrétion du facteur von Willebrand
CD-44	Endothéliale, Fibroblaste	Adhérence, migration
Calreticuline	Fibroblaste	Prolifération
MFR	Cellule hématopoïétique	Prolifération
ICAM-1	Cellule lymphoïde, endothéliale, mésothéliale, fibroblaste	Adhérence

Tableau 10 : Tableau récapitulatif des interactions et de la bioactivité associée du réseau de fibrine [132].

Lors de la reconstruction de tissus lésés, le gel de fibrine joue, à la fois, le rôle de réservoir de facteurs de croissance [133] (FGF, IGF,...) et de support provisoire de la MEC néoformée. Ces deux fonctions sont permises par ses nombreuses interactions avec les protéines telles que la fibronectine [133], la vitronectine [134] ou encore le collagène [135]. Enfin, la formation du réseau de fibrine et la fibrine elle-même sont reportées comme induisant l'angiogénèse, mécanisme clef amenant à la reconstruction d'un tissu sain vascularisé [132].

Les différentes propriétés de la fibrine (Tableau 11) en font le matériau présentant le plus de qualités pour l'ingénierie tissulaire [136]. Sous forme concentrée, alors appelée « colle de fibrine », elle est utilisée lors de la fixation de plaie avec des sutures [94], le traitement de brûlures [137], la fixation de substitut cutané [94] ou encore la culture de substitut cutané [138]. Un intérêt majeur de la fibrine, est qu'étant une protéine circulante du sang, elle peut être utilisée de manière autologue [139], éliminant ainsi tous risques associés aux protéines allogéniques.

<b>Caractéristiques idéales d'un hydrogel pour l'ingénierie tissulaire</b>	<b>Caractéristiques de la fibrine</b>
<u>Biocompatible :</u> -Non-toxique -Non-allergénique -Non-inflammatoire	grande affinité avec les surfaces biologiques et déjà en utilisation clinique.
<u>Biodégradable :</u> -Contrôlé et ajustable -Biodégradation suffisante -Cinétique adaptée à la vascularisation	biodégradation facilement contrôlée par la réticulation des fibres ou l'utilisation d'inhibiteur de la fibrinolyse.
<u>Nature autologue :</u> -Non immunogène -Pas de reconnaissance du non soi	récoltée de manière autologue limitant ainsi les réactions immunitaires.
<u>Structure biologique</u>	matrice provisoire naturelle de la cicatrisation
<u>Support 3D :</u> -Support de la croissance cellulaire -Permet une diffusion facile des nutriments et de l'oxygène	excellente croissance cellulaire et développement d'un tissu sain dans la matrice en 3D. Interrogations sur les propriétés de diffusion dans les gels.
<u>Facilement produit :</u> -Fabriqué en peu de temps -Reproductible	produits facilement et de façon reproductible à partir du sang du patient.
<u>Economique :</u> -Abordable pour tous	matériau naturel et autologue, le coût devrait être acceptable pour tous.
<u>Propriétés mécaniques suffisantes</u>	Structurellement trop faible pour soutenir un environnement physiologique dynamique.
<u>Variabilité en forme et en taille</u>	Possibilité de construire un gel de fibrine afin de répondre à la forme, la taille et la géométrie désirée et peut être utilisé en tant que gel injectable.
<u>Propriétés chimiques, physiques et mécaniques ajustables</u>	La forme et le taux de polymérisation de la fibrine peuvent être contrôlés par la variation de la force ionique et la concentration en fibrinogène/thrombine.

**Tableau 11 : Comparaison entre les propriétés attendues d'un hydrogel idéal et celles fournies par l'hydrogel de fibrine [136].**

L'hydrogel de fibrine présente l'ensemble des caractéristiques recherchées pour l'ingénierie tissulaire, exceptée une : à des concentrations physiologiques, son module de stockage est faible (30 Pa), ce qui fait qu'il n'est pas autosupporté [140]. Afin d'obtenir des matériaux à base de fibrine facilement manipulables, de nombreuses approches ont été tentées. Le fibrinogène peut être déposé par électrospinning [141] à partir d'une solution de 20 à 30 fois la concentration physiologique dans du 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol. Un hydrogel de fibrine a également été déposé sur un support souple d'éther de polyuréthane [142]. La fibrine a été modifiée par des peptides analogues aux sites de reconnaissance des fibrinopeptides A ou B pour modifier l'architecture du réseau [143]. Une approche a consisté à introduire des inhibiteurs de la plasmine pour retarder la dégradation du réseau de fibrine [144], ou de la transglutaminase, associée ou non à de la thrombine afin de réticuler du fibrinogène partiellement converti en fibrine [145]. Enfin, la fonctionnalisation de segments de fibrinogène (traitement préalable des ponts disulfures au TCEP) par des groupements photoréticulables (acrylate greffé par des PEGDA ayant réagi avec les thiols des cystéines) [146] et l'augmentation de la concentration en fibrinogène [147] sont des stratégies qui ont également été reportées. Ces approches ont permis d'obtenir des matériaux à base de fibrinogène, de protéine dénaturée ou de fibrine non physiologique avec des propriétés mécaniques renforcées.



Même si l'adhérence et la prolifération cellulaires sont possibles à la surface de ces matériaux, il n'a pas été prouvé qu'ils puissent assumer tous les rôles physiologiques du réseau de fibrine. A notre connaissance, les seuls matériaux autosupportés comportant un réseau physiologique de fibrine sont des architectures de réseaux interpénétrés de polymères. Cette approche sera traitée dans le paragraphe II]5) sur les gels mixtes.

#### **II]4) Polymère synthétique en ingénierie tissulaire**

Les polymères d'origine synthétique sont intéressants pour l'ingénierie tissulaire car les propriétés des matériaux en découlant sont facilement contrôlables et reproductibles. De plus, ils sont disponibles en grande quantité et leur origine non-biologique limite les risques de transmissions de virus ou de prions. Leurs caractéristiques sont facilement modulables selon leur masse molaire, leur structure, le fait qu'ils contiennent ou non des groupements réticulables et/ou dégradables. Ces paramètres permettent d'obtenir des points de gel et des densités de réticulation contrôlées et des propriétés mécaniques et de dégradation particulières [<sup>149</sup>].

Pour qu'un hydrogel synthétique soit considéré comme un biomatériau, il doit être non toxique (pyrogénique, hémolytique, inflammatoire, cancérigène, allergène), stérilisable (par radiation, oxyde d'éthylène, autoclave, chauffage sec) et biocompatible. En fonction des propriétés voulues, la composition chimique du polymère peut être choisie pour répondre au mieux au cahier des charges.

Les polymères synthétiques sont utilisés en ingénierie tissulaire pour les propriétés mécaniques de leur hydrogel, supérieures à celles des gels de biomacromolécules. Cette différence est principalement due à leur plus faible gonflement dans les milieux aqueux et, dans certains cas, à la présence de zones cristallines. Le domaine d'utilisation le plus courant des hydrogels synthétiques est l'orthopédie en tant que matrice de remplacement osseux ou de recouvrement de prothèse [<sup>148</sup>], mais quelques utilisations en rapport avec le domaine cutané ont également été reportées [<sup>149</sup>].

##### **II]4)1. Polymère d'acide poly( $\alpha$ -hydroxylés)**

Les polymères d'acide  $\alpha$ -hydroxylé font partie de la classe des polyesters. Issus de cette famille, l'acide polyglycolique (PGA) et l'acide polylactique (PLA) sont largement utilisés comme biomatériaux (Figure 17).

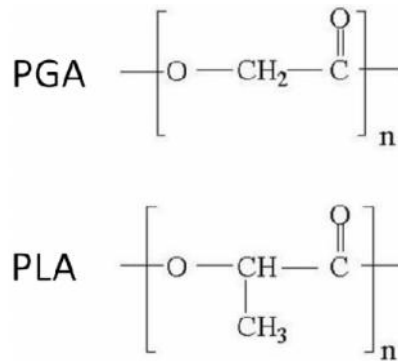


Figure 17 : Structures chimiques du PLA et du PGA [150].

Le PGA est un polymère semi-cristallin (45 à 55% de cristallinité). Sa température de transition vitreuse se situe aux alentours de 35°C et sa température de fusion est supérieure à 200°C. La présence de ces zones cristallines lui permet d'atteindre un module de stockage de l'ordre de 12,5 GPa. Ce polymère est biodégradable par l'hydrolyse non spécifique de ses liaisons ester conduisant à la formation de glycine, de dioxyde de carbone et d'eau. Cette dégradation est rapide ce qui limite l'utilisation du PGA pur dans le domaine biomédical. Afin de ralentir sa dégradation, le PGA est copolymérisé, avec le PLA notamment [150].

Le PLA, contrairement au PGA, est un polymère chiral avec deux formes optiquement actives : le poly(L-lactide) (PLLA) et le poly(D-lactide) (PDLA). Le PDLA, plus amorphe, est peu utilisé dans le domaine biomédical contrairement au PLLA. Ce dernier est semi-cristallin (taux de cristallinité de 37%), présente une température de transition vitreuse de l'ordre de 60°C et une température de fusion à environ 175°C. Bien qu'inférieur à celui du PGA, un module de stockage élevé (4,8 GPa) et sa dégradation plus lente en font un bon candidat pour une utilisation en biomatériaux [150].

Ces deux polymères ont déjà été acceptés par la Food and Drug Association (FDA) pour des applications biomédicales comme des fils de suture ou des prothèses orthopédiques [151]. Des copolymères PLA/PGA entrent dans la composition du substitut cutané Dermagraft®, dans la composition de pansements [152] ou sont utilisés pour de la délivrance cellulaire [153]. L'adhérence cellulaire à la surface de ces matériaux est permise par l'adsorption non spécifique de protéine [154]. Cependant quelques réserves ont été émises, pour le PGA et le PLA, car l'acidité de leurs produits de dégradation peut avoir des effets négatifs sur les tissus.

#### II]4)2. Polycaprolactone

La polycaprolactone (PCL - Figure 18) est un polyester soluble dans de nombreux solvants organiques. Ce polymère semi-cristallin a une température de transition vitreuse à -60°C et une température de fusion à 60°C. Comme le PLA et le PGA, la PCL est dégradée, en conditions physiologiques, par hydrolyse non spécifique de ses liaisons ester. Sa cinétique de dégradation très lente le rend particulièrement adapté pour de la délivrance moléculaire ou pour des dispositifs implantés sur de longues périodes. Son module de stockage est plus faible (23 MPa) que celui des polyesters précédents, mais la PCL démontre une importante élongation à la rupture de 700% [150].

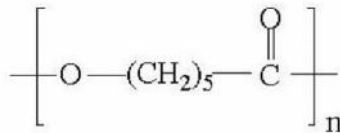


Figure 18 : Structure chimique du PCL [149].

De nature hydrophobe, ce polymère biocompatible permet l'adhérence cellulaire grâce aux protéines adsorbées à sa surface. De nombreux produits à base de PCL sont actuellement utilisés dans des interventions cliniques, comme fils de suture. Des applications pour la reconstruction cutanée ont également été reportées lorsqu'il est utilisé pur ou après recouvrement d'une protéine après mis sous forme de tissu par electrospinning [155]. L'adhérence cellulaire et la prolifération de fibroblastes et de kératinocytes à leur surface sont démontrées. Cependant, la PCL n'étant bioactive, cette propriété dépend des protéines adsorbées à sa surface.

De par leur caractère proche de celui de la matrice extra cellulaire, les hydrogels formés par des polymères synthétiques sont un champ de recherche important sur les tissus conjonctifs en ingénierie tissulaire. Leurs propriétés mécaniques sont très logiquement plus faibles que celles des polymères synthétiques plus hydrophobes, moins enclins à l'absorption d'eau. Toutefois, en augmentant leur densité de réticulation, il est possible de recréer des propriétés viscoélastiques proches de celles de la MEC en conservant leur capacité à laisser diffuser les nutriments [156].

Cependant, l'absence de site de reconnaissance cellulaire et la résistance à l'adsorption protéique sur les hydrogels d'homopolymères neutres comme le polyméthacrylate de 2-hydroxy éthyle (PHEMA), le poly(oxyde éthylène) (POE) et l'alcool polyvinylique (PVA), font que l'adhérence et la prolifération cellulaire sont généralement très faibles. Ainsi, de nombreuses stratégies ont été développées ces dernières années afin de conférer des bioactivités à ces polymères leur permettant de contribuer à former des tissus sains.

### ***II]4)3. Polyméthacrylate de 2-hydroxyéthyle***

Le polyméthacrylate de 2-hydroxy éthyle (PHEMA) est un polymère très hydrophile ( $\delta_{\text{PHEMA}} = 26.93 \text{ MPa}^{0.5}$ ), non chargé et non biodégradable.

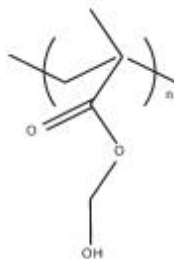


Figure 19 : structure chimique du PHEMA [157].

Il est possible de synthétiser des hydrogels par copolymérisation suivant une voie radicalaire avec un réticulant. Les hydrogels de PHEMA sont reportés comme ayant des propriétés mécaniques relativement faibles et sont, le plus souvent, associés à d'autres polymères pour des applications

dans des domaines de la délivrance moléculaire et en ophtalmologie. Leur utilisation dans la reconstruction cutanée a été reportée en tant que constituant pour le support de culture de kératynocyte [158] (culture cellulaire autologue ou allogénique à la surface des matériaux permettant l'accélération de la cicatrisation) ou en tant que pansement [159], le PHEMA servant alors de réservoir de molécules bioactives.

#### ***II]4)4. Polyoxyde d'éthylène***

Le polyoxyde d'éthylène (POE) est un polymère neutre, non biodégradable et connu comme peu toxique. Lorsque sa masse molaire est inférieure à  $2000 \text{ g.mol}^{-1}$ , il est à l'état caoutchoutique à température ambiante ( $T_g = -50^\circ\text{C}$ ) [65].

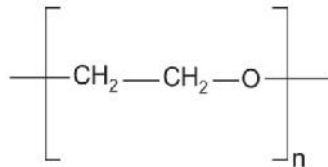


Figure 20 : structure chimique du POE [157].

L'absence de charge ionique le rend résistant à l'adsorption protéique [160] ce qui limite énormément l'adhérence et la prolifération cellulaire à sa surface. Cette propriété, en plus de sa biocompatibilité, fait du POE, un polymère souvent utilisé pour empêcher la formation de biofilm sur les dispositifs médicaux [161].

Les hydrogels de POE peuvent être synthétisés à partir d'oligomère de poly(éthylène glycol) ayant des groupement polymérisable (acrylate ou méthacrylate). La diversité des précurseurs disponibles (linéaires ou branchés, différentes fonctionnalités, différentes masses molaires, ...) permet de facilement ajuster la densité de réticulation des hydrogels de POE, et donc leurs propriétés mécaniques. Ces hydrogels n'ayant pas de bioactivité, ils ont été principalement étudiés comme surface modèle pour l'activité de peptides d'adhérence cellulaire greffés à sa surface, ainsi que de peptides permettant une biodégradation cellulaire ciblée [162].

#### ***II]4)5. Alcool polyvinylique***

L'alcool polyvinylique (PVA) est un polymère largement utilisé depuis les années 1930 dans différents secteurs industriels tels que les colles, les industries textile, agroalimentaire et pharmaceutique. Le PVA est un polymère hydrophile, neutre et non dégradé par le corps humain. Ce polymère est issu de l'hydrolyse du polyacétate de vinyle. Sa solubilité dépend donc de ce taux d'hydrolyse [163].

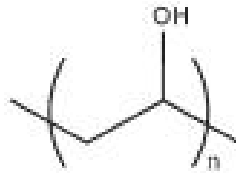


Figure 21 : structure chimique du PVA [157].

Le PVA étant semi-cristallin, il forme des hydrogels qui ont des propriétés mécaniques supérieures à celles des hydrogels de PHEMA et de POE. Son taux de cristallinité dépend, à la fois, de la masse molaire du précurseur du réseau, de son taux réticulation, mais également de son histoire thermique. En effet, des cycles répétés de refroidissement contrôlé induisent la formation de zones cristallines (point réticulation physique), jusqu'à rendre le polymère insoluble. Le PVA peut également être réticulé chimiquement avec du glutaraldéhyde qui réagit avec ses fonctions alcool. Plus récemment, une partie des fonctions alcool du PVA ont été modifiées par des groupements photoréactifs [164] qui polymérisent ensuite radicalairement. Cette modification permet d'éviter l'usage du glutaraldéhyde toxique.

Le PVA est biocompatible mais résistant à l'adsorption protéique. L'adhérence et la prolifération cellulaires à sa surface sont donc limitées. Cependant le greffage de peptides d'adhérence cellulaire [165] (peptides de type RGD greffés selon un protocole EDC/NHS sur un réseau de PVA modifié pour porter des fonctions amine) et/ou de sections hydrolysables [164] par les cellules (coréseaux avec de l'acrylate de chondroïtine sulfate avec du PVA modifié acrylate), permettent l'établissement d'une population cellulaire à la surface du matériau. Concernant son utilisation clinique pour la reconstruction cutanée, la société Biocure commercialise des pansements à base de PVA photoréticulés qui ont été approuvés par la FDA.

Les principaux constituants des hydrogels d'homopolymères utilisés pour la reconstruction cutanée viennent d'être présentés. Actuellement, à l'image de la MEC, les polymères sont fréquemment associés entre eux, afin de conférer de nouvelles propriétés aux matériaux. Ces associations, qualifiées d'hydrogels mixtes par la suite, sont généralement réalisées sous forme de coréseau ou d'architecture en réseaux interpénétrés de polymères (RIP).

## II]5) Hydrogels mixtes

Les hydrogels de biomacromolécules et d'homopolymères qui viennent d'être décrits, présentent tous une limitation pour une application comme substitut cutané. Afin de palier les défauts de chacun et associer leurs propriétés intéressantes, les biomatériaux de dernière génération sont, le plus souvent, formés par l'association de plusieurs de ces matériaux. Ces biomatériaux peuvent contenir uniquement des biomacromolécules, uniquement des homopolymères, soit un mélange de biomacromolécule et d'homopolymère. Leur voie d'élaboration correspond soit à la formation de coréseaux par polymérisation radicalaire, soit à la formation de réseaux interpénétrés de polymères.

Lors d'une copolymérisation radicalaire, si l'un au moins des monomères et/ou oligomères est difonctionnel, un coréseau (ou réseau de copolymère) est obtenu. Ces matériaux présentent alors

des propriétés correspondant généralement à la somme pondérée des propriétés des partenaires associés. Dans ces coréseaux, les différents composés sont liés entre eux par des liaisons covalentes.

Les réseaux interpénétrés de polymères (RIP) sont définis selon Sperling comme la combinaison de deux réseaux, ou plus, de polymères synthétisés en juxtaposition [166]. Les réseaux sont partiellement enchevêtrés, mais sans lien covalent entre eux [167]. 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 structuration est stable dans le temps. Ces associations de polymères sont, en général, réalisées dans le but d'élaborer des matériaux associant les propriétés recherchées de chacun des partenaires tout en minimisant les défauts. Ce type d'architecture offre également une bonne stabilité dimensionnelle sous la contrainte ou l'action de la température et dans le temps.

Des exemples d'hydrogels mixtes sont présentés dans le Tableau 12. Les combinaisons possibles étant très nombreuses, nous avons choisi de reporter ici uniquement les hydrogels mixtes dont la réponse de cellules dermiques à leur contact a été étudié. Dans tous les cas traités dans ce tableau, les populations cellulaires ont été capables de s'adhérer, s'étaler et proliférer.

Associations	Origine	Structure	Comportement cellulaire additionnel
collagène / glycoaminoglycane [168]	Nat	CoR	Rétractation de la matrice
collagène / acide hyaluronique [169]	Nat	RIP	/
élastine / soie [170]	Nat	CoR	/
gélatine / soie [171]	Nat	RIP	/
collagène / chitosan [172]	Nat	CoR	Incorporation complète avec vascularisation après 28 jours d'implantation chez le lapin
fibrine / acide hyaluronique [173]	Nat	RIP	Limitation de la rétractation du gel pour les RIPs. Angiogénèse.
chitosan / PCL [174]	Nat/Synth	CoR	/
collagène / PCL [175]	Nat/Synth	RIP	/
soie / PVA [176]	Nat/Synth	RIP	Augmentation de la synthèse de collagène (50% plus rapide à 7 jours), Fermeture plus rapide de la plaie (7 jours pour le RIP contre 21 pour le contrôle.)
POE / PLLA [177]	Synth	CoR	Fermeture de la plaie plus rapide que les contrôles (sans traitement ou traité avec Fucidate®)

**Tableau 12 : Hydrogels mixtes testés comme substitut cutané ou pansement (culture de fibroblaste à leur surface).** L'origine des matériaux sont notées Nat (naturelle) ou Synth (synthétique). Les structures sont notées CoR (=coréseaux) ou RIP (réseaux interpénétrés de polymères).

Dans la plupart de ces matériaux pour la réparation cutanée, les hydrogels mixtes ont été élaborés à partir des biomacromolécules. Ces dernières permettent de garantir la bioactivité de l'hydrogel et le mélange, d'acquies de nouvelles propriétés.

Une des propriétés recherchées est l'optimisation de la réticulation pour obtenir des biomatériaux plus facilement manipulables. Ainsi dans les coréseaux de collagène et de chitosan [172], le collagène apporte la bioactivité et le chitosan sert de « pont de réticulation » avec le

glutaraldéhyde. Cet hydrogel manipulable a montré une biocompatibilité et une biodégradabilité aussi bien *in vitro* qu'*in vivo*. Cependant, aucune information précise sur les propriétés mécaniques obtenues n'est disponible. Afin d'augmenter les propriétés mécaniques de matériaux, la soie a été associée afin de conférer des propriétés mécaniques supérieures à l'élastine [170] et la gélatine [171] qui améliorent la bioactivité. L'élastine a été copolymérisée avec la soie par lyophilisation de la solution élastine/soie avec ou non réticulation chimique avec le genipin. La structuration des feuillets  $\beta$  de la soie (renfort des propriétés mécaniques) est réalisée par une immersion du matériau dans le méthanol. Les matériaux obtenus sont non cytotoxiques mais la proportion la plus élevée en soie (1% (w/v)) montre une diminution importante de la croissance cellulaire (500000 cellules à 50% (v/v) de soie contre 300000 cellules pour 100% de soie). De plus, la diminution de la croissance cellulaire est d'autant importante que le matériau est réticulé ou non avec le genipin (350000 cellules sur matrice réticulée contre 500000 cellules sur matrice non réticulée). Ces matériaux ont montré de bonne capacité à absorber les exsudats de la plaie et la présence d'élastine permet d'améliorer la cicatrisation. Cependant, il est regrettable qu'aucune caractérisation des propriétés mécaniques n'ait été réalisée pour évaluer les propriétés mécaniques après la copolymérisation. Une autre approche a été de réaliser un RIP associant la soie et un réseau gélatine [171]. Pour cela, la gélatine est modifiée par des anhydrides de méthacrylate. Cette gélatine modifiée a été photopolymérisée en présence de différentes concentrations de soie (0 à 2 % (w/v)). L'immersion des matériaux dans le méthanol permet la structuration des feuillets  $\beta$  de la soie. Dans cette étude, le matériau obtenu avec la plus forte concentration de soie voit ses propriétés mécaniques multipliées par 30 (module de compression de 2,5 (gelatine photoréticulé) à 70 kPa (RIP gélatine/soie)). Ainsi, l'utilisation de l'architecture RIP a permis d'augmenter significativement les propriétés mécaniques. Cependant, l'utilisation de soie concentrée limite la croissance cellulaire (densité cellulaire à 3j de 275 cellules/mm<sup>2</sup> (gelatine photoréticulé) à 100 cellules/mm<sup>2</sup> (RIP gélatine/soie)). L'utilisation de la soie en architecture RIP avec d'autre biomacromolécule permet d'obtenir des biomatériaux ayant bioactifs avec d'intéressantes propriétés mécaniques. Cependant, la concentration de soie nécessaire et le traitement au méthanol (toxique pour le foie et le système nerveux) limitent son utilisation.

L'utilisation de deux polymères d'origine naturelle permet de mimer au mieux la complexité de la MEC. Par exemple, les matrices à base de collagène et de glycoaminoglycane [168] sont préparées par lyophilisation de la solution (collagène + glycoaminoglycane) et coréticulation des monomères par l'action de la chaleur (120°C). Le but de ce matériau est de reproduire l'enchevêtrement de la matrice extracellulaire native. Ce coréseau montre des propriétés mécaniques et biologiques (collagène) ainsi que d'hydratation (glycoaminoglycane) permettant l'adhésion la prolifération cellulaire. Ce matériau est à la base du substitut cutané Intégra®. Cependant, il est utilisé avec un film de silicone pour être manipulable.

Afin de réunir la structure complexe de la MEC native avec des propriétés mécaniques adéquates, d'autres associations ont été testées telles que l'association en RIP entre le collagène et l'acide hyaluronique photoréticulé [169] ou encore de la fibrine en RIP avec ce même acide hyaluronique modifié [173]. Comme pour l'association précédente, l'adhésion et la prolifération cellulaire sont importantes mais les propriétés mécaniques restent insuffisantes de 10 Pa à 300 Pa pour le RIP collagène/acide hyaluronique et de 5 à 78 Pa pour le RIP fibrine/acide hyaluronique). Les RIPs à base de collagène montrent une croissance cellulaire diminuée (30% inférieure) dans le cas du matériau aux propriétés mécaniques les plus importantes (300 Pa) par rapport aux matériaux plus

fragiles. L'utilisation de la fibrine à la place du collagène dans une architecture RIP permet d'obtenir un apport de propriété angiogénique.

L'ensemble de ces matériaux mixtes présentés, de par leurs origines naturelles, présentent d'excellents résultats d'étalement et de croissance cellulaire, mais sont limités en terme de propriétés mécaniques. De plus, ces matériaux sont peu stables dans le temps et les moyens de les stabiliser nécessitent, dans la plupart des cas, l'utilisation d'agent de réticulation toxique pour les cellules (glutaraldéhyde, EDC/NHS, ...). L'utilisation d'hydrogel d'origine synthétique a été envisagée afin de palier ces problèmes. En effet, ce type de polymère présente généralement des propriétés mécaniques supérieures. De plus, leur dégradabilité étant souvent plus faible que les polymères d'origines naturelles, ils sont plus stables dans le temps.

La formation d'hydrogels mixtes tout synthétique vise, comme leur homologue d'origine naturelle, à former des biomatériaux aux nouvelles propriétés. Le but recherché est d'obtenir des matériaux aux propriétés mécaniques adéquates tout en étant biodégradable. Ainsi des coréseaux POE/PLLA [177] présentent les propriétés mécaniques intéressantes du POE et la biodégradabilité du PLLA. Ces matériaux n'ont pas été testés *in vitro* mais directement en test *in vivo* sur un modèle de plaie. Ils ont montré une accélération dans la cinétique de fermeture des plaies par rapport aux contrôles (sans traitement ou traité avec Fucidate<sup>®</sup>).

L'utilisation de matériaux mixtes uniquement synthétiques est toutefois limité. En effet, les cellules ne reconnaissant pas spécifiquement ces matériaux, il n'y a pas de réponse cellulaire spécifique. Pour contrer ce problème, des peptides d'adhésions (peptides RGD) peuvent être incorporés au POE (II)4)4), mais aussi sur les fibres de collagène-PCL. Cependant, le greffage de ces peptides entraîne une altération de la conformation des protéines du fait soit de l'utilisation de solvant organique [175], soit du mode de réticulation non physiologique [169]. De plus, même si des protéines peuvent être adsorbées à la surface de ces polymères, la bioactivité qui en résulte dépend du site d'implantation du matériau qui déterminera le type de protéine qui pourra s'y adsorber et leur conformation. Pour cette raison, l'utilisation de biomatériaux uniquement synthétiques en tant que matrice pour la reconstruction cutanée, n'est à notre connaissance, pas réalisée.

Afin d'avoir des matériaux présentant une bioactivité spécifique propre aux biomacromolécules et les propriétés des matériaux synthétique (résistance mécanique, facilité de mise en forme, ...), les associations de biomacromolécule avec un polymère synthétique ont été développées. Les propriétés recherchées régissent le choix de l'association et la mise en forme. Par exemple, pour palier la difficulté de la mise en forme du chitosan (solubilisation à pH acide, évaporation de solvant aqueux, ...), ce polymère a été mélangé à du PCL dans un solvant acide/éthanol puis électrospinné [174]. Les matériaux obtenus sont manipulables. Même s'il est regrettable qu'aucun test mécanique n'a été réalisé, ces matériaux ont montré qu'ils sont non cytotoxiques et qu'une adhésion et une prolifération cellulaire à leur surface est possible. L'utilisation de polymère synthétique avec un polymère d'origine naturelle peut permettre également d'en augmenter la stabilité dans le temps. Dans ce but, une association en RIP entre du collagène (bioactivité) et du PCL (stabilité) a été réalisée [175]. Ce matériau est obtenu par la formation d'une éponge de collagène (lyophilisation d'une solution de collagène à 0,25% (w/v)) ensuite imprégnée d'une solution de PCL puis évaporation du solvant. Le matériau obtenu est stable après 11 jours de culture mais, là encore, aucune mesure de propriété mécanique n'a été réalisée.



Les cellules présentes à la surface de ce matériau sont capables d'adhérer à la surface et de proliférer. L'association entre un réseau d'origine naturelle et un autre synthétique peut également permettre d'améliorer les propriétés mécaniques du matériau mixte. Dans cette optique, une étude a été réalisée en associant de la soie-séricine (propriété curative sur les lésions cutanées mais fragile) et du PVA (propriété mécanique). Le matériau a été formé par cristallisation du PVA à froid (-20°C) et formation du réseau de soie par agrégation dans l'alcool. Le matériau obtenu présente un module de compression 2,5 fois plus élevé que celui du PVA seul (20 à 50 kPa). De plus ce matériau permet l'adhésion et la prolifération cellulaires à sa surface. Pour finir, sur des tests *in vivo* ce matériau montre une fermeture de la plaie plus rapide (7 jours contre 21 pour l'hydrogel de PVA seul) et une augmentation de la synthèse de collagène par les fibroblastes du derme (50% de plus à 7 jours qu'avec une occlusion de la plaie avec un hydrogel de PVA). Cette étude a démontré que la formation de RIP entre une biomacromolécule et un polymère permet d'obtenir un matériau mixte avec la bioactivité spécifique naturelle de la protéine et les excellentes propriétés mécaniques du polymère. Par cette association, il est donc possible de palier aux défaillances de chacun.

La plupart des substituts cutanés actuels ne sont d'ailleurs pas des homopolymères mais des matériaux mixtes. Dans le paragraphe suivant, la plupart des matrices pour la reconstruction cutanée disponible pour l'utilisation clinique sont dénombrées

## **II]6) Substituts cutanés actuels**

La revue de Shevchenko et al. [178] recense les différents substituts cutanés disponibles en utilisation clinique. Ils les ont classés selon la structure anatomique qu'ils substituent (épiderme, derme ou dermo-épiderme). Leur durée d'utilisation (permanente, semi-permanente ou temporaire), leur nature biologique (autologue, allogénique, xénogénique) ou synthétique (biodégradable, non biodégradable) sont également prises en compte. Certains substituts sont cellularisés et d'autres non. L'origine des cellules est également prise en compte : native, cultivées *in vivo* ou *in vitro*.

L'intérêt thérapeutique des substituts cutanés épidermiques, est encore controversé aujourd'hui bien que le taux de survie de patient soit positif [179]. Les principaux substituts cutanés de type épidermique sont présentés dans le Tableau 13. Ils sont tous utilisés de façon permanente.

Nom commercial	Nature du matériau	Composition du matériau
Epicel	/	Couche cellulaire confluyente
EpiDex	/	Couche cellulaire confluyente
EPIBASE	/	Couche cellulaire confluyente
MySkin	synth	Membrane de silicone avec un traitement de surface adapté
Laserskin	Recomb	Membrane d'acide hyaluronique
Bioseed-S	allo	Colle de fibrine
CellSpray	/	/

**Tableau 13 : Substituts cutanés de type épidermique disponibles pour l'utilisation clinique. Dans tous les cas, des keratinocytes autologues sont incorporés in vitro. Les matériaux sont Synth (synthétique), recomb (recombinant) ou allo (allogénique).**

Il est à noter qu'aucun de ces matériaux n'est d'origine autologue alors que les kératynocytes le sont. Cela est dû au fait que les kératynocytes de source allogénique sont rapidement détruits par le système immunitaire ce qui limite leur efficacité et donc l'intérêt de leur emploi.

Une plus large quantité de substituts cutanés de type dermique est dénombrée. Ce type de matériaux visant à mimer le derme peuvent ne pas comporter de cellules (Tableau 14) ou comporter des fibroblastes (Tableau 15).

Nom commercial	Nature du matériau	Composition du matériau	Durée d'utilisation
Alloderm	allo	Derme humain décellularisé lyophilisé	Permanent
Karoderm, SureDerm	allo	Derme humain décellularisé	Permanent
GraftJacket	allo	Derme humain décellularisé et mis en filet	Permanent
Matriderm	Xeno (bovin)	Derme adsorbé avec de l' $\alpha$ -élastine	Permanent
Permacol Surgical Implant	Xeno (porc)	Derme réticulé avec des diisocyanates	Permanent
OASIS Wound Matrix	xeno (porc)	Sous muqueuse intestinale décellularisée lyophilisée	Permanent
EZ Derm	xeno (porc)	Derme de collagène reconstitué réticulé par des aldéhydes	Temporaire
Integra Dermal Regeneration	xeno (bovin)+ synth	Couche de collagène de tendon avec des glycoaminoglycanes sur une membrane de polysiloxane	Semi-permanent
Terudermis	xeno (bovin)+ synth	Couche d'éponges de collagène dénaturé réticulé sur une membrane de silicone	Semi-permanent
Pelnac Standard	xeno (porc)+ synth	Couche d'atolocollagène sur une membrane de silicone	Semi-permanent
Biobrane	Xeno (porc)+ synth	Collagène dans une structure en nylon déposé sur un film de silicone	Temporaire
Hyalomatrix PA	allo + synth	HYAFF déposé sur une membrane de silicone	Semi-permanent

**Tableau 14 : Substituts cutanés dermiques acellulaires disponibles en utilisation clinique. Les matériaux sont Synth (synthétique), xéno (xénogénique) ou allo (allogénique).**

Nom commercial	Type cellulaire	Nature du matériau	Composition du matériau	Durée d'utilisation
Dermagraft	allo	allo + synth	Matrice de PGA et PLA avec MEC synthétisée par les cellules	Temporaire
Hyalograft 3D	auto	allo	Membrane d'acide hyaluronique	Permanent

**Tableau 15 : Substituts cutanés dermiques cellularisés (fibroblaste, ensemencement in vitro) disponibles en utilisation clinique. Les types cellulaires sont auto (autologue) ou allo (allogénique). Les matériaux sont Synth (synthétique), ou allo (allogénique).**

De nombreuses matrices dermiques sont utilisées de manière temporaire (pansement) ou permanente (greffe). Par rapport aux matrices épidermiques, la présence de cellules n'est pas obligatoire. Les substituts dermiques temporaires non cellularisés servent de support à la migration pour les fibroblastes pour la formation d'un tissu de granulation. Cette mise en place est accélérée lorsque les matériaux sont cellularisés avec des fibroblastes allogéniques (venant d'autres humains). Par rapport aux matrices épidermiques, l'utilisation de fibroblastes issus de lignées cellulaires bien établies est possible. Ces cellules sécrètent de la matrice et des facteurs de croissance permettant d'améliorer la cicatrisation. Cependant, dans la plupart des cas, ces matrices sont ensuite remplacées par des autogreffes.

Pour finir, les substituts cutanés dit dermo-épidermiques, sont les plus sophistiqués et les plus difficiles à produire. Leur but est de mimer la structure de la peau en reproduisant l'épiderme stratifié avec des kératynocytes, et une matrice conjonctive du derme riche avec la présence de fibroblastes. Malgré ces difficultés, des matériaux sont aujourd'hui disponibles en utilisation clinique (Tableau 16).

Nom commercial	Type cellulaire incorporé	Provenance cellulaire	Type cellulaire	Nature du matériau	Composition du matériau	Durée d'utilisation
Allograft, Karoskin	native	native	allo	allo	Peau humaine de cadavre avec le derme et l'épiderme	Temporaire
Apligraf	Ker/Fibro	In vitro	allo	Xeno (bovin)	Matrice de collagène de type I	Temporaire
Orcel	Ker/Fibro	In vitro	allo	Xeno (bovin)	Eponge produite à partir de collagène	Temporaire
Polyactive	Ker/Fibro	In vitro	auto	synth	Matrice de POE et de poly butylène téréphtalate.	Temporaire
TissuTech Autograft System	Ker/Fibro	In vitro	auto	Recomb	Membrane d'acide hyaluronique	Permanent

**Tableau 16 : Substituts cutanés dermo-épidermiques disponibles en utilisation clinique. Les types cellulaires sont Ker (kératinocyte), Fibro (fibroblaste), auto (autologue) ou allo (allogénique). Les matériaux sont Synth (synthétique), recomb (recombinant) ou allo (allogénique).**

Comme pour les substituts cutanés de type épidermique, ces matériaux utilisent des kératynocytes d'origine autologue pour ne pas être rejetés par le corps humain. Par contre, pour les fibroblastes, l'utilisation de cellules allogéniques est bien tolérée par l'organisme. Les substituts cutanés actuels sont capables de mimer soit la structure de l'épiderme, du derme ou des deux en présence ou en absence de cellules. Cependant, les matériaux entrant dans leur composition sont soit allogéniques (originaire de personne décédée), c'est-à-dire de disponibilité limitée, soit en majorité composés de collagène d'origine xénogénique.

A l'heure actuelle, ces substituts cutanés ont un impact positif sur la réépithélisation des zones lésées. En effet, les matériaux de dernière génération présente une rétraction limitée durant la cicatrisation bien que ce point essentiel soit toujours en cours d'amélioration. Les substituts cutanés d'origine xénogénique présentent un manque d'adhésion à la zone lésée ainsi qu'un important déficit dans la vascularisation. Or cette dernière est primordiale pour la « prise » de la greffe sur le site et la formation de tissu le plus proche possible de la peau saine. De part ces limitations, actuellement seuls 3 substituts cutanés à base de collagène sont autorisés en France à savoir EzDerm, Matriderm et Integra. Integra, étant le substitut cutané le plus ancien, il dispose des études cliniques les plus poussées. Or, il a été classifié d'intérêt de niveau III (modéré) dans les blessures graves ou niveau V (nul) pour les blessures avec perte de substance totale [22]. Afin d'améliorer la vascularisation et l'adhésion sur les zones lésées de ces substituts cutanés, de la colle de fibrine a été utilisée [180]. Cette technique a également été appliquée sur des matériaux à base d'acide hyaluronique (HYAFF) [181] et a montré une importante amélioration des taux de « prise » des greffes expliquée par une adhésion forte sur le site lésé et une importante vascularisation.

Partant de ce constat, des études ont montré que la culture de kératynocytes et de fibroblastes sur des hydrogels de fibrine et leur implantation dans les zones lésées permettaient d'obtenir une vascularisation très rapide de ces substituts et une bonne réépithélisation [180, 182]. Cette excellente propriété sur l'angiogénèse des matériaux de fibrine peut s'expliquer par son rôle physiologique dans la cicatrisation. En effet, la fibrine est connue pour agir sur les cellules endothéliales responsables de la vascularisation par l'utilisation des  $\alpha_v\beta_3$ . De plus, ces hydrogels retiennent les facteurs de croissance tels que les VEGF impliqués dans l'angiogénèse. Enfin, les cellules migrent très rapidement lorsqu'elles se déplacent sur un réseau de fibrine [183].

A l'heure actuelle, seuls des matériaux à base de colle de fibrine (fibrinogène et thrombine concentré,  $\approx 60$  mg/ml) ont été étudiés. En effet, la fibrine à une concentration physiologique a des propriétés mécaniques trop faibles pour être facilement manipulée. Or, la formation de structure tubulaire par les cellules endothéliales est meilleure sur des réseaux de fibrine de concentration proche de la concentration physiologique plutôt que sur des gels de fibrine concentrée [184]. Les gels de fibrine sont donc des matériaux très prometteurs car ils permettraient la mise en place de tissu bien intégré à la zone lésée et rapidement vascularisé suivie d'une migration rapide des cellules.

### **III] Conclusion**

Lors de blessures graves (IIème degré profond ou plus), des substituts cutanés sont nécessaires pour permettre la cicatrisation du patient. Aujourd'hui, tous ces substituts qui tentent au

mieux de mimer la complexité de la peau, sont d'origine allogénique ou xénogénique. Toutefois, la plupart d'entre eux adhèrent mal à la zone lésée. De plus, le collagène, la biomacromolécule la plus utilisée pour ce type de matériaux, a montré une néoangiogénèse des tissus insuffisante, contrairement à la matrice de fibrine qui a été utilisée avec succès. Cet hydrogel est, en effet, particulièrement bien adapté à la reconstruction des tissus puisque c'est son rôle physiologique lors de la cicatrisation. Une grande mobilité des cellules le long de son réseau, une prolifération des cellules à sa surface, une action spécifique sur les cellules endothéliales pour l'angiogénèse et enfin sa faculté de servir de matrice provisoire lors de la reformation de tissus, sont ses principaux atouts. Toutefois, ces propriétés ne sont obtenues que dans des conditions physiologiques (concentration, formation par voie enzymatique, ...). Or, dans ces conditions, le gel de fibrine n'est pas suffisamment résistant mécaniquement pour être utilisé en tant que substitut cutané en soit. Actuellement, la fibrine est donc utilisée concentrée (colle de fibrine). Or, les propriétés de la fibrine, en particulier ses propriétés angiogéniques sont supérieures à la concentration physiologique.

Aujourd'hui, il y a un réel intérêt à produire des matériaux comportant un réseau physiologique de fibrine présentant les propriétés mécaniques nécessaires à un substitut cutané. Inclure ce réseau protéique dans une architecture de réseaux interpénétrés de polymères (RIP), pourrait permettre de le renforcer mécaniquement tout en respectant sa structure, sa bioactivité et sa continuité. C'est ce choix qui a été fait dans cette étude.

Par comparaison aux substituts cutanés actuels, la fibrine est le seul matériau pouvant être utilisé en source autologue. En effet, elle est la seule protéine autologue pouvant être récoltée en quantité suffisante pour la formation d'un biomatériau. Afin de conserver la possibilité d'obtenir un matériau autologue, il a été décidé de ne pas utiliser de constituants xénogéniques pour le réseau partenaire. C'est donc naturellement que le choix s'est porté sur un partenaire synthétique du fait de leur grande disponibilité et de leur faible toxicité. Cependant, afin de ne pas limiter les activités cellulaires de migration et de prolifération, il sera nécessaire que ce partenaire synthétique soit dégradable par les actions cellulaires.

Pour mettre au point ces RIPs, le premier partenaire synthétique choisi a été le réseau POE du fait de sa faible toxicité. Ces différents RIPs seront alors analysés afin de savoir s'il y a ou non formation du réseau physiologique de fibrine au sein de la matrice de POE et si la réticulation de ce dernier a pu être réalisée. Les matériaux qui seront retenus seront alors caractérisés afin de savoir si les propriétés mécaniques obtenus sont suffisantes pour les matériaux soient autosupportés à l'état humide et à l'état sec. Dans un second temps, il sera nécessaire de vérifier si les matériaux peuvent être facilement stockés, c'est-à-dire s'il est possible de les sécher puis de les réhydrater avant utilisation tout en gardant leurs propriétés de gonflement et mécaniques. Enfin, il sera primordial de déterminer si les matériaux obtenus sont toxiques ou non et si une population cellulaire est capable de croître sur ce matériau. Cette démarche sera ensuite appliquée à d'autres réseaux de polymères synthétiques si le POE ne répond pas à l'ensemble du cahier des charges du substitut cutané idéal.

# **MATERIELS ET METHODES**

## I] Réactifs chimiques, solvants, enzymes et protéines utilisées

Les caractéristiques des réactifs chimiques utilisés sans purification préalable (sauf si mentionné ci-dessous) sont répertoriées dans le Tableau 17.

Nom	Abréviation	Formule	Masse molaire (g/mol)	Pureté (%)	Fournisseur
Acide borique	/	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	/	Merck
alcool polyvinylique (hydrolysé à 98%)	PVA	-(CH <sub>2</sub> CHOH) <sub>n</sub> -	16 000	/	Acros
azoture de sodium	/	NaN <sub>3</sub>	65,01	99,5	Sigma-Aldrich
bleu de Coomassie (Brillant Blue R)	/	C <sub>45</sub> H <sub>44</sub> N <sub>3</sub> NaO <sub>7</sub> S <sub>2</sub>	825,97	/	Sigma-Aldrich
carbonate de sodium	/	Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	105,99	99	Sigma-Aldrich
chlorure de calcium	/	CaCl <sub>2</sub>	110,98	/	Riedel-deHaën
chlorure de magnésium	/	MgCl <sub>2</sub>	203,3	/	Prolabo
chlorure de sodium	/	NaCl	58,44	/	Fisher
1,2 cyclohexanedione	CHD	C <sub>6</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	112,13	97	Sigma-Aldrich
4',6'-diamidino-2-phénylindole	DAPI	C <sub>16</sub> H <sub>15</sub> N <sub>5</sub>	350,25	/	Sigma
diéthanolamine	/	HN(CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH) <sub>2</sub>	105,14	99	Sigma-Aldrich
dodécylsulfate de sodium	SDS	C <sub>12</sub> H <sub>25</sub> O <sub>4</sub> SNa	288,38	99	Fisher
glycine	/	C <sub>2</sub> H <sub>5</sub> NO <sub>2</sub>	75,06	/	Euromedex
hydroquinone	Hdq	C <sub>6</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	110,11	99,5	Acros
Irgacure 2959	I2959	C <sub>12</sub> H <sub>16</sub> O <sub>4</sub>	224,25	98	Ciba
β-mercaptoéthanol	/	HSCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	78,13	99	Sigma-Aldrich
méthacrylate d'hydroxyéthyle	HEMA	CH <sub>2</sub> =C(CH <sub>3</sub> )COO CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH	130,14	97	Sigma-Aldrich
méthacrylate de N-hydrosuccinimidyle ester	NHSm	C <sub>8</sub> H <sub>9</sub> NO <sub>4</sub>	183,16	98	Sigma-Aldrich
méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle	2-ICEMA	H <sub>2</sub> C=C(CH <sub>3</sub> )CO <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NCO	155,15	98	Sigma-Aldrich
Mono laurate de poly(éthylène glycol)	Tween 20	C <sub>58</sub> H <sub>114</sub> O <sub>26</sub>	1228	/	Sigma-Aldrich
nitrate d'argent	/	AgNO <sub>3</sub>	169,87	99	Sigma-Aldrich
paraformaldéhyde	PFA	HO(CH <sub>2</sub> O) <sub>n</sub> H	/	/	Sigma-Aldrich
Phalloidine FITC	Ph-FITC	C <sub>58</sub> H <sub>63</sub> N <sub>10</sub> O <sub>14</sub> S <sub>4</sub>	1252,44	/	Sigma
Phalloidine Alexa 532	Ph-532	/	/	/	Invitrogène

phenanthrenequinone	/	C <sub>14</sub> H <sub>8</sub> O <sub>2</sub>	208,22	>99	Sigma-Aldrich
phosphate de sodium	/	NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	163,94		Sigma-Aldrich
poly(éthylène glycol) diméthacrylate	PEGDM550	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> C(O)(OCH <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OC(O)C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	550	/	Sigma-Aldrich
Poly(éthylène glycol) diméthacrylate	PEGDM750	C <sub>3</sub> H <sub>5</sub> C(O)(OCH <sub>2</sub> C H <sub>2</sub> ) <sub>n</sub> OC(O)C <sub>3</sub> H <sub>5</sub>	750	/	Sigma-Aldrich
Sel de disodium de 4-Nitrophenyle phosphate hexahydrate	pNPP	O <sub>2</sub> NC <sub>6</sub> H <sub>4</sub> OP(O)(ONa) <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	371,14	99	Fluka
N-succinimide ester Alexa 488	/	C <sub>25</sub> H <sub>15</sub> Li <sub>2</sub> N <sub>3</sub> O <sub>13</sub> S <sub>2</sub>	643,41	/	invitrogen
Sulfate de sodium	/	Na <sub>2</sub> SO <sub>3</sub>	103,5	/	normapur
thiosulfate de sodium	/	Na <sub>2</sub> S <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	158,11	99	Sigma-Aldrich
N-tosyl-L-phenylalanyl chlorométhyle cétone	TPCK	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> ClNO <sub>4</sub> S	379	/	/
Tris-(hydroxyméthyl) aminométhane	Tris	C <sub>4</sub> H <sub>11</sub> NO <sub>3</sub>	121,14	/	VWR
Urée	/	CH <sub>4</sub> N <sub>2</sub> O	60,05	/	VWR

Tableau 17 : réactifs utilisés

Le diméthylsulfoxyde (DMSO, 99%, Sigma-Aldrich) est séché 24h sur de l'oxyde de calcium puis distillé. Une fois distillé, il est stocké à l'abri de la lumière en présence de tamis moléculaire activé et sous argon. L'éthanol (Fisher), l'acide acétique (Sigma-Aldrich) et l'acétone (Fisher) sont utilisés sans purification.

L'ensemble des tampons utilisés sont répertoriés dans le Tableau 18:

Nom	pH	Composition
Tampon Tris	7,4	50 mM Tris.
Tampon de stockage de la Tb	6,5	50 mM Tris, 0,1% (w/v) BSA
Tampon Borate	7,4-9	250 mM acide borique (pH ajusté au NaOH 6M).
Tampon digestion BSA	7,4	250 mM acide borique, 20 mM CaCl <sub>2</sub> .
Tampon de protection des arginines	9	250 mM acide borique.
Tampon de synthèse	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl <sub>2</sub> .
Tampon hydratation	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 20 mM CaCl <sub>2</sub> , 0,02% (w/v) NaN <sub>3</sub> .
Tampon d'arrêt (TNBS)	7	3 mM NaSO <sub>3</sub> , 200 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .
Tampon d'extraction (Elisa)	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,02% (w/v) NaN <sub>3</sub>
Tampon rinçage/dilution (Elisa)	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) tween-20, 0,02% (w/v) NaN <sub>3</sub> .
Tampon de saturation (Elisa)	7,4	50 mM Tris, 150 mM NaCl, 0,05% (v/v) tween-20, 3% (w/v) lait.
Tampon diéthanolamine	9,8	1 M diéthanolamine, 0,5 mM MgCl <sub>2</sub> .
Tampon de dégradation chimique	6,8	160 mM Tris, 8 M urée, 2% (w/v) SDS, 2% (v/v) β-mercaptoéthanol.



Tampon de migration (électrophorèse)	8,3	250 mM Tris, 200 mM glycine, 0,1%(w/v) SDS (l'eau pure 18 mΩ/cm).
Bleu de charge	7,4	50 mM Tris, 12% (w/v) SDS, 200 mM glycine, 30% (w/v) glycerol, 0,05% (w/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% (w/v) BSA
Tampon saturation (SVF)	7,4	200 mM phosphate, 10% (v/v) SVF
Tampon PBS-caséine	7,4	200 mM phosphate, 1% (w/v) caséine

**Tableau 18 : Tampon utilisé dans l'étude**

Les caractéristiques des protéines utilisées sont répertoriées dans Tableau 19

Nom	Abréviation	Masse molaire (kDa)	Pureté (%)	Concentration (U/mg)	Fournisseur
albumine de sérum bovin	BSA	66	98	-	Sigma-Aldrich
Fibrinogène de plasma bovin	Fg	340	95	/	Calbiochem
lysozyme	-	14,3	-	70000	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	/	Chèvre	Alexa 633	A21071, Invitrogen

	lapin				
Ac-Lapin 350	Immunoglobuline (IgG) de lapin	/	Chèvre	Alexa 350	A11046, Invitrogen

**Tableau 20 : récapitulatif des différents anticorps utilisés**

Les réactifs utilisés pour la formation 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. La solution à 5% (w/v) dans du tampon Tris stérile est maintenue 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 dans le tampon de stockage de la Tb.
- L'Irgacure I2959 est solubilisé à 0,6% (w/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 PEGDM (750 ou 550) 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 sont les milieux de culture HAMF12 (Gibco), DMEM High glucose [+ Glutamax-I + 4,5g/L D-glucose + Pyruvate] (Gibco), pénicilline (10000 U)/streptomycine (10000 U) (Gibco), PBS (Gibco), sérum de veau fœtal décomplémenté (SVF) (Gibco), Trypsine EDTA (Prolabo), Alamar Blue® (Invitrogen), Kit LIVE/DEAD (Invitrogen).

## **II] Synthèse / modification des polymères**

### **II]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% (w/v) dans du DMSO pendant 1h à 80°C sous agitation. La solution est ensuite refroidie à 60°C avant addition d'hydroquinone (2.8% massique par rapport au 2-ICEMA). On ajoute ensuite, goutte à goutte, à cette solution homogène, 3% (m/m) de méthacrylate de 2-isocyanatoéthyle (2-ICEMA) par rapport aux fonctions alcool du PVA. 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% (w/v) en PVA. Le PVA fonctionnalisé est ensuite précipité dans 10 fois son volume d'acétone et agité à température ambiante pendant 12h. Le PVA modifié est récupéré par filtration et rincé trois fois avec 250 mL d'acétone. Le PVA obtenu est 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 : 2% des fonctions alcool

RMN <sup>1</sup>H dans le D<sub>2</sub>O: δ 6,15 ppm (1H, s, CH<sub>2</sub>=C), δ 5,58 ppm (1H, s, CH<sub>2</sub>=C), δ 3,8-4,1 ppm (50H, m, CH<sub>2</sub>) et δ 1,4-1,8 ppm (106H, m, CH).

FT-IR : Absence de pic à 2260 cm<sup>-1</sup> (N=CO), 3260 cm<sup>-1</sup> (OH), 1085 cm<sup>-1</sup> (C-O)

Le PVAm est stocké sous vide à une température de 30°C. La solution de PVAm est préparée à 20% (w/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.

### ***II]1)2. Modification de l'albumine de sérum bovin (BSA)***

Préalablement à sa fonctionnalisation la BSA peut être totalement digérée ou avoir subi une digestion ménagée.

#### **II]1)2.A Digestion de la BSA**

La digestion de la BSA, à 4% (w/v) dans du tampon de digestion de BSA, est initiée par de la trypsine à 3500 U/mg de BSA. La trypsine est préalablement traitée au N-tosyl-L-phenylalanyl chlorométhyle cétone (TPCK) afin d'éliminer la chymotrypsine (protéase contaminante de la préparation de trypsine). La solution est incubée 72h à 37°C puis dialysée (M<sub>cut off</sub> 1 kDa) contre un volume 10 fois supérieur de tampon Borate pendant 48h. Les petits peptides sont éliminés.

#### **II]1)2.B Digestion ménagée de la BSA**

Préalablement à la digestion, les arginines de la BSA sont protégées avec le 1,2 cyclohexanedione. Pour cela, à une solution de BSA à 4% (w/v) dans le tampon de protection des arginines, on ajoute 1,5 mole de 1,2 cyclohexaneédione (CHD) par mole d'arginine de la BSA. La réaction de protection est réalisée à 40°C pendant 90 min. La solution est ensuite dialysée (M<sub>cut off</sub> 1 kDa) contre 10 fois son volume en tampon de digestion. La BSA protégée est ensuite digérée selon le même protocole que précédemment.

#### **II]1)2.C Fonctionnalisation de la BSA et de ses fragments**

La fonctionnalisation par des groupements méthacrylate a été réalisée sur la BSA totalement digérée, la BSA ayant subi une digestion ménagée et la BSA native, selon le protocole suivant.

0,7 mol de méthacrylate de N-succinimide ester ( $1,1 \times 10^{-2}$  % (w/v) dans de l'acétone) par mol de lysine de la BSA sont ajoutés goutte à goutte dans la solution de BSA à 4% (w/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 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. Après modification de la BSA native, de la BSA partiellement digérée et totalement digérée, les polymères sont notés respectivement BSA<sub>m</sub>, BSA<sup>CHD</sup><sub>m</sub> et BSA<sub>d,m</sub>. Les solutions de ces protéines modifiées sont utilisées à une concentration de 20% (w/v) dans du tampon Tris. Elles sont maintenues 3h à 37°C avant d'être stérilisées par filtration (0,22  $\mu\text{m}$ ) sous hotte à flux laminaire et stockées à -20°C.

### III] 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 mis au point et décrit en chapitre 1. Les solutions de précurseurs placées dans ce moule, sont exposées à un rayonnement à 365 nm de puissance 1,16 mW/cm<sup>2</sup> (VL-6, Bioblock, 2X 5W, 365 nm, distance lampe-échantillon 5 cm) pendant 60 min. La température est régulée à 37°C. Les matériaux obtenus sont ensuite séparés du moule à l'aide d'un scalpel. 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.

Les différents matériaux sont synthétisés selon différents protocoles en fonction des matériaux.

#### III]1) Gel de fibrine

Un gel de fibrine à 0,5% (noté RS Fb(0,5%)) est formé par incubation à 37°C d'un mélange contenant 5 mg de fibrinogène, 0,04 unités de thrombine par mg de fibrinogène, 150 mM de NaCl et 20 mM de CaCl<sub>2</sub> pour 1 mL de tampon Tris. Le mélange est maintenu à 37°C pendant 1h (temps de gel : 5-10 min). Les proportions de réactifs utilisées pour former les gels de fibrine à d'autres concentrations sont répertoriées dans le Tableau 21.

Formulation	RS Fb(0,5%)	RS Fb(1,25%)	RS Fb(2,5%)
Fibrinogène % (w/v)	0,05	0,125	0,25
Thrombine U/ml	0,2	0,5	1

Tableau 21 : Formulation des gels de fibrine

### III]2) Matériaux à base de POE

Les réseaux simples de POE(RS POE (10%)) sont synthétisés par mélange de 720µL de tampon Tris, 100 µL d'une solution de NaCl à 1,5 M, 10µL d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 2 M et 100 µL de PEGDM. A cette solution sont ajoutés 70 µL d'Irgacure 2959 à 6 mg/mL. Un matériau solide est obtenu en sortie de synthèse. Il est soit translucide (PEGDM, M = 750 g/mol) ou blanc opaque (PEGDM, M = 550 g/mol). Pour les réseaux simples à d'autres concentrations le volume de PEGDM est adapté en conséquence.

Les réseaux interpénétrés de polymère à base de POE sont préparés selon le même protocole. A titre d'exemple, celui du RIP POE/fb(0,5%) est décrit :

100 µL de PEGDM(0,11g), 100µL d'une solution de fibrinogène à 5% (w/v), 70 µL d'une solution d'Irgacure 2959 à 0,6% (w/v), 610 µL de tampon Tris, 100 µL d'une solution de NaCl à 1,5 M et 10 µL d'une solution de CaCl<sub>2</sub> à 2 M sont mélangés dans un eppendorf. Après homogénéisation, 10 µL d'une solution de thrombine à 20 U/mL sont ajoutés. La solution est polymérisée sous UV à 37°C pendant 1h. Les proportions molaires Irgacure/PEGDM et trombine/fibrinogène sont maintenues constantes pour les différentes proportions massiques POE/fibrine, Tableau 22.

Formulation	RIP POE/ Fb(0,05%)	RIP POE/ Fb(0,125%)	RIP POE/ Fb(0,15%)	RIP POE/ Fb(0,5%)	RIP POE/ Fb(1,25%)	RIP POE/ Fb(2,5%)
I 2959% (w/v)	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$
PEGDM% (w/v)	10	10	10	10	10	10
Fibrinogène % (w/v)	0,05	0,125	0,15	0,5	1,25	2,5
Thrombine U/ml	0,02	0,05	0,06	0,2	0,5	1

Tableau 22 : Formulation de RIP à base de POE

### III]3) Matériaux à base de PHEMA

Les RIP POEcoHEMA/Fb ont tous été préparés selon le même mode opératoire. Seul le protocole pour le RIP POE(5%)coHEMA(5%)/ Fb(2,5 %) est décrit.

Pour un volume final de 1 mL, 50µL de PEGDM750 (0,055g) et 52µL de HEMA (0,057g), 500µL de fibrinogène à 5% (w/v), 70 µL d'une solution d'Irgacure 2959 à 0,6% (w/v) sont mélangés avec 168 µL de tampon Tris, 100 µL de NaCl à 1,5 M et 10 µL de CaCl<sub>2</sub> à 2 M dans un eppendorf. 50 µL thrombine à 20 U/ml sont ajoutés juste avant polymérisation sous UV à 37°C pendant 1h. La concentration d'Irgacure et les proportions thrombine/fibrinogène sont maintenues constantes quelle que soit la formulation. Les réseaux simples sont sythétisés avec des concentrations identiques des différents réactifs, seule la fibrine et la thormbine ne sont pas introduites (Tableau 23).

Formulation	RIP POE(7,5%)coHEMA(2,5%) / Fb(2,5%)	RIP POE(5%)coHEMA(5%) / Fb(2,5%)	RIP POE(2,5%)coHEMA(7,5%) / Fb(2,5%)
I 2959% (w/v)	$4,2 \times 10^{-2} \%$	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$
PEGDM750 % (w/v)	7,5	5	2,5
HEMA % (w/v)	2,5	5	7,5
Fibrinogène% (w/v)	2,5	2,5	2,5
Thrombine U/ml	1	1	1

Tableau 23 : Formulation de RIP POEcoHEMA

#### III]4) Matériaux à base de PVAm

Les RIPs à base de PVAm ont été synthétisés selon le même protocole. Seule la synthèse du RIP PVAm(10%)/Fb(0,5%) est décrite. 500  $\mu$ L de PVAm 20% (w/v) sont introduits dans une solution de 210  $\mu$ L de tampon Tris, 100  $\mu$ L de NaCl 1,5 M, 10  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 2M, 70  $\mu$ L d'Irgacure I2959 à 0,6% (w/v) et 100  $\mu$ L de Fibrinogène à 5% (w/v). Le mélange est réalisé dans un tube de 15mL et 10  $\mu$ L de thrombine à 20 U/ml sont ajoutés juste avant polymérisation sous U.V 365 nm à 37°C pendant 1h. La proportion d'irgacure/PVAm et l'ordre d'introduction sont conservés quelle que soit la formulation. Entre les réseaux simples et les RIPs, la concentration des différents réactifs est identiques, seul l'introduction de la fibrine et de la thormbine differentie le RS du RIP (Tableau 24).

Formulation	RIP PVAm(5%)/ Fb(0,5%)	RIP PVAm(7,5%)/ Fb(0,5%)	RIP PVAm(10%)/ Fb(0,5%)	RIP PVAm(15%)/ Fb(0,5%)
I 2959% (w/v)	$2,1 \times 10^{-2}$	$3,15 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$	$6,3 \times 10^{-2}$
PVAm % (w/v)	5	7,5	10	15
Fibrinogène % (w/v)	0,05%	0,05	0,5	0,5
Thrombine U/ml	0,2	0,2	0,2	0,2

Tableau 24 : Formulation des RIPs à base de PVAm

#### III]5) Matériaux à base BSAm

Les matériaux à base de BSAm sont synthétisés de manière identique à celle du PVAm. La proportion d'irgacure/BSAm et l'ordre d'introduction est conservé quelle que soit la formulation. (Tableau 25).

Formulation	RS BSAm(10%)	RIP BSAm(10%)/Fb(0,5%)
I 2959% (w/v)	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$
BSAm % (w/v)	10	10
Fibrinogène % (w/v)	/	0,5
Thrombine U/ml	/	0,2

Tableau 25 : Formulation de matériaux à base de BSAm

### III]6) Matériaux obtenu par copolymérisation entre le PVA et la BSAm

Les RIPs à base de coréseaux PVAm et BSAm sont tous préparés selon le même protocole. Pour 1 mL de solution de précurseurs du RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb(0,5%), une solution composée de 210  $\mu$ L de tampon Tris, 100  $\mu$ L de NaCl 1,5 M, 10  $\mu$ L CaCl<sub>2</sub> 2 M, 70  $\mu$ L de solution d'Irgacure I2959, 100  $\mu$ L de fibrinogène à 5% (w/v) et 250  $\mu$ L de BSAm 20% (w/v) est préparée. 250  $\mu$ L de PVAm 20% (w/v) sont ensuite ajoutés ainsi que 10  $\mu$ L de thrombine à 20 U/mL. La solution est immédiatement placée dans le moule qui est exposé à un rayonnement U.V 365 nm à 37 °C pendant 1h. La proportion entre l'Irgacure I2959/(PVAm+BSAm) reste inchangée quelle que soit la formulation. Les réseaux simples sont sythétisés avec des concentrations identiques des différents réactifs, seule la fibrine et la thormbine ne sont pas introduites (Tableau 26).

Formulation	RIP	
	PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb(0,5%)	PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb(0,5%)
I 2959% (w/v)	$4,2 \times 10^{-2}$	$4,2 \times 10^{-2}$
PVAm % (w/v)	3	5
BSAm % (w/v)	7	5
Fibrinogène % (w/v)	0,5	0,5
Thrombine U/ml	0,2	0,2

Tableau 26 : Formulation des RIPs à base de PVAm et BSAm

## **IV] Méthodes de Caractérisation:**

### **IV]1). Caractérisations du PVA et PVAm**

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% (w/v) avec du D<sub>2</sub>O (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.

Les mesures en infrarouge ont été réalisées sur un spectromètre infrarouge à transformée de fourrier (Equinox 55, Brüker) en transmission. Le PVAm est analysé dans une pastille de KBr à 10%(w/w).

Les mesures en diffusion dynamique de la lumière (DLS) ont été réalisées avec un Zeta sizer nano series modèle Zen3600 de Malvern Instrument à 25°C. Les solutions filtrées (0,22 µm) de PVAm ou de PVA à 0,12% (w/v) dans du tampon Tris sont placées dans une cuve en quartz de 4 mL. La mesure est réalisée avec 12 balayages successifs de la même solution après une isotherme de 2 min à 25°C. Les résultats sont ensuite traités via le logiciel Zetasizer software V 6.20 (Malvern instrument). Le modèle mathématique d'analyse est utilisé en mode standard.

### **IV]1)2. Dosage des amines libres par la phénanthrènequinone**

Les amines du groupement guanidinium de la chaîne latérale de l'arginine sont dosées par fluorométrie après un couplage spécifique avec la phénanthrènequinone. Les solutions mères utilisées sont une solution de HCl 1,2M, une solution de NaOH 2M, une solution de phénanthrènequinone à 5.10<sup>-5</sup>M dans l'éthanol absolu. La réaction de couplage est réalisée pendant 15 min à 60°C à l'abri de la lumière en introduisant 8x10<sup>-4</sup>% (w/v) de BSA<sup>CHD</sup>m, 2,2x10<sup>-1</sup> M de NaOH et 3,3x10<sup>-5</sup> M de phénanthrènequinone pour un volume final de 1 mL. La réaction est stoppée en acidifiant le milieu avec 8,4x10<sup>-1</sup> M HCl. La fluorescence de la solution est ensuite quantifiée avec un spectromètre à fluorescence (Perkin Elmer LS 50 B). La longueur d'excitation est à 312 nm et la longueur d'émission est 395 nm pour une ouverture des fenêtres de 5-5.

### **IV]1)3. Dosage des amines par le TNBS**

Des solutions de BSA sont réalisées à des concentrations variant de 0,1 à 2 mg/mL 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 initiée par 10 µL TNBS à une concentration 5% (w/v). La solution est incubée 5 min à température ambiante, puis la réaction est arrêtée par l'ajout 1 mL du tampon d'arrêt (3 mM NaSO<sub>3</sub> et 200mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>). L'absorbance est mesurée avec un spectrophotomètre (Uvikon XS double faisceau, Secomam) à 420 nm.



#### **IV]1)4. Quantification et analyse des fractions solubles :**

##### **IV]1)4.A Réseau synthétique : Extraction par Soxhlet**

Les fractions solubles (composés non attaché au réseau de polymère) sont quantifiées par extraction au Soxhlet. Les matériaux sont séchés 24h dans une étuve à 37°C, puis sous vide dynamique (pompe à palette) à 30°C pendant au minimum 48h. Leur masse sèche ( $M_{\text{initiale}}$ ) est ensuite mesurée. Les échantillons sont extraits pendant 48h avec du dichlorométhane pour les matériaux à base de POE ou de l'eau pour les matériaux à base de PVA et BSA<sub>m</sub>. Les échantillons sont ensuite récupérés et séchés comme précédemment jusqu'à masse constante ( $M_{\text{finale}}$ ). Le taux d'extractible contenu dans les matériaux ( $T\%_{\text{extractible}}$ ) est calculé comme :

$$T\%_{\text{extractible}} = ((M_{\text{initiale}} - M_{\text{finale}})/(M_{\text{initiale}}))*100$$

##### **IV]1)4.B Réseau protéique : test Elisa**

Immédiatement après synthèse, les matériaux (600 µL) sont incubés à 37°C pendant 12h dans 10 mL de tampon de fixation. 100 µL 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 puit est rincé 3 fois avec 200 µL de tampon de rinçage. 200 µL 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 µL 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 µL de solution d'anticorps secondaires (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 µL de la solution de sel de disodium de 4-nitrophenyle phosphate hexahydrate (pNPP) préparée extemporanément à 0,1% (w/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 µL 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 étalon sont réalisées pour chaque série de mesures. Chaque mesure est réalisée 3 fois pour chaque matériau issu de 3 synthèses différentes.

#### **IV]1)5. Coloration des matériaux au bleu de Coomassie**

Immédiatement après leur synthèse, les matériaux sont plongés dans une solution aqueuse de coloration au bleu de Coomassie composée de 2,5% (w/v) de Brillant blue G-250 (Biorad) solubilisé dans 40% (v/v) d'éthanol et de 7%(v/v) d'acide acétique. Après 90 min d'incubation sous agitation à température ambiante, les matériaux sont rincés à l'aide d'un mélange d'éthanol 20% (v/v) et d'acide acétique 10% (v/v). Le bain de décoloration est renouvelé régulièrement jusqu'à élimination du colorant en excès.

#### ***IVJ1)6. Dégradation chimique du réseau de fibrine***

Le réseau de fibrine est extrait des réseaux simples ou des réseaux interpénétrés de polymères par incubation dans du tampon de dégradation chimique à 37C° pendant 72h.

#### ***IVJ1)7. Electrophorèse***

Les gels de polyacrylamide à 10% (utilisés pour l'analyse de la destruction du gel de Fb) sont formés de d'un gel de concentration et d'un gel de résolution. Les solutions suivantes sont réalisées avec de l'eau pure (18 mΩ/cm). 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% (w/v) et 0,1% (w/v) de SDS. La polymérisation est amorcée par 0,1% (v/v) de Temed (GE Healthcare) et 0,05% (w/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% (w/v) d'acrylamide/bis acrylamide (Euromedex) et 0,1% (w/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 de polyacrylamide 16,5% (analyse de la digestion de BSA) sont des gels prêts à l'emploi (Mini protean precast gels Tris-Tricine 16,5% -Biorad-). 8 µg de protéine présente dans la solution sont mélangés à une proportion volumique de 1:1 à du bleu de charge. Les échantillons sont ensuite déposés dans les puits. Les marqueurs de masse molaire utilisés pour ces gels précoulés sont le « Color Marker Ultra Low Range (Sigma) ». Le tampon de migration (protean) de la cathode est une dilution au dixième du tampon commercial (Biorad). Il est utilisé avec le tampon d'anode. La migration des protéines dans le gel est réalisée sous un voltage constant de 30 Volts. Une fois que les protéines ont pénétré le gel, le voltage est augmenté à 80 volts.

Pour la coloration à l'argent, le gel est plongé pendant 30 min dans une solution de fixation contenant 45% (v/v) d'éthanol et 10% (v/v) d'acide acétique. Après la fixation, le gel est rincé à 3 reprises avec de l'eau distillée pendant 15 min, puis déposé 2 min dans une solution de thiosulfate de sodium à 0,02% (w/v) et rincé à nouveau 2 fois 2 min à l'eau distillée. Le gel est ensuite immergé dans une solution de nitrate d'argent à 0,1% pendant 20 min, puis rincé à l'eau distillée. La coloration est révélée par un mélange de 2,5% (w/v) de carbonate de sodium et 0,03% (v/v) de formaldéhyde jusqu'à apparition de bandes. Le développement est stoppé par immersion du gel dans une solution d'acide acétique 5% (v/v). 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).

#### **IV]1)8. Western Blot :**

Les échantillons sont placés en migration sur un gel de polyacrylamide à 10% précédemment décrit. Les protéines présentes dans le gel 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 sur la membrane 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. 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.

#### **IV]1)9. Cycles séchage/hydratation :**

Les matériaux à base de POE sont synthétisés puis immergés dans le tampon de synthèse jusqu'à masse hydratée constante ( $M_{\text{maximum d'hydratation}}$ ). 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 ( $M_{\text{sec i}}$ ). Le taux de gonflement initial ( $SR_i$ ) est calculé selon la relation suivante :

$$SR_i = \frac{M_{\text{maximum d'hydratation}}}{M_{\text{sec i}}}$$

Les matériaux sont ensuite à nouveau immergés dans le tampon d'hydratation jusqu'à ce que la masse hydratée ( $M_{\text{hydratation1}}$ ) soit constante. Le taux d'hydratation ( $SR_1$ ) a été déterminé après un nouveau séchage ( $M_{\text{sec1}}$ ), par la relation :

$$SR_1 = \frac{M_{\text{hydratation1}}}{M_{\text{sec1}}}$$

La réversibilité (%R) à la déshydratation peut être alors calculée en comparant les deux taux d'hydratation selon la relation :

$$\%R(i \rightarrow 1) = \frac{SR_1}{SR_i} \times 100$$

En ce qui concerne les matériaux à base de PVAm et BSAm, les mesures ont été réalisées afin d'évaluer la capacité de ces matériaux à retourner à leur taux de gonflement post synthèse après un cycle de déshydratation. Immédiatement après leur synthèse, les matériaux sont pesés. Cette masse correspond à leur masse hydratée post synthèse ( $M_{\text{hydraté postS}}$ ). Ils sont ensuite séchés 24h, à pression et température ambiantes, avant d'être placés sous vide à 30°C, jusqu'à masse constante. Cette masse correspond à la masse sèche initiale ( $M_{\text{sec i}}$ ). Le taux de gonflement post synthèse ( $Sr_{\text{postS}}$ ) est calculé par la relation :

$$Sr_{\text{postS}} = \frac{M_{\text{hydraté postS}}}{M_{\text{sec i}}}$$

Les matériaux sont ensuite à nouveau immergés dans le tampon d'hydratation jusqu'à ce que la masse hydratée ( $M_{\text{hydratation1}}$ ) soit constante. Les matériaux sont ensuite séchés à nouveau et leur masse sèche est relevée lorsque celle-ci est stable ( $M_{\text{sec1}}$ ). Le taux d'hydratation ( $SR_1$ ) est calculé par la relation :

$$SR_1 = \frac{M_{\text{hydratation1}}}{M_{\text{sec1}}}$$

Le retour au taux de gonflement post synthèse des matériaux après une deshydratation, c'est-à-dire leur réversibilité ( $\%R_{\text{postS}}$ ), est évaluée par la relation :

$$\%R_{\text{postS}} = \frac{SR_1}{Sr_{\text{postS}}} \times 100$$

#### **IV]1)10. Marquage du réseau de fibrine**

Le réseau de fibrine des RIPs à base de PVAm est marqué avec le N-succinimide ester Alexa 488. Après synthèse, les matériaux sont plongés pendant 24h dans 10 fois leur volume de tampon carbonate 0,2 M pH 8,5. Le N-succinimide Alexa 488 y est ensuite dissous dans une proportion de 14 pour 1 par rapport au nombre de mole de fibrine et incubé avec le matériau pendant 12h à 37°C avant trois rinçages successifs d'une heure au tampon Tris avec un volume 10 fois supérieur à celui des matériaux.

Le réseau de fibrine des matériaux à base de POE est marqué spécifiquement avec l'Ac-Fg FITC. Après synthèse, les matériaux sont incubés dans une solution de saturation pendant 3h à 37°C, puis dans une solution de saturation avec l'anticorps anti fibrinogène dilué au 1/100 à 37°C pendant 3h. 3 rinçages successifs dans un tampon Tris d'un volume 10 fois supérieur à celui des matériaux est réalisé.

En ce qui concerne les matériaux comportant de la BSA, la technique de comarquage consiste à saturer les matériaux dans un tampon PBS-caséine pendant 1h à 37°C. Le marquage du matériau est effectué tout d'abord par une solution d'Ac-BSA au 1/50 dans le PBS à 1% (w/v) de caséine incubé 1h à 37°C. Après 3 rinçages successifs au PBS, le matériau est incubé dans une solution d'anticorps secondaire Ac-lapin 350 (dilution 1/100 dans le Tampon PBS-caséine) et est incubé également 1h dans les mêmes conditions. Pour finir, le matériaux est marqué à l'Ac-Fb FITC (dilution au 1/100 dans le tampon PBS-caséine) par incubation 1h à 37°C. Le matériau est rincé 3 fois au tampon PBS avant d'être observé en microscopie confocale.

### ***IV]1)11. Microscopie***

Les observations de microscopie à épifluorescence sont réalisées à l'aide d'un microscope droit (DMLB, Leica) avec l'objectif à immersion x63. Lors des cultures cellulaires, les images sont retraitées via le logiciel GIMP.

Les images de microscopie confocale ont été réalisées sur un microscope confocal à balayage laser inversé LSM 710 de Zeiss (Allemagne) avec les objectifs x10, x20 ou à immersion x63. Les images sont ensuite exploitées via le logiciel ImageJ.

## **V] Analyses mécaniques et thermiques**

Avant toutes analyses des matériaux à l'état sec, les échantillons sont séchés à plat pendant 24h à 37°C, puis placés sous vide dynamique à 30°C pendant au moins 48h.

### ***V]1)1. Analyse dynamique mécanique (DMA)***

Les matériaux d'une épaisseur moyenne de 0,5 mm sont découpés pour obtenir des échantillons de 17 mm de longueur pour 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).

### ***V]1)2. Calorimétrie différentielle à balayage (DSC)***

Les variations enthalpiques sont mesurées de -50 à 250°C avec une rampe de température de 20°C/min (en chauffe et refroidissement) par calorimétrie différentielle à balayage sur une DSC Q100 (TA instrument) calibrée avec un standard d'indium. Deux cycles sont réalisés sur chacun des échantillons. Les transitions observées sur le deuxième cycle sont ensuite analysées via le logiciel Universal Analysis V 4.3A (TA instruments).

### ***V]1)3. Analyse thermogravimétrique***

La dégradation thermique et le taux de solvant résiduel sur les échantillons sec sont mesurés à l'aide d'analyse thermogravimétrique (TGA). Ces mesures sont réalisées sur une Q50 (TA Instrument) en atmosphère argon (60mL/min) de la température ambiante à 500°C à une vitesse de

chauffe de 5°C/min. Les signaux recueillis sont ensuite analysés sur le logiciel Universal Analysis V 4.3A (TA instruments).

Les isothermes de déshydratation des matériaux sont enregistrés sur des hydrogels à leur taux maximum d'hydratation atteint après immersion pendant 48h à 37°C dans le tampon d'hydratation. Les isothermes sont enregistrées à 37°C sous un flux d'argon de 5 mL/min.

#### ***VJ1)4. Caractérisation rhéologique***

Les modules de  $G'$  et  $G''$  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 synthétisés au préalable et stockés dans leur tampon de synthèse avec une géométrie plan/plan 25mm en aluminium. Les conditions de mesures optimales sont une fréquence constante de 1 Hz et une déformation de 1% sans maintien de la force normale pendant 5 min. Ces conditions se trouvent dans le domaine de linéarité des matériaux

Le suivi de la photopolymérisation *in situ* a été réalisé avec une géométrie cône (2°troncatures 105µm)/plan en verre couplé à une source U.V (Omnicure Serie 1000 -Exfo- puissance à 1% soit 4,46 mW/cm<sup>2</sup>). La solution de précurseurs est déposée sur le plan inférieur et est maintenue à 37°C. Les paramètres  $G'$  et  $G''$  sont mesurés à une déformation imposée de 1% appliquée à une fréquence de 1Hz.

## **VIJ Biocompatibilité**

### **VIJ1) Culture cellulaire**

#### **VIJ1)1. Mise en culture des lignées**

Les matériaux à base de POE ont été testés avec la lignée cellulaire de *Chinese Hamster Ovarian* (CHO). Pour les matériaux à base de PVAm et de BSAm, la lignée cellulaire utilisée sont des fibroblastes de derme humain issu de prépuce de nouveau-né (FB-BJ). Les conditions de culture sont rassemblées dans le Tableau 27.

Nom de la lignée	Type de milieu de culture	
	Milieu de culture minimum	Milieu de culture complet
CHO	HAMF12 + Penicilline(20 U/ml)/Streptomycine (20 U/ml)	HAMF12 + Penicilline(20 U/ml)/Streptomycine (20 U/ml)+ 10% (v/v) SVF
FB-BJ (ATCC CRL-2522)	DMEM High glucose + Penicilline(20 U/ml)/Streptomycine (20 U/ml)	DMEM High glucose + Penicilline(20 U/ml)/Streptomycine (20 U/ml)+ 10% (v/v) SVF

Tableau 27 : Modèles cellulaires et milieux de culture associés

Les lignées cellulaires sont cultivées dans un incubateur à 37°C sous atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Les deux lignées cellulaires 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 (CHO : 12000 cellules/cm<sup>2</sup> et FB-BJ : 13000 cellules/cm<sup>2</sup>). Dans le cas de CHO, aucune limite dans le nombre de passages n'a été reportée. Dans le cas des FB-BJ, un nombre de passages supérieur à 15 est à éviter. Par conséquent, les populations de FB-BJ ont été utilisées entre 7 et 12 passages.

### ***VI]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 10<sup>6</sup> 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% CO<sub>2</sub>.

### ***VI]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 PVAm et BSAm. Le milieu est ensuite aspiré et une suspension cellulaire de 1 mL à une concentration cellulaire de 10<sup>5</sup> cellules/mL est placée sur chacun des matériaux. Les CHO sont cultivés à la surface des matériaux POE pendant 96h alors que les FB-BJ sont cultivés 3 semaines sur les matériaux à base de PVAm et BSAm avec renouvellement du milieu de culture complet toutes les semaines dans une étuve à 37°C en atmosphère humide et 5% de CO<sub>2</sub>.

Pour réaliser les encapsulations cellulaires des FB-BJ dans les RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, la suspension cellulaire est ajoutée à la solution de précurseurs de telle sorte que la concentration finale soit de 6,1x10<sup>6</sup> cellules/mL. Les matériaux sont ensuite synthétisés selon le protocole décrit précédemment (Tableau 26). Les matériaux cellularisés ainsi obtenus sont placés dans une plaque de culture en milieu de culture complet renouvelé une fois après 1h d'incubation. Les cellules encapsulées dans les matrices sont cultivées pendant 3 semaines. Le milieu de culture complet est renouvelé toutes les semaines.

#### ***VIJ1)4. Test Alamar Blue®***

Les matériaux à base de POE sont extraits de leurs puits de culture et déposés dans des puits vierges. Une solution à 10% (v/v) d'Alamar Blue® dans du milieu de culture complet est incubée avec les matériaux pendant 3h à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Les surnageants sont ensuite récupérés et leur fluorescence est mesurée entre 550 à 610 nm sous une excitation à 530 nm. Les mesures sont réalisées à 20°C avec un spectrofluorimètre (Perkin Elmer LS 50 B).

Les matériaux à base de PVA et BSA<sub>m</sub> sont conservés dans leur puits de culture mais leur milieu de culture est remplacé par une solution d'Alamar Blue® à 10% (v/v) dans du milieu de culture complet. La plaque de culture est mise en incubation 3h à 37°C en atmosphère humide à 5% de CO<sub>2</sub>. Les surnageants sont ensuite transférés dans une plaque 96 puits et leur absorbance est mesurée à 570 et 595 nm à l'aide d'un lecteur de plaques (ELX 800, Biotek).

#### ***VIJ1)5. Test LIVE/DEAD®***

Les surnageants au-dessus 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 CO<sub>2</sub> pendant au minimum 30 min. Les matériaux sont ensuite extraits de leurs puits de culture et directement observés en microscopie confocale. Les images sont enregistrées jusqu'à sur une profondeur de 80 µm tous les 1 µm. L'émissions des deux fluorophores (Tableau 28) sont détectés simultanément (mode : séquentiel line).

<b>Fluorophore</b>	<b>Longueur d'onde d'excitation (nm)</b>	<b>Dichroïque</b>	<b>Plage d'émission mesurée (nm)</b>
<b>Calcéine AM</b>	488	488/561	491-573
<b>Homodimère d'éthidium-1</b>	561	488/561	581-735

Tableau 28 : condition de mesure du test LIVE/DEAD.

#### ***VIJ1)6. Marquage fluorescent des populations cellulaires***

Des différents marquages fluorescents sont réalisés selon les populations cellulaires cultivées.

Les cellules présentes sur les matériaux à base de POE sont fixées par du paraformaldehyde (PFA) à 3% (w/v), puis rincées 3 fois au tampon PBS avec 5 min d'incubation entre chaque rinçage. Elles sont ensuite perméabilisées par l'ajout de PBS-Triton 0,1% (v/v) pendant 5 min à 4°C et rincées 3 fois 5 min au tampon PBS 0,2 M pH 7,4. On ajoute ensuite du tampon de saturation pendant 30 min à température ambiante. Ce tampon est ensuite aspiré, puis une goutte de la solution de marquage (Tampon de saturation et 10<sup>-3</sup>% (w/v) de DAPI et 1% (v/v) de phalloïdine-FITC) est étalée sur chaque matériau. Après 1h à température ambiante à l'abri de la lumière, les échantillons sont rincés 3 fois



au tampon de saturation et les matériaux sont stockés à 4°C. Ils sont ensuite imagés par microscopie à épifluorescence.

En présence des matériaux à base de PVAm et BSAm, les cellules sont fixées dans une solution PBS-paraformaldéhyde à 3% (w/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 sur ces échantillons sont perméabilisées grâce au tampon de perméabilisation à 4°C durant 30 min à température ambiante et rincés 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 primaire sont ensuite étalés 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, ils sont rincés 3 fois avec du tampon PBS et stockés à 4°C.

<b>Solution d'anticorps primaires</b>	<b>Solution secondaires</b>
Ac-Coll, dilution au 1/200.	Ac-Souris 488, dilution 1/100.
AC-Ha, dilution 1/300.	Ac-Mouton 568, dilution 1/100.
Ac-Fn, dilution 1/200	Ac-Lapin 633, dilution 1/100.
	DAPI, dilution 1/10000
	Ph-532, dilution 1/100.

**Tableau 29 : Combinaison de sondes pour l'immunomarquage des cellules cultivées en présence des matériaux à base de PVAm et de BSAm**

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 rassemblé dans le Tableau 30.

<b>Numéros de la piste</b>	<b>PMT</b>	<b>Fluorochrome</b>	<b>Longueur d'onde d'excitation (nm)</b>	<b>Dichroïque</b>	<b>Plage d'émission mesurée (nm)</b>
1	Ch1	Dapi	405	488/561/633 + 405	394-491
2	ChS1	Alexa 488	488	488/561/633 + 405	494-533
	Ch2	Alexa 633	633		641-756
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 quintuple marquages**

# **RESULTATS ET** **DISCUSSIONS**

# **Chapitre I : Matériaux manipulables**

Comme souligné lors de la synthèse bibliographique, le but de ce travail est de synthétiser un matériau biocompatible et autosupporté, contenant un réseau de fibrine à la concentration physiologique. Nous avons ajouté comme critère qu'il puisse être facilement manipulé à l'état hydraté et stocké à l'état sec. Obtenir ces propriétés permettrait d'utiliser les exceptionnelles qualités de la fibrine en tant qu'hydrogel pour la réparation tissulaire. Le but final étant d'utiliser ce matériau en tant que pansement ou comme support pour la régénération cutanée, le comportement des cellules de la peau à son contact sera particulièrement étudié.

Tout d'abord, les caractéristiques des réseaux de fibrine à différentes concentrations seront présentées. Ensuite, la démarche visant à renforcer les propriétés mécaniques du réseau de fibrine sera décrite. Une synthèse des travaux réalisés durant la thèse d'Edefia Akpalo sera exposée. Elle a, en effet, démontré la possibilité d'associer un réseau de fibrine et un réseau polymère synthétique. L'optimisation de ce procédé ainsi que les propriétés des matériaux formés seront détaillées. Pour finir la non-toxicité de ces nouveaux matériaux sera évaluée.

## I] Le réseau de fibrine :

Tout d'abord, la synthèse et les caractéristiques du réseau de fibrine sont présentées car ce réseau nous sert de référence tout au long de ce travail.

### I]1) Synthèse du réseau de Fibrine :

Pour rappel, la fibrine est issue de l'hydrolyse spécifique et séquentielle du fibrinogène par la thrombine. La protéine s'organise sous forme de protofibrilles susceptibles de former un gel par percolation lorsque la concentration en fibrinogène est suffisante (Figure 22).

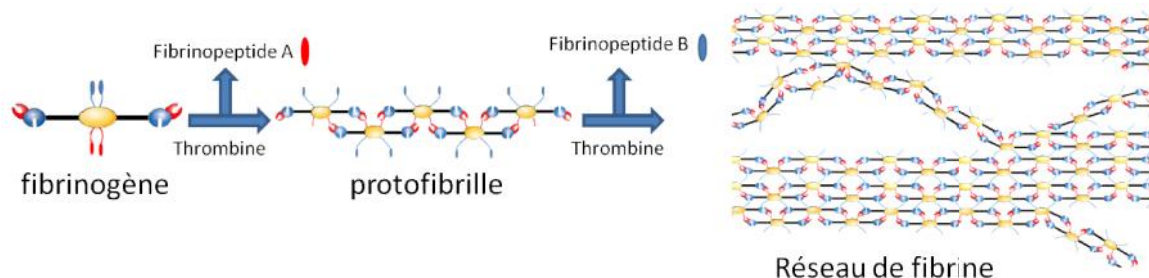


Figure 22 : Formation du réseau de fibrine sous l'action de la thrombine sur le fibrinogène

Dans ce travail, le fibrinogène (Fg) et la thrombine (Tb) utilisés sont d'origine bovine. Deux solutions de fibrinogène à 0,5% (w/v, concentration physiologique) et 2,5%(w/v) sont réalisées dans un tampon de synthèse. Le rapport Tb/Fg est fixé à 0,04 U/mg de Fg. Le mélange Fg-Tb est maintenu à 37°C pendant 1 h. La formation des gels de fibrine est observée dès 5 min et les propriétés viscoélastiques sont stables dès 15 min. Des gels sont obtenus et sont notés, respectivement, RS Fb(0,5%) et RS Fb(2,5%) en fonction de la concentration initiale en Fg.

## **I]2) Caractérisation du réseau de fibrine :**

Afin de vérifier la formation de ces réseaux, leur fraction soluble (fraction de protéines qui n'a pas réagi) est extraite puis quantifiée à l'aide d'un test Elisa (matériel et méthode, IV]1)4.B). Les résultats de ce dosage montrent que, dans les conditions de synthèse utilisées, le RS Fb(0,5%) et le RS Fb(2,5%) sont tous deux remarquablement formés puisque leurs fractions solubles ne sont, respectivement, que de  $0,03 \pm 0,03\%$  et de  $0,01 \pm 0,01\%$ .

### ***I]2)1. Propriétés mécaniques des réseaux de Fb :***

Les propriétés mécaniques des gels hydratés incubés 24h dans le tampon de synthèse à température ambiante sont évaluées par rhéologie. Les mesures n'ont pas pu être réalisées sur le RS Fb(0,5%), car ce dernier n'est pas manipulable, au point de ne pas pouvoir le placer dans le rhéomètre. Par contre, le RS Fb(2,5%) est un hydrogel autosupporté avec un module de stockage de  $2400 \pm 700$  Pa, donc 80 fois plus élevé que celui d'un réseau à la concentration physiologique (30 Pa [<sup>185</sup>] – mesure réalisée sur un gel directement synthétisé dans le rhéomètre).

Ces matériaux ont ensuite été séchés. Il n'a pas été possible d'obtenir d'échantillon sec assez tenace pour pouvoir réaliser des mesures en DMA. Quelle que soit la concentration des précurseurs, le réseau de fibrine est trop fragile pour être manipulé à l'état sec. De plus, après une réhydratation, il ne récupère que 22% de son taux de gonflement initial ce qui exclut toute possibilité de stockage à l'état sec.

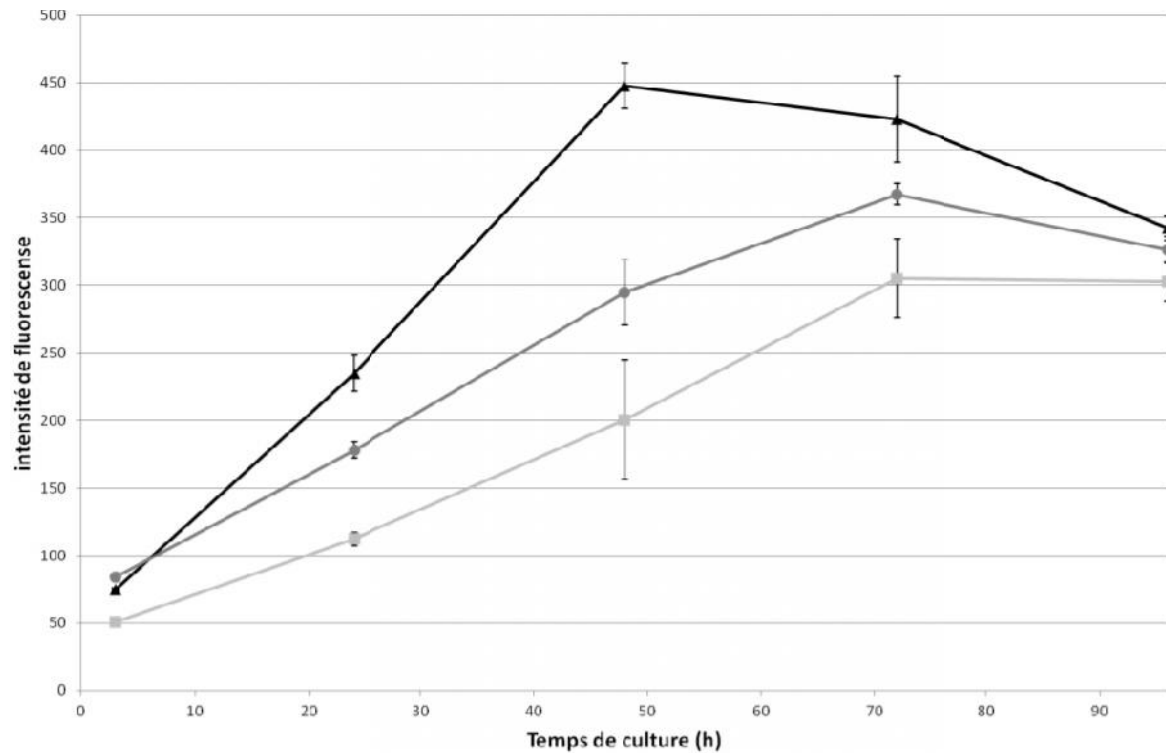
### ***I]2)2. Biocompatibilité des RS Fb(2,5%)***

Le comportement cellulaire a été étudié à la surface du gel de fibrine. Pour cela, des cultures cellulaires sont réalisées à sa surface. Le type cellulaire retenu est issu d'épithélium d'ovaire de hamster chinois (CHO). Il est très robuste, peu exigeant sur les conditions de culture et présente un temps de division faible ( $\approx 18$ h). Après synthèse, les RS Fb(2,5%) (surface  $\approx 2\text{cm}^2$ ) sont incubés 24h dans du milieu de culture complet à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub> en atmosphère humide. Une suspension cellulaire est ensuite déposée à la surface des matériaux (50000 cellules/cm<sup>2</sup>). Les matériaux avec les cellules sont incubés entre 3 et 96h.

Le test d'activité métabolique est réalisé sur les cellules cultivées sur des RS Fb(2,5%), du polystyrène de culture et des lamelles de verre. La mesure est basée sur la détermination de l'activité enzymatique des chaînes respiratoires mitochondriales. Le test métabolique Alamar Blue® permet une quantification de l'activité cellulaire par mesure spectrophotométrique. Brièvement, l'Alamar blue® est bleu lorsque sa composante principale, la rezazurine, est dans son état oxydé. Sous l'action des chaînes respiratoires mitochondriales, la rezazurine est réduite en rezafurine qui est rouge. Ce

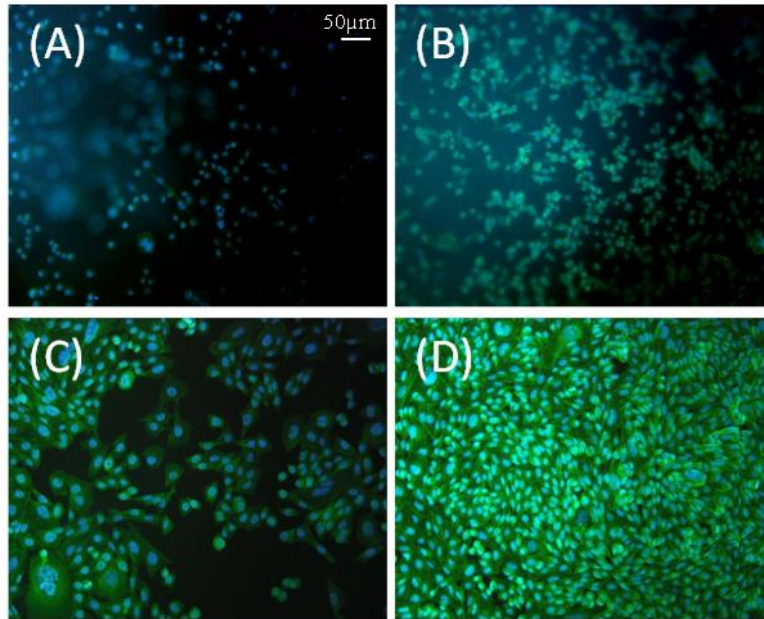
test non destructif permet ultérieurement les observations microscopiques des cellules. Ce qui a été réalisé (Chapitre matériels et méthodes, VI]1)6).

L'évolution de l'activité métabolique en fonction du temps de culture et du support est présentée sur la Figure 23.



**Figure 23 :** Evolution de l'activité métabolique (réduction d'une solution d'Alamar Blue<sup>®</sup> 10% (v/v) pendant 3h) en fonction du temps de culture de CHO déposés à la surface des matériaux RS Fb(2,5%) (■), polystyrène traité pour la culture cellulaire (●) et lamelles de verres (▲)

Comme attendu, les résultats montrent qu'un RS Fb(2,5%) n'est pas toxique pour la culture cellulaire. En effet, bien qu'inférieure à celle mesurée sur des surfaces modèles (lamelle de verre et polystyrène traité pour la culture cellulaire), l'activité métabolique sur le RS Fb(2,5%) croît de 3 à 72h d'incubation avant de se stabiliser entre 72 et 96h. Cette augmentation de l'activité cellulaire suggère qu'il y a augmentation de la population cellulaire à la surface des matériaux. Cette hypothèse est vérifiée par microscopie à épifluorescence (Figure 24).



**Figure 24** : Observation en microscopie à épifluorescence (objectif x20) de CHO à la surface de RS Fb(2,5%) après 24h (A) et 96h (B) de culture ainsi qu' à la surface de lamelle de verre aux mêmes temps respectivement (C) et (D). Le noyau apparaît en bleu (coloration au Dapi) et le cytosquelette en vert (coloration à la phalloïdine couplée FITC).

Entre 3 et 96h d'incubation (Figure 3 A et B), la population cellulaire augmente sur le RS Fb(2,5%). Les cellules ne présentent pas de noyau apoptique. Cependant, en comparant la morphologie cellulaire sur ces matériaux par rapport à celle observée sur une lamelle de verre à des temps équivalents (Figure 24, C et D), les cellules sur gel de fibrine concentrée présentent une morphologie ronde, non étalée. De plus, même après 4 jours, la surface de l'hydrogel n'est pas recouverte de manière homogène par la population cellulaire. A plus fort grossissement (objectif x63, images non montrées), aucun pseudopode n'est visible. Ces données suggèrent que même si une croissance cellulaire est observée à la surface de réseau de fibrine concentrée, l'absence d'étalement ou de structure liée à l'invasion cellulaire (pseudopode) indique que ce matériau ne permet pas une croissance cellulaire optimale.

Pour conclure, un réseau de fibrine physiologique (RS Fb(0,5%)) n'est pas un hydrogel autosupporté, mais une augmentation importante de la concentration de fibrine (x 5) permet l'obtention d'un matériau manipulable (RS Fb(2,5%)). Cependant, ce matériau n'est pas stockable à sec (très fragile et capacité de réhydratation faible). De plus, la croissance cellulaire à sa surface n'est pas optimale en comparaison à surface en verre. En effet, la morphologie cellulaire reste anormalement ronde pour ce type cellulaire.

La suite de l'étude consistera à développer des matériaux autosupportés comportant un réseau de fibrine à la concentration physiologique ou plus concentrée, présentant les propriétés d'un pansement idéal : biocompatibilité, propriétés mécaniques adéquates aux états humide et sec, une bonne réversibilité au cycle de déshydratation / réhydratation pour un stockage à sec. Au cours de la thèse d'Edefia Akpalo, la possibilité de produire ce type de matériaux en utilisant une architecture en réseaux interpénétrés de polymères associant un gel de fibrine à un réseau de polymère synthétique avait été démontrée. Un résumé de cette étude est présenté dans le paragraphe suivant.

## II] Réseaux interpénétrés de polymères à base de fibrine.

### II]1) Présentation des travaux antérieurs

Le réseau partenaire doit conférer au gel de fibrine les propriétés mécaniques adaptées, aussi bien à l'état humide que sec, et une capacité de réhydratation réversible afin de permettre un stockage du matériau à sec. Idéalement, il ne doit pas interférer sur les propriétés du réseau de Fb (croissance et étalement cellulaire, support de la matrice extracellulaire néo synthétisée, ...). Le polymère synthétique doit être faiblement toxique, présenter un mode de réticulation et une nature chimique compatibles avec la formation du réseau de fibrine par voie enzymatique comme la solubilité dans les tampons. Le réseau de polyoxyde d'éthylène (POE) a été choisi car il remplissait l'ensemble de ces propriétés. En effet, le POE est connu comme étant peu toxique et sa neutralité limite ses interactions avec les protéines [160]. Ce réseau a été synthétisé à partir de poly(éthylène glycol) diméthacrylate (PEGDM). Sa photoréticulation est amorcée par de l'Irgacure 2959 (I2959) à une concentration de  $4,2 \times 10^{-2}$  % (w/v) (Figure 25). Ce photoamorceur a été choisi car il est reporté comme étant le photoamorceur le moins toxique pour les populations cellulaires. Il est, de plus, introduit à faible concentration [186].

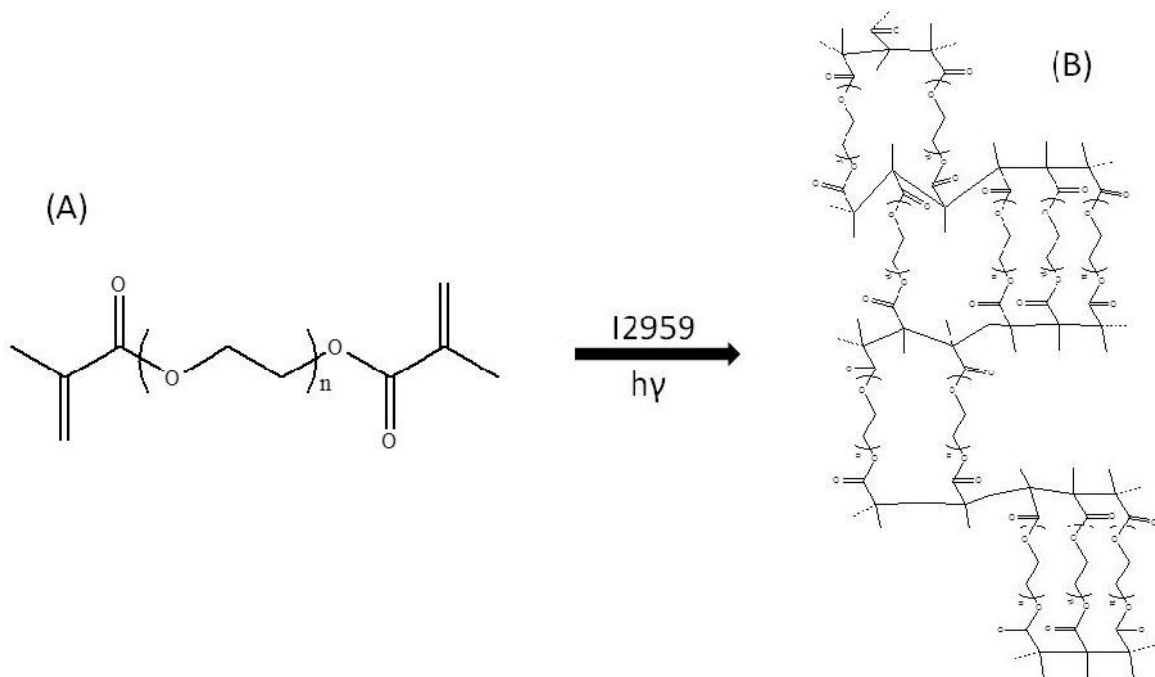


Figure 25 : schémas de photoréticulation du PEGDM (A) en un réseau POE (B)

Afin de faciliter la formation du matériau (Tableau 6), le RIP est synthétisé selon une synthèse « in situ ». Ainsi, l'ensemble des précurseurs sont introduits dans une même solution qui est ensuite placée dans un moule qui est exposé à un rayonnement U.V 365 nm pendant 1h (pour former le réseau POE) et à 37°C (formation du réseau de fibrine) (Figure 26).



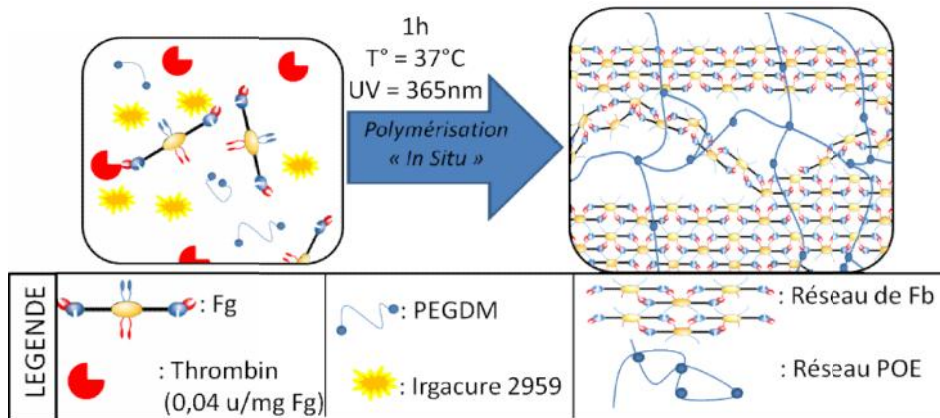


Figure 26 : schéma de synthèse des matériaux RIPs à base de PEGDM et de Fg

Deux précurseurs PEGDM550 et PEGDM750, respectivement, de masses molaires 550 et 750 g/mol ont été utilisés. Une concentration minimum de 10% (w/v) de PEGDM550 est nécessaire pour obtenir un réseau simple POE (RS POE550) très fragile. Par contre, le réseau simple synthétisé à partir de PEGDM750 est un hydrogel autosupporté manipulable (RS POE750).

Quatre matériaux RIPs ont été synthétisés à partir de ces deux précurseurs à la concentration de 10% (fixe dans toute l'étude) et de deux concentrations de Fg (0,5% (w/v) et 2,5% (w/v)). Ils sont nommés RIP POE550/Fb(0,5%) et RIP POE550/Fb(2,5%) pour le PEGDM550 et RIPs POE750/Fb(0,5%) et RIP POE750/Fb(2,5%) pour le PEGDM750.

La formation du réseau de Fb au sein du RIP a été démontrée par électrophorèse des surnageants issus de la dégradation chimique des réseaux de fibrine. En effet, la bande  $\gamma$ - $\gamma$  spécifique du réseau de Fb est bien détectée. De plus, la fraction soluble protéique est inférieure à 20% de la masse de protéine initialement introduite alors que le fibrinogène s'extrait complètement lorsque la thrombine n'est pas introduite. La formation du réseau POE a également été confirmée par mesure des taux d'extractibles. Bien qu'élevés (inférieurs ou égaux à 36%), il avait été possible de conclure que le réseau POE s'était formé.

Ainsi, à la fin de sa thèse, Edefia Akpalo avait pu prouver qu'il était possible de réaliser un RIP associant un réseau de Fb et un réseau de POE. Pour cela, elle avait identifié les précurseurs synthétiques à utiliser, leur mode de réticulation ainsi que les conditions de synthèse. Elle avait démontré, par un marquage au bleu de Coomassie et différentes extractions, que les réseaux de fibrine et de POE étaient co-continus sur l'ensemble du matériau (morphologie indispensable pour combiner au mieux les propriétés des partenaires). Ces RIPs étaient autosupportés et facilement manipulables à la fois à l'état humide et à l'état sec. Cependant leur synthèse devait être optimisée et leur caractérisation plus approfondie.

La première étape de ma thèse a consisté à optimiser la synthèse de ces matériaux afin de diminuer les taux d'extractibles du réseau POE et obtenir des matériaux de différentes surfaces et formes. Cette dernière propriété est importante si l'on souhaite adapter parfaitement le matériau aux formes irrégulières des sites lésés. Une fois la synthèse des matériaux optimisée, ces derniers ont été caractérisés afin de déterminer s'ils présentent l'ensemble des propriétés du pansement ou du substitut cutané idéal.

### III] Optimisation de la synthèse des RIPs POE/Fb

Les conditions de synthèse d'Edéfia Akpalo ont, dans l'ensemble, été conservées. Nous nous sommes toutefois attachés à compléter la gamme des matériaux synthétisés, tout en optimisant leur synthèse.

#### III]1) Mise en forme

Initialement, le moule dans lequel la solution de précurseurs est coulée avant l'exposition au UV à 37°C, était constitué de deux lames de microscopie séparées par un joint Téflon® de 1 mm d'épaisseur, le tout étant maintenu par des pinces. Ainsi, les matériaux formés étaient rectangulaires avec une surface d'environ 9 cm<sup>2</sup>. Or, un substitut cutané demande à disposer de grandes surfaces pour la couverture des zones lésées. A plus court terme, il était également important de réaliser des matériaux de la taille des puits pour les cultures cellulaires. Un nouveau moule a donc été développé en tenant compte de ces différentes contraintes. Des plaques de Téflon® de la forme et de la taille du matériau que l'on souhaite synthétisé, sont apposées au fond d'une boîte de Petri. La solution de précurseurs est déposée sur chacune de ces plaques. Le couvercle de la boîte est placé à 1mm de la plaque de Téflon®, à l'aide de petites calles rondes servant d'entretoises, et constitue la face supérieure du moule. Le système est alors fermé ce qui limite les échanges d'oxygène mais surtout l'assèchement au cours de la synthèse (Figure 27).

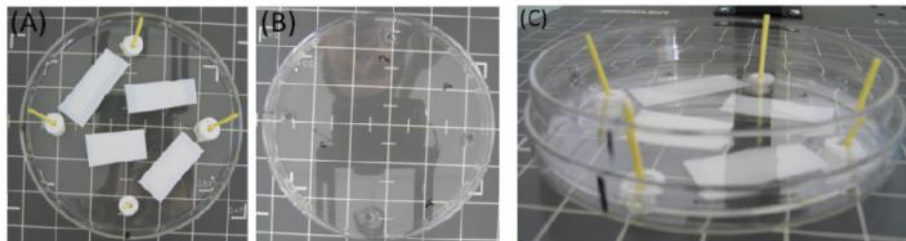


Figure 27 : Photographies des parties du moule (A) fond où sont collés les supports de Téflon® (B) couvercle (C) système complet fermé.

Ce nouveau moule a l'avantage d'être facilement stérilisable en autoclave. Les RIPs peuvent être synthétisés dans les conditions préalablement décrites, avec des dimensions et des formes ajustables selon celles de la plaque de Téflon®. Ainsi, leur surface peut être variée de 1,5 à 19 cm<sup>2</sup> avec différentes formes (Figure 28).

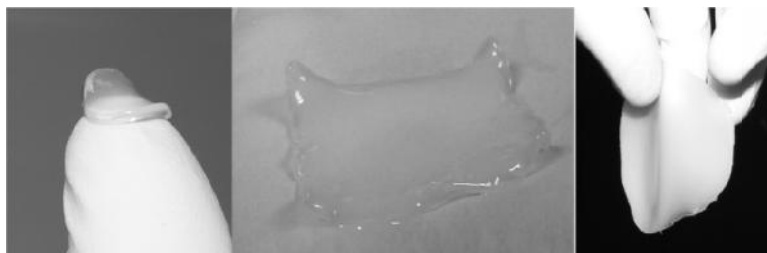


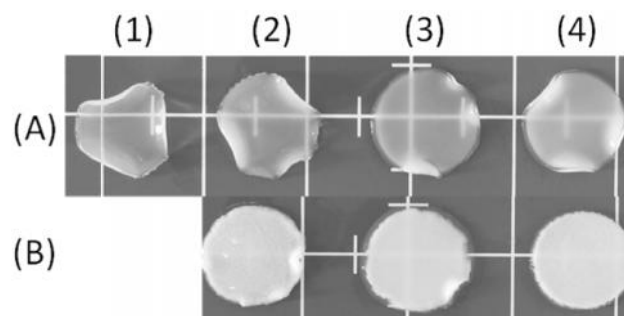
Figure 28 : Différentes formes et surfaces des RIPs synthétisés avec le nouveau moule. De gauche à droite : disque de 1,5cm<sup>2</sup>, rectangle d'environ 9cm<sup>2</sup> et disque de 19 cm<sup>2</sup>

Nous avons vérifié que ce nouveau moule permet de synthétiser des matériaux dont la surface et l'épaisseur sont reproductibles.

### III]2) Préparation de la solution de précurseurs

Dans un premier temps, afin d'obtenir une solution la plus homogène possible, la durée de dissolution du photoamorceur (I2959) a été augmentée à 24h au minimum. Dans un second temps, l'ordre d'introduction des différents réactifs dans la solution de précurseurs a été optimisé. Il s'est avéré, en effet, important de tout d'abord solubiliser le PEGDM dans le tampon de synthèse avant d'introduire le fibrinogène, puis en dernier lieu la thrombine.

Afin d'élargir le panel des RIPs à base de POE, une nouvelle concentration à 1,25% (w/v) de Fb a été testée. Cette concentration de Fb a permis d'obtenir des matériaux autosupportés et manipulables appelés RIP POE750/Fb(1,25%) et RIP POE550/Fb(1,25%) selon le précurseur PEGDM750 ou PEGDM 550 utilisé (Figure 29).



**Figure 29 : Photographies des différents matériaux (A1) RS POE750, (A2) RIPPOE750/Fb(0,5%), (A3) RIP POE750/Fb(1,25%), (A4) RIP POE750/Fb(2,5%), et (B2) RIP POE550/Fb(0,5%), (B3) RIP POE550/Fb(1,25%) et (B4) RIP POE550/Fb(2,5%).**

Quelle que soit la concentration en fibrine, les RIPs à base de POE750 ont un aspect gondolé qui est potentiellement gênant dans l'application visée. En effet, cela peut mener à un mauvais contact entre le matériau et la zone lésée. Par contre, les matériaux à base de POE550 sont parfaitement plans.

Les extractibles protéiques et synthétiques contenus dans les différents RIPs ont été mesurés. La fraction soluble de polymère synthétique est extraite au Soxhlet avec du dichlorométhane pendant 48h. La différence de masse engendrée par l'extraction permet de quantifier la fraction soluble du polymère (PEGDM n'ayant pas réagit). Le taux d'extractibles protéiques est évalué comme précédemment par un test Elisa. Les différentes fractions solubles, synthétique et protéique, sont reportées Tableau 31.

matériaux	Extractibles synthétiques (%)	Extractibles protéiques (%)
RS POE750	7,7 ± 2,0	/
RIP POE750/Fb(0,5%)	4,7 ± 0,5	0,27 ± 0,15
RIP POE750/Fb(1,25%)	5,5 ± 0,9	/
RIP POE750/Fb(2,5%)	2,9 ± 0,2	0,05 ± 0,03
RS POE550	6,3 ± 0,1	/
RIP POE550/Fb(0,5%)	6,5 ± 0,3	0,42 ± 0,22
RIP POE550/Fb(1,25%)	6,7 ± 0,1	/
RIP POE550/Fb(2,5%)	6,5 ± 1,1	0,08 ± 0,02

Tableau 31 : récapitulatif des extractibles synthétiques et protéiques des différents matériaux

Les taux d'extractibles protéiques sont compris entre 0,05 et 0,4%, quelle que soit la formulation. Le réseau de Fb est donc bien mieux formé que précédemment. Pour l'ensemble des matériaux, le taux d'extractible synthétique est maintenant inférieur à 8%, quelle que soit la formulation. L'augmentation de la concentration en fibrine ne modifie pas les taux d'extractibles des RIPs POE550/Fb. Par contre, elle provoque une diminution significative (division par deux) de la fraction soluble synthétique des RIPs POE750/Fb. Ainsi, les modifications qui ont été apportées aux conditions de synthèse ont permis de considérablement diminuer les taux d'extractible du polymère synthétique et donc d'obtenir un réseau de meilleure qualité.

### III]3) Variation des temps d'exposition aux rayonnements U.V

Un temps minimum d'exposition aux rayonnements U.V. pour la formation du réseau POE permettrait de limiter l'assèchement du matériau et d'envisager, par la suite, l'encapsulation de cellules, sensibles aux U.V., à l'intérieur de la matrice. Des RS POE750 ont donc été synthétisés avec différents temps d'exposition variant de 30 à 180 min. La fraction soluble de ces différents matériaux est ensuite déterminée par extraction au Soxhlet (Tableau 32).



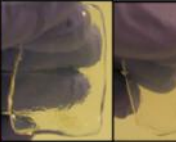
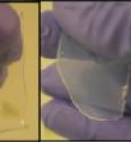

Temps d'exposition aux U.V. (min)	30	60	90	120	150	180
Extractible (%)	4,0 ± 0,4	7,2 ± 2,1	7,0 ± 2,0	7,4 ± 2,6	5,8 ± 1,8	6,2 ± 1,5

Tableau 32 : Fraction soluble extraite par soxhlet (48h au dichlorométhane) des RS POE750 en fonction du temps d'exposition aux U.V.

La fraction soluble dans les RS POE750 évolue peu entre 30 et 180 min d'exposition aux rayonnements U.V. Ce temps peut donc être réduit de 60 à 30 min, si nécessaire.

### III]4) Variation de la concentration en POE750 dans les RIPs

L'utilisation d'une faible proportion massique en polymère synthétique permettrait de faciliter son élimination par le corps humain. Afin de déterminer la proportion minimale conduisant à la formation d'un hydrogel autosupporté, des RS POE750 ont été synthétisés avec des concentrations en PEGDM750 variant de 1 à 10% (w/v). Ces matériaux sont photopolymérisés à 37°C pendant 1h. Les différents matériaux obtenus sont regroupés dans le Tableau 33.

Nom des matériaux	/	RS POE750(2,5%)	RS POE750 (5%)	RS POE750 (7,5%)	RS POE750 (10%)
Concentration PEGDM750 (w/v)	1%	2,5%	5%	7,5%	10%
Matériaux					
Matériaux autosupportés	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

**Tableau 33 : photos des différents RS POE750 en fonction de la concentration en PEGDM750. Leur caractère autosupporté (☑) ou non (☒) est évalué macroscopiquement.**

Après 1h d'exposition aux U.V, seuls les réseaux simples dont la concentration en polymère est supérieure ou égale à 5%(w/v), sont autosupportés. En dessous de cette limite, le matériau n'est pas manipulable. A 5%(w/v), le matériau est autosupporté, mais fragile. Les réseaux simples à 7,5 et 10%(w/v) ont à priori des propriétés mécaniques comparables sous forme hydratée. Il est donc possible, si besoin, d'abaisser la concentration en polymère synthétique à une proportion seuil de 5%(w/v) de POE.

### **III]5) Variation de la concentration en Fibrinogène**

Des RIP ont également été synthétisés avec des concentrations en Fg plus faibles, comprises entre 0,05 et 0,15% (w/v), c'est-à-dire jusqu'à 10 fois inférieure à la concentration physiologique, la concentration en PEGDM750 étant fixée à 10%. Les matériaux sont ensuite plongés dans du tampon Tris 50mM pH 7,4 avec 3% (w/v) de poudre de lait afin d'en extraire les protéines non fixées au réseau de Fb. Le réseau de Fb de ces matériaux est ensuite spécifiquement marqué par un anticorps anti fibrinogène/fibrine à 37°C pendant 24h. Après rinçage, les matériaux sont observés en microscopie à épifluorescence afin de visualiser si le réseau de fibrine reste homogène sur l'ensemble du matériau ou non. L'absence de fluorescence sur le RS POE750 démontre la spécificité du marquage. Un signal fluorescent homogène est observé pour l'ensemble des concentrations en fibrinogène testées. Ainsi, le réseau de fibrine est présent, au moins en surface des matériaux, quelle que soit la concentration en fibrinogène introduite, même 10 fois inférieure à la concentration physiologique.

En conclusion, la mise au point d'un nouveau moule a permis de moduler les formes et les surfaces des matériaux synthétisés. De plus, une optimisation de la préparation de la solution de précurseurs a permis de diminuer de manière significative la fraction soluble de polymère synthétique. Le temps de polymérisation du réseau synthétique peut être réduit à 30 min d'exposition aux U.V (extractible <8%). Un hydrogel autosupporté et manipulable de POE750 a pu être obtenu dès une concentration de 5% (w/v). Pour finir, il est possible de synthétiser des RIPs avec une concentration de fibrine variant de 0,1 à 5 fois la concentration plasmatique. La formulation de ce type de matériau peut donc être facilement adapter pour obtenir une réaction optimale avec la zone lésée. La synthèse des RIPs ayant été modifiée, il était nécessaire de les caractériser à nouveau tout en complétant ces caractérisations.

## **IV] Caractérisation des RIPs POE/Fb optimisés**

Tout d'abord, les matériaux sont caractérisés à l'état hydraté, c'est-à-dire sous forme d'hydrogel, afin de déterminer si leurs propriétés mécaniques sont conformes aux utilisations attendues en tant que pansement ou support de culture cellulaire pour la reconstruction cutanée. Ensuite, les matériaux seront caractérisés à l'état sec afin de connaître leur potentiel de stockage sous forme déshydratée.

### **IV]1) Propriétés des matériaux à l'état hydraté**

Préalablement à leur caractérisation, les matériaux sont incubés dans le tampon de synthèse pendant au moins 24h. En cas de stockage plus long, 0,02% (w/v) de  $\text{NaN}_3$  sont ajoutés à la solution pour éviter toute prolifération de microorganisme. Les matériaux sont sortis du tampon juste avant mesure.

#### ***IV]1)1. Rhéologie***

Les mesures de rhéologie en mode oscillatoire sont réalisées à 37°C avec un dispositif anti-évaporation. Aucune force normale n'est appliquée au cours des mesures pour prévenir de toute expulsion de la phase sol des hydrogels. La sollicitation a été fixée à 1% de déformation (dans le domaine de linéarité) à une fréquence de 1 Hz pendant 10 min. Les moyennes des modules de stockage  $G'$  et de perte  $G''$  mesurés sur trois échantillons ont été rassemblées sur la Figure 30.

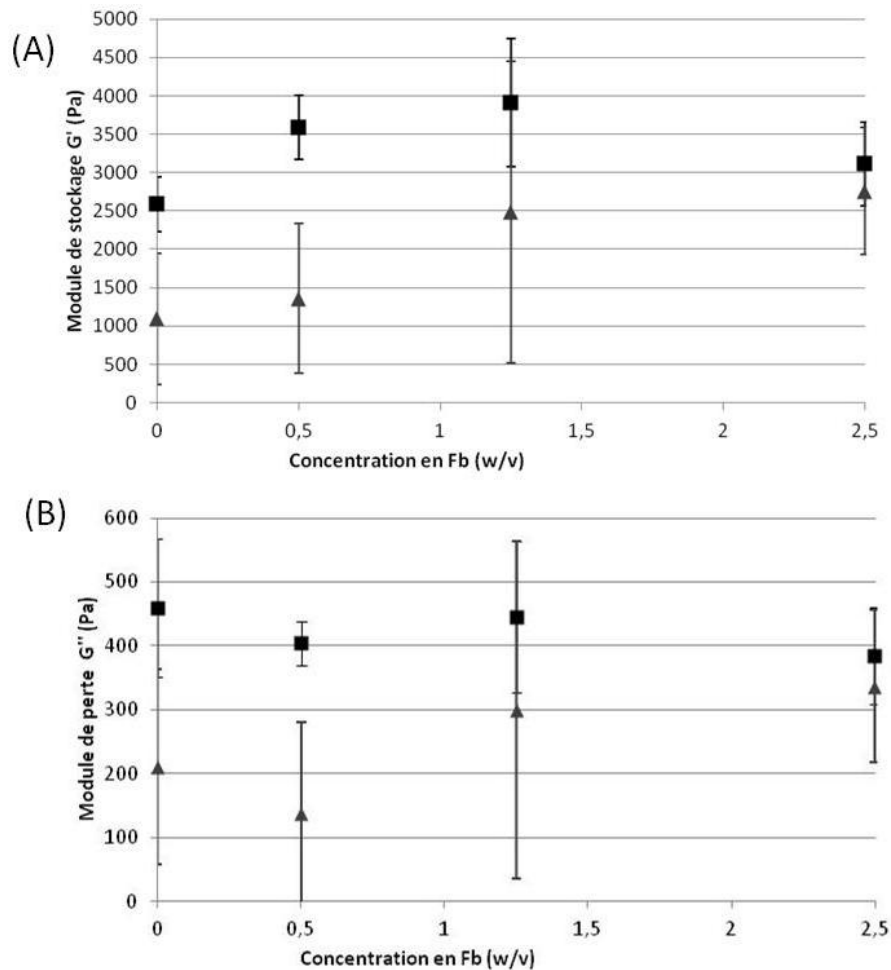


Figure 30 : Valeurs de module de stockage (A) et de perte (B), des RIPs POE750/Fb ( ■ ) et POE550/Fb ( ▲ ) en fonction de la concentration en Fb.

Quel que soit le matériau, le module  $G'$  est supérieur au module  $G''$ , confirmant pour chacun un comportement de solide viscoélastique. Le module  $G'$  du gel de fibrine à 0.5% est, d'après la littérature de 30 Pa [185]. Les mesures de  $G'$  et  $G''$  n'ont pas pu être réalisées sur le RS Fb(1,25%) car, bien que plus résistant que le réseau physiologique, le caractère collant du matériau limite son transfert dans le rhéomètre sans détérioration. Par contre, le module  $G'$  du RS Fb(2,5%) est très élevé (2400 Pa) comme le suggérait son apparence.

Tous les RIPs ont des modules  $G'$  supérieurs à ceux des réseaux simples POE correspondants. L'introduction de 2,5% (w/v) de fibrine dans le réseau POE750 fait augmenter le module de 2600 Pa à 3116 Pa (RIP POE750/Fb(1,25%)). Le module du réseau simple étant déjà élevé, la présence de réseau protéique renforce le matériau mais n'en fait pas augmenter le module  $G'$  de manière significative. Par contre, l'ajout de cette même concentration de Fb permet de doubler (2800 Pa) le module  $G'$  par rapport à celui d'un réseau POE550 (1100Pa).

La formation de RIP permet donc d'obtenir des matériaux, contenant un réseau de Fb en concentration physiologique, avec des modules bien supérieurs à celui du réseau de fibrine seul (30 Pa). Les modules sont multipliés par 40 avec le réseau POE550 et par 100 avec le réseau POE750. L'architecture en RIP permet donc d'atteindre avec ces concentrations faibles en fibrine des modules de stockage comparables à ceux mesurés sur des gels de fibrine à une concentration 5 fois

supérieure. Les caractéristiques rhéologiques mesurées traduisent les propriétés mécaniques des matériaux RIP et montrent qu'ils sont aisément manipulables à l'état hydraté.

#### ***IV]1)2. Mesure d'élongation à la rupture***

La mesure d'élongation permet de déterminer quelle déformation peut supporter un matériau avant sa rupture. Ces mesures ont été réalisées sur des échantillons rectangulaires avec un analyseur thermomécanique dynamique (DMA Q800). Le matériau est soumis à une déformation linéaire croissante (1000  $\mu\text{m}/\text{min}$ ) en mode tension jusqu'à sa rupture. Les déformations à la rupture des différents matériaux sont rassemblées dans le Tableau 34.

<b>Dénomination</b>	<b>Concentration en Fb (w/v)</b>	<b>déformation à la rupture (%)</b>
<b>RS Fb(2,5%)</b>	2,5	130 $\pm$ 31
<b>RS POE750</b>	0	14 $\pm$ 0
<b>RIPs POE750/Fb(0,5%)</b>	0,5	38 $\pm$ 11
<b>RIPs POE750/Fb(2,5%)</b>	2,5	127 $\pm$ 17
<b>RIPs POE550/Fb(0,5%)</b>	0,5	65 $\pm$ 19
<b>RIPs POE550/Fb(2,5%)</b>	2,5	164 $\pm$ 13

**Tableau 34 : Déformation à la rupture du réseau simple POE750 et des différents RIPs à différentes concentrations en Fb. Mesures réalisées en DMA à température ambiante.**

Le gel de fibrine à 0,5% et le RS POE550 n'ont pas pu être testés en raison de leur faible tenue mécanique. Par contre, le réseau de Fb concentré (RS Fb(2,5%)) montre une déformation à la rupture de 130% bien plus élevée que celle du RS POE750 (14%). Lorsque la fibrine et le POE sont combinés au sein d'un RIP, l'ajout d'une faible quantité de Fb permet de multiplier par 3 la déformation à la rupture (38%) pour le RIP POE750/Fb(0,5%) par rapport à celle du RS POE750. A concentration plus élevée, la fibrine permet d'atteindre environ 130% de déformation dans le RIP POE750/Fb(2,5%), déformation comparable à celle du réseau de Fb seul. Pour les RIP à base de réseau POE550, l'ajout de 0,5% fibrine permet d'avoir une tenue suffisante pour réaliser la mesure. Les valeurs de déformation à la rupture sont supérieures à celles mesurées sur les RIPs à base de POE750 à concentration équivalente en Fb (respectivement 65% contre 38%). Cependant, il est important de noter que la contrainte à la rupture est 2 fois plus élevée pour les RIPs POE750/Fb(0,5%) que pour les RIPs POE550/Fb(0,5%).

En conclusion, les RIPs associant un réseau POE et un réseau physiologique de Fb sont des matériaux au module de stockage équivalent à celui du réseau POE (autosupporté et manipulable) et ayant une déformation à la rupture supérieure à celle des deux réseaux simples associés. Les propriétés mécaniques de ces matériaux à l'état hydraté étant conformes à celles souhaitées, celles à l'état sec sont ensuite mesurées.



## IV]2) Propriétés des RIPs à l'état sec

### IV]2)1. DMA

L'analyseur mécanique dynamique (DMA) permet de mesurer le module de stockage ( $E'$ ) (propriété élastique) et la  $\tan\delta$  (caractéristique de l'amortissement) en mode tension. Au préalable, les matériaux sont séchés. Au cours de la mesure, ils sont soumis à une déformation de 0,05% à une fréquence de 1Hz. Le comportement des matériaux est étudié entre  $-70^\circ\text{C}$  et  $200^\circ\text{C}$  avec une rampe de température de  $3^\circ\text{C}/\text{min}$  (Figure 31).

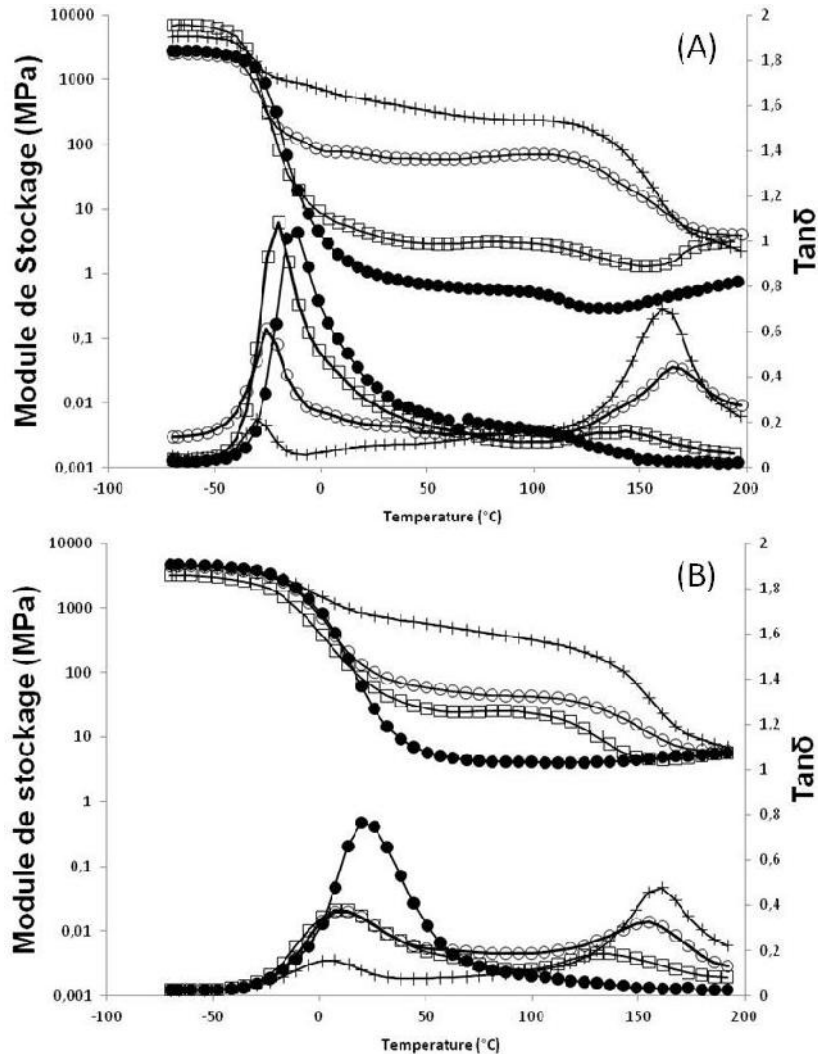


Figure 31 : Module de stockage  $E'$  (courbes supérieures) and  $\tan\delta$  (courbes inférieures) de RIP secs : (A) RIP POE750/Fb et (B) RIP POE550/Fb avec différentes concentrations massiques en Fb: (□) 0,5 (○) 1,25, et (+) 2,5%. Les réseaux simples (●)PEO750 et RS PEO550 sont reportés pour comparaison.

Le module de stockage  $E'$  des RS POE750 est élevé (2800MPa) à  $-40^\circ\text{C}$  du fait de son état vitreux à cette température (Figure 31A). De  $-40$  à  $20^\circ\text{C}$ , le module décroît jusqu'à une valeur de 0,6MPa. La relaxation mécanique observée sur cette gamme de température correspond à l'apparition de mouvements coopératifs des chaînes de POE. Le pic de  $\tan\delta$  associé est détecté à  $T_\alpha = -13^\circ\text{C}$ . Cette relaxation mécanique coïncide avec la transition vitreuse de ce polymère. Au-dessus de cette température, le RS POE750 est dans un état caoutchoutique. Les RIPs POE750/Fb ont un

comportement thermique similaire. En effet, ils présentent un module élevé aux températures inférieures à  $-40^{\circ}\text{C}$ . Entre  $-40$  et  $20^{\circ}\text{C}$ , le module  $E'$  décroît jusqu'à atteindre un plateau. Cette décroissance de module est associée à un pic de  $\tan\delta$  caractéristique de la relaxation mécanique des zones riches en POE. Le plateau observé à partir de  $20^{\circ}\text{C}$  se maintient jusqu'au moins  $130^{\circ}\text{C}$  selon la concentration en Fb. Aux températures supérieures, une seconde relaxation mécanique est observée avec une décroissance des modules  $E'$  et un second pic de  $\tan\delta$ . Les modules de stockage à température ambiante ( $20^{\circ}\text{C}$ ) augmentent avec la proportion de Fb. En effet, même à faible concentration ( $0,5\%$  (w/v)), le module de stockage est multiplié par 4 entre le réseau simple RS PEO750( $10\%$ ) et le RIP PEO750( $10\%$ )/Fb( $0,5\%$ ). Les modules  $E'$  à  $25^{\circ}\text{C}$  sont de 67 et 470 MPa, respectivement, pour les RIP PEO750/Fb( $1,25\%$ ) et RIP PEO750/Fb( $2,5\%$ ). Cet impact de la Fb peut s'expliquer par le caractère très rigide et cassant de ce réseau lorsqu'il est dans un état sec. De plus, cet effet, à de si faibles concentrations, suggère une continuité de réseau dans le RIP. Les matériaux à base de réseau POE550 présentent un comportement thermomécanique identique avec deux relaxations mécaniques.

Pour ces deux séries de RIPs (PEO750/Fb et POE550/Fb), il est à noter que le pic de  $\tan\delta$  caractéristique des zones riches en POE est décalé de 5 à  $10^{\circ}\text{C}$  vers les basses températures par rapport à celui des réseaux simples de POE. Ces résultats peuvent sembler contradictoires. En effet, la diminution de  $T_{\alpha}$  suggère que la Fb pourrait plastifier les chaînes de POE. Mais si cela était le cas, les modules de stockage à température ambiante ( $25^{\circ}\text{C}$ ) devraient simultanément décroître. Une autre explication peut être trouvée au regard des conditions de synthèse de ces matériaux. En effet, les réseaux simples et les RIPs sont synthétisés en solution tampon avec une concentration égale en sels ( $150\text{mM NaCl}$  et  $20\text{mM CaCl}_2$ ). Or il a été reporté que le POE forme des complexes avec les ions calcium [<sup>187</sup>] générant ici des points de réticulation physique supplémentaires qui provoquent un déplacement de la  $\tan\delta$  à des températures plus élevées ( $-13^{\circ}\text{C}$  au lieu de  $-17^{\circ}\text{C}$  lorsque le réseau POE est préparé en absence de  $\text{CaCl}_2$ ). D'autre part, le réseau de Fb est reporté comme liant le calcium lors de sa formation. Ainsi la formation du réseau de Fb au sein d'un RIP entraîne une diminution locale de la concentration en ion  $\text{Ca}^{2+}$ . Les zones riches en POE dans un RIP présentent moins de points de réticulation physique et sa  $T_{\alpha}$  apparaît à plus basse température.

Les propriétés thermomécaniques des RIPs montrent que les réseaux POE et fibrine sont continus et présentent de fortes interactions entre eux. Ces matériaux à l'état sec ont des modules de stockage élevés tout en étant peu cassant. Ils sont facilement stockables sous cette forme à température ambiante. Cependant il reste à déterminer si ces matériaux, une fois séchés, se réhydratent correctement.

#### ***IV]2)2. Réhydratation***

La capacité de réhydratation des différents matériaux a été étudiée afin d'évaluer leur aptitude à être stockés à sec avant d'être réhydratés pour utilisation (chapitre matériel et méthodes, IV]1)9). Les taux de gonflement des matériaux après les 2 cycles sont reportés ainsi que la réversibilité à cette deshydratation dans le Tableau 35.

Matériaux	Sri	Sr1	réversibilité (%)
RS POE750	9	6	71 ± 2
RIP POE750/Fb(0,5%)	9	6	71 ± 2
RIP POE750/Fb(1,25%)	8	6	71 ± 2
RIP POE750/Fb(2,5%)	8	5	69 ± 2
RS POE550	9	3	31 ± 2
RIP POE550/Fb(0,5%)	8	3	39 ± 2
RIP POE550/Fb(1,25%)	8	3	39 ± 2
RIP POE550/Fb(2,5%)	8	3	42 ± 2
RS Fb(0,5%)	25	6	22 ± 2

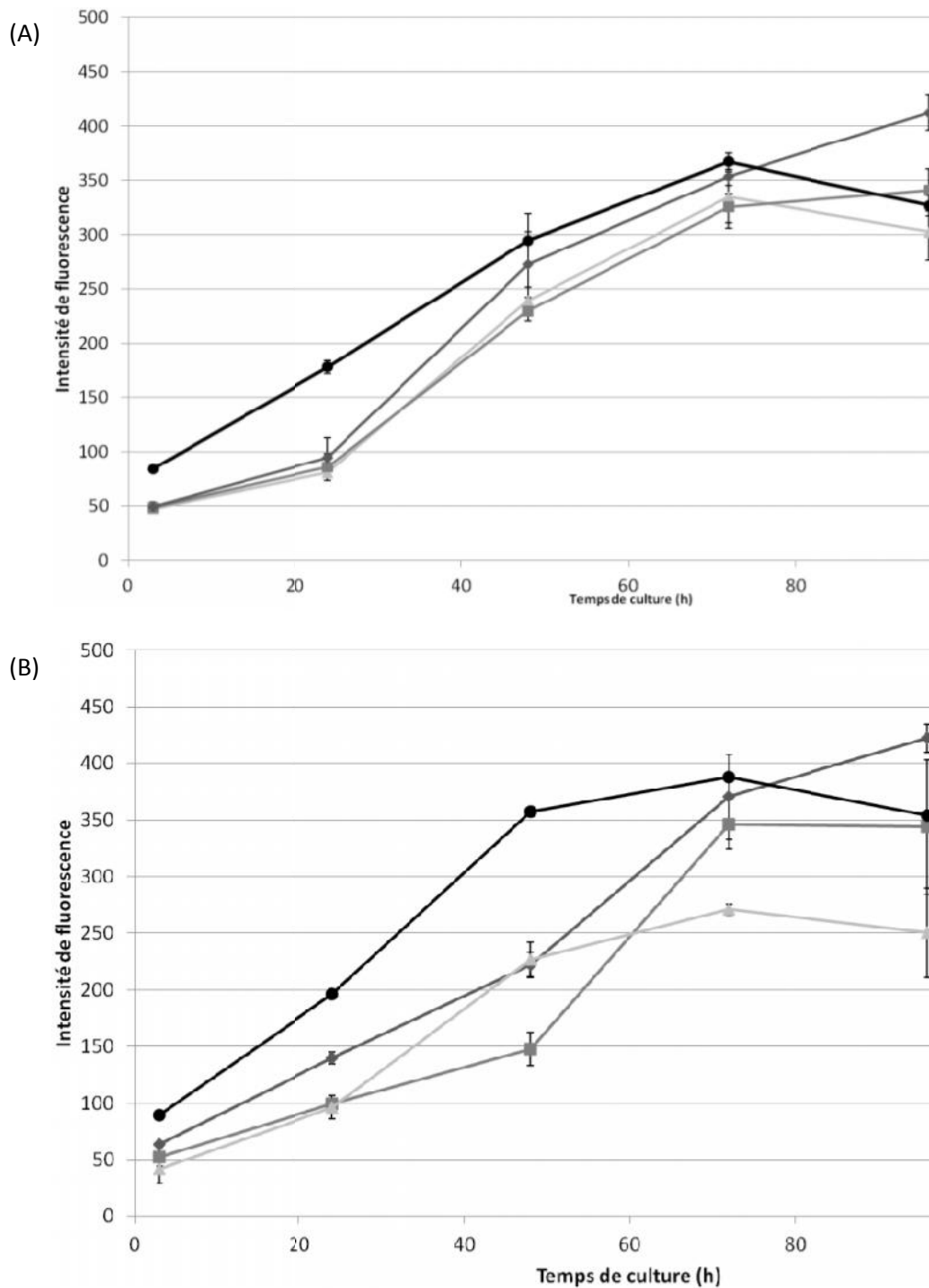
**Tableau 35 : Taux de gonflement après synthèse et après un cycle de séchage/réhydratation pour des réseaux simples POE et les RIPs POE750/Fb et POE550/Fb à différentes concentrations en Fb.**

Le taux de gonflement initial du réseau de Fb est très important (Sri = 25), mais au second cycle il diminue très fortement (Sr1 = 6). Ainsi sa trop faible réversibilité à l'hydratation (22%) empêche le stockage de ce gel à l'état sec. Le taux de gonflement de tous les RS POE et les RIPs est proche de 8 à 9. Indépendamment du réseau POE (de sa densité de réticulation notamment) et de la concentration en fibrine dans les RIP, il est trois fois plus faible que celui du gel de Fb seul. Les réseaux POE limitent donc le taux de gonflement du gel de Fb(0,5%). Une différence majeure apparaît sur la réversibilité à l'hydratation en fonction du réseau POE utilisé. En effet, après un cycle de séchage/réhydratation, la réversibilité est d'environ 38% pour les RIPs contenant un réseau de POE550 et de 71% pour ceux contenant un réseau POE750.

Au-delà de ce second cycle (résultats non présentés), tous les taux de gonflements restent stables avec des taux de réversibilité par rapport au 1<sup>er</sup> cycle aux alentours de 95%. Ces résultats montrent qu'en utilisant un réseau POE750, il est possible d'augmenter très fortement la capacité de réhydratation d'un matériau comportant un réseau de Fb. Les RIPs POE750/Fb sont donc particulièrement intéressants dans le cadre du développement de substitut cutané car ils permettent de stocker à sec un gel de Fb en concentration physiologique ou concentré avant de le réhydrater pour utilisation.

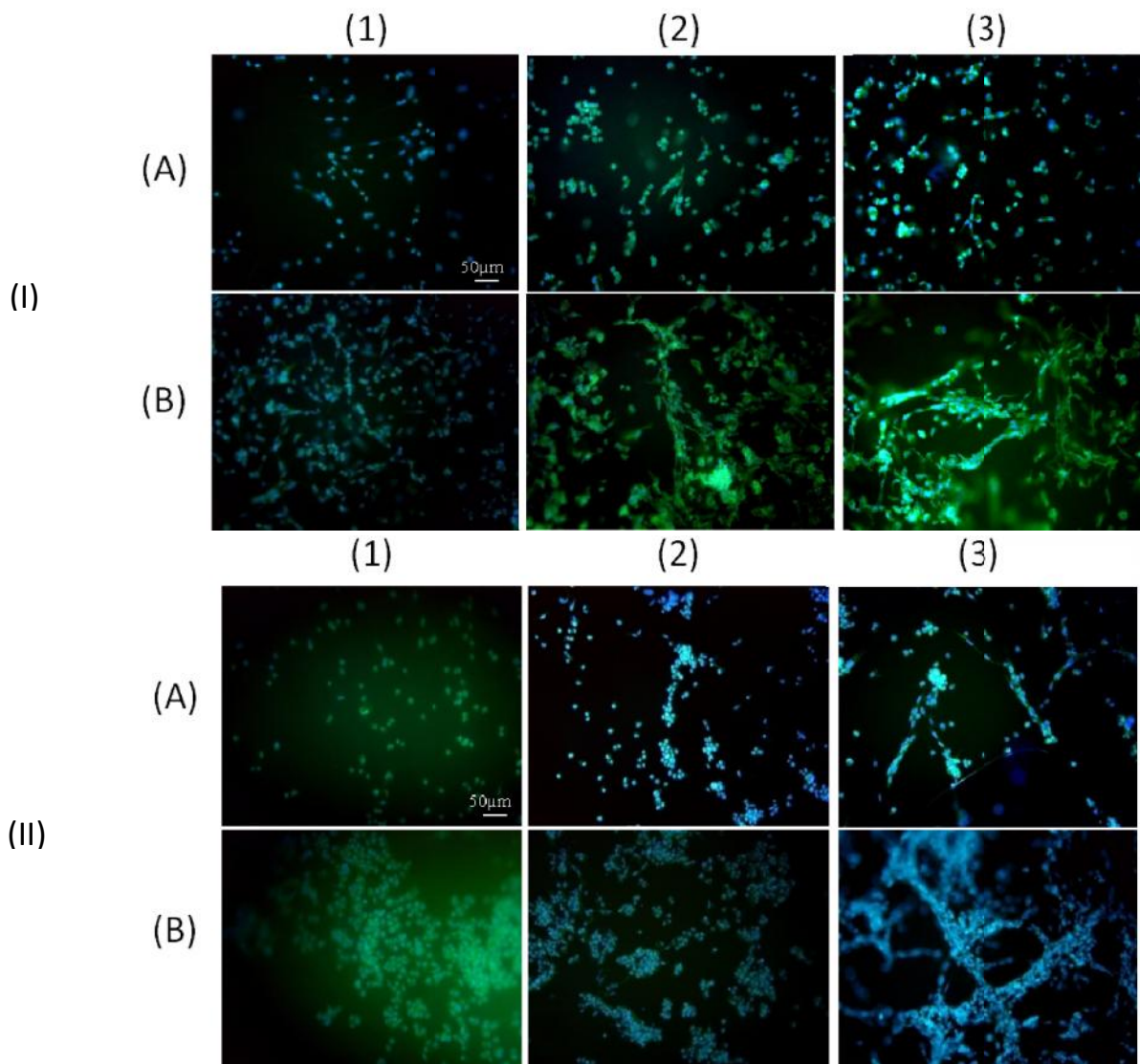
## **VJ Biocompatibilité des RIPs POE/Fb**

La toxicité des RIPs à base de POE550 ou POE750 est évaluée afin de savoir s'ils répondraient au cahier des charges d'un bon substitut cutané (Tableau 6). Pour cela, une étude de prolifération cellulaire à la surface des matériaux est réalisée. Cette démarche est la même que celle précédemment appliquée sur le gel de Fb ([1]2)2). Après synthèse, les matériaux sont immergés immédiatement dans un milieu de culture complet avant d'être incubés avec une suspension cellulaire pendant 96h. Des tests d'activité mitochondriale (Alamar Blue®) sont réalisés à différent temps (Figure 32), puis les cellules présentes en surface des échantillons sont fixées et immunomarquées pour être observées en microscopie de fluorescence (Figure 33).



**Figure 32 : Intensité de fluorescence du test Alamar Blue après 3h d'incubation à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> en atmosphère humide des RIPs POE550/Fb (A) et RIPs POE750/Fb (B) à des concentrations en Fb de 0.5 (▲), 1.25 (■), et 2.5 (w/v) (◆). L'activité mitochondriale des cellules présentes à la surface des matériaux est comparée à celle à la surface du contrôle (lamelle de verre) (●).**

A l'exception des cellules cultivées sur les RS POE750 et RS POE550 (données non montrées), une augmentation significative de l'activité mitochondriale est observée. Cette augmentation est indépendante de la concentration de Fb dans les RIPs POE750/Fb. Par contre, sur les RIPs POE750/Fb, l'activité augmente des 250 à 420 lorsque la concentration en Fb augmente de 0,5 à 2,5%. Ces matériaux ne présentent donc pas de forte toxicité puisqu'une prolifération cellulaire est possible à leur surface. Cette dernière hypothèse a été vérifiée par observation microscopique.



**Figure 33 : Observation en microscopie à épifluorescence des RIPs POE550 [I] et POE750 [II] après 24h (A) et 96h (B) d'incubation avec une suspension cellulaire de 50000 cellules/cm<sup>2</sup>. Les RIPs sont préparés avec des concentrations en Fb de 0,5% (1), 1,25% (2) et 2,5% (3).**

Les observations en microscopie confirment l'absence de croissance et d'étalement cellulaires sur les RS POE750 et RS POE550 (non montrées). A l'inverse, les cellules s'étalent et se multiplient sur tous les RIPs et ce, d'autant plus que la concentration en Fb est élevée. Toutefois, la répartition cellulaire semble aléatoire sur les RIPs POE550/Fb. Par contre, sur les RIPs POE750/Fb, la population cellulaire est dispersée lorsque la concentration en Fb est faible. Lorsque cette dernière augmente, la population cellulaire s'organise sous forme de fibres. Ce comportement est complètement différent de celui observé sur les RS Fb(2,5%) sur lesquels les cellules restaient anormalement rondes (Figure 33). On voit là un nouvel intérêt d'introduire les gels de fibrine dans une architecture de RIP. La différence de comportement entre les RIPs POE550/Fb et POE750/Fb peut être due à une répartition différente du réseau de fibrine. Une deuxième possibilité pourrait être que les différences de rigidité entre les deux types de matériaux influencent le développement des populations cellulaires, comme cela a pu déjà être reporté pour des cellules souches [188].

## **VI] Conclusion**

Durant la première partie de ces travaux, nous avons confirmé qu'il était possible d'associer un réseau physiologique ou concentré de Fb, avec un réseau de polymère POE. Cette association a permis de synthétiser un matériau ayant, à la fois, les propriétés du polymère synthétique (hydrogel autosupporté, stockage à sec possible) et celles du réseau de fibrine (prolifération cellulaire à la surface des matériaux). De plus, ces matériaux ne sont pas toxiques. Le concept de renfort des propriétés d'un réseau physiologique de fibrine par un réseau de polymère est donc prouvé et a montré son efficacité. Cependant, bien que déjà très intéressantes, ces propriétés doivent être améliorées en vue d'utiliser ces matériaux en tant que support pour la régénération tissulaire. Tout d'abord, la réversibilité à la déshydratation doit être améliorée en modifiant la nature du réseau synthétique des RPs afin de permettre le séchage puis le stockage du matériau sur le long terme. Ces travaux font l'objet du chapitre suivant.

# **Chapitre II: Matériaux réhydratables**

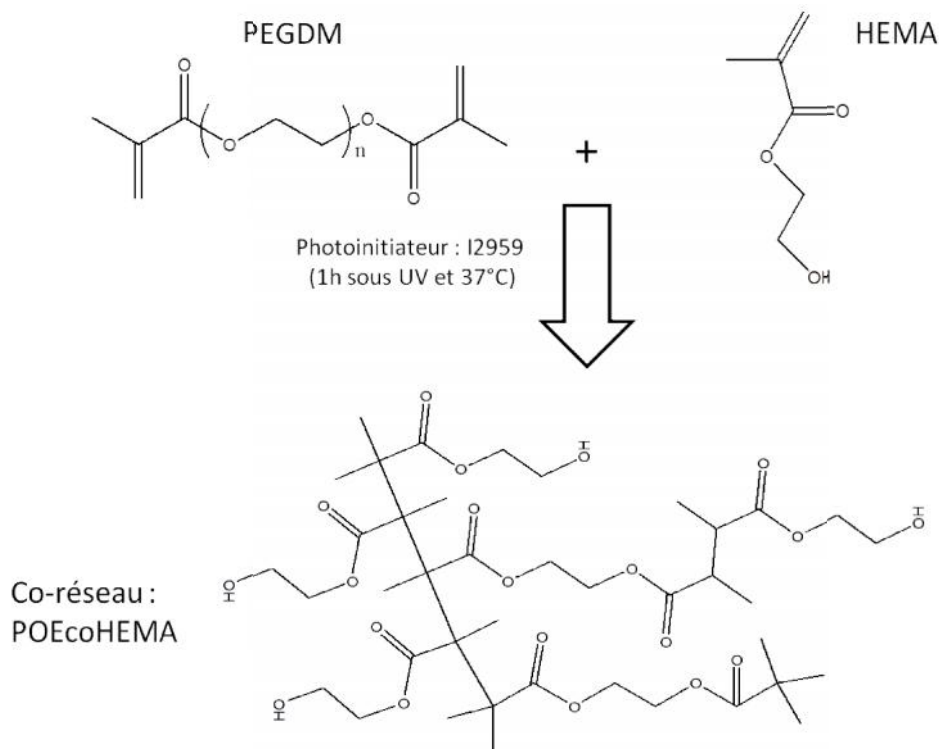
La synthèse des RIPs POE/ Fibrine a permis de démontrer qu'il est possible d'obtenir des biomatériaux combinant une protéine d'origine biologique et un polymère synthétique. Leur caractérisation a permis de mettre en avant leurs points forts et leurs points faibles au regard de l'application visée. Ainsi, même si les matériaux à base de POE présentent une réversibilité à la réhydratation de 70% après un premier séchage, donc bien meilleur que celui du gel de fibrine (6%), cette dernière reste insuffisante pour une application clinique. En effet, un taux de gonflement trop faible lors de la réhydratation limite la diffusion du milieu nutritif et peut conduire à des retards de croissance cellulaire voire à des morts cellulaires par hypoxie.

Pour augmenter la réversibilité à la déshydratation des RIPs à base de fibrine, plusieurs stratégies sont possibles. La plus simple consisterait à introduire des molécules hygroscopiques telles que de l'acide hyaluronique [<sup>189</sup>], dans la phase sol du matériau. Cependant, dans ce cas, il y a un risque de désorption de ces composés hygroscopiques au cours de l'utilisation. La seconde solution consisterait à associer au gel de protéine un autre réseau, le plus hydrophile possible, afin de permettre une réhydratation optimale. Cette stratégie a déjà été mise en œuvre en introduisant essentiellement des réseaux de polysaccharides à base d'acide hyaluronique [<sup>190</sup>] ou de chitosan [<sup>191</sup>]. Cependant, des séparations de phases macroscopiques entre les protéines et les polysaccharides sont souvent observées et le gain en termes de propriétés mécaniques n'est pas toujours très important. L'association de réseaux de polymères synthétiques au gel de protéine a donc été conservée, le réseau de polymère devant être le plus hydrophile possible pour une meilleure réhydratation du matériau.

## **I] Réseau de poly(oxyde d'éthylène- co -méthacrylate de 2-hydroxyéthyle)**

Dans un premier temps, le réseau de polymère synthétique a été modifié en copolymérisant le diméthacrylate de polyéthylène glycol (PEGDM) de masse molaire  $750 \text{ g.mol}^{-1}$  avec du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA) (Figure 34). Cela permet de diminuer la densité de réticulation ce qui favorise le gonflement, en introduisant le PHEMA qui est très hydrophile ( $\delta_{\text{PHEMA}} = 26.93 \text{ MPa}^{0.5}$  [<sup>192</sup>]). Pour les RIPs, la concentration en fibrine est fixée à 2,5% (w/v). Les coréseaux sont notés RS POEcoPHEMA et les RIPs correspondants RIP POEcoPHEMA/Fb.





**Figure 34 : Schéma de la copolymérisation entre le PEGDM et HEMA**

Les co-réseaux POE-co-PHEMA sont synthétisés dans les mêmes conditions que celles des réseaux simples POE, mais une fraction massique du PEGDM (75, 50 ou 25 wt%) a été remplacée par du HEMA. Brièvement, la photopolymérisation radicalaire est réalisée dans le tampon de synthèse contenant 10% (m/v) de monomères. Elle est amorcée par 4,2.10<sup>-1</sup>% (m/m) d'Irgacure I2959 sous U.V (365nm) pendant 60 min. Les RIP POEcoPHEMA/Fb sont synthétisés dans les mêmes conditions que les co-réseaux mais le milieu réactionnel contient en plus 2,5% (w/v) de fibrine. Toutes les solutions initiales sont transparentes, par contre, tous les matériaux obtenus en sortie de synthèse sont opaques (Figure 35).

**Réseau simple POEcoPHEMA :**



**Réseau « RIP » POEcoPHEMA /Fb :**



**Figure 35 : Photographies des différents co-réseaux et RIPs à base POEcoPHEMA**

Cette opacité peut être un désavantage pour une utilisation du matériau en tant que pansement. En effet la transparence est un atout car elle permet de vérifier l'état d'une plaie sans retirer le matériau.

Afin d'estimer rapidement l'intérêt ou non de l'introduction de PHEMA dans les matériaux, le taux de gonflement et la réversibilité d'hydratation des RIPs POEcoPHEMA/Fb ont été étudiés sur un cycle (Figure 36) et comparés à ceux des RIP POE/Fb présentés au chapitre précédent.

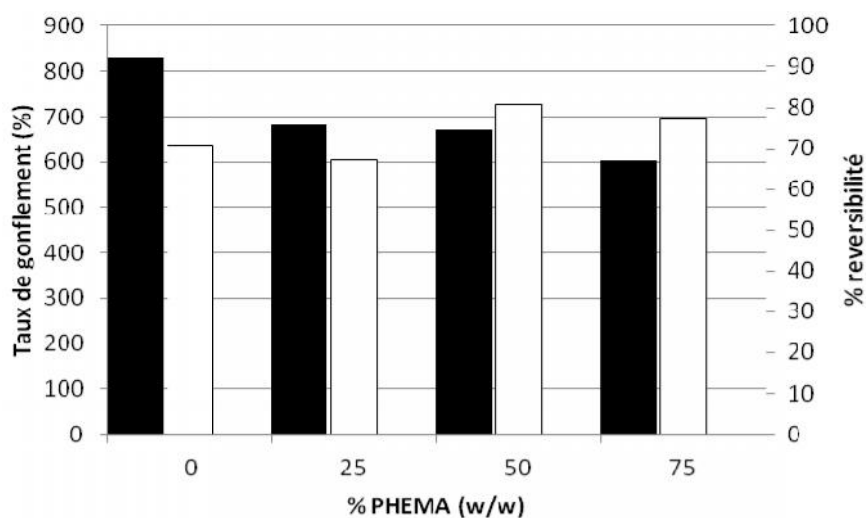


Figure 36 : Taux de gonflement (■) et réversibilité (□) mesurés sur des RIPs POEcoPHEMA/Fb en fonction de la proportion de PHEMA dans le co-réseau

Contrairement à ce qui était attendu, l'introduction de PHEMA dans les RIPs POEcoPHEMA/Fb diminue le taux de gonflement dans le tampon Tris (environ 650%) par rapport à celui du RIP POE/Fb(2,5%) (830%) à concentration égale de fibrine. De plus, l'incorporation de PHEMA dans le réseau de POE n'améliore pas significativement la réversibilité d'hydratation du matériau après un cycle de séchage et de réhydratation. En effet, ce taux est de 77% pour le RIP POEcoPHEMA/Fb avec la plus forte proportion en PHEMA contre 70% pour les RIP POE/Fb(2,5%).

L'introduction de PHEMA dans le réseau POE ne s'est donc pas révélée être une stratégie intéressante. De manière surprenante, la diminution de la densité de réticulation du réseau de POE par l'introduction du PHEMA n'a pas conduit à des taux de gonflement plus importants des RIPs contenant 2,5% (w/v) de fibrine. Devant ces résultats, l'utilisation de PHEMA a été abandonnée et d'autres polymères hygroscopiques ont été envisagés. Ainsi, les études suivantes ont été menées afin de remplacer le POE par l'alcool polyvinylique (PVA) dans les architectures RIP.

## II] L'alcool polyvinylique

Les propriétés de l'alcool polyvinylique (PVA) (chapitre bibliographique, II]4)5) l'ont amené à être largement introduit dans des biomatériaux visant à mimer des cartilages [193] ou des cornées [194]. Il est également utilisé sous forme de cryoéponge [195] ou d'hydrogel [196]. Il est décrit comme étant défavorable à l'absorption protéique [197] et s'avère non-toxique pour les cultures cellulaires [194, 195]. Pour des masses molaires inférieures à 37 000 g/mol, le PVA peut être éliminé par l'organisme sans dommage apparent [198].

Le monomère alcool vinylique n'existe pas, l'alcool polyvinylique est donc obtenu par l'hydrolyse du poly(acétate de vinyle). Ainsi, le PVA est défini par sa masse molaire mais aussi par son pourcentage d'hydrolyse qui correspond au nombre de fonction acétate hydrolysées en fonction alcool. Pour les biomatériaux, le pourcentage d'hydrolyse le plus élevé est préféré car il existe des suspicions de toxicité des fonctions acétate [198].

Le PVA est hygroscopique ( $\delta=22,8 \text{ MPa}^{0,5}$  [199] à  $26 \text{ MPa}^{0,5}$  [200] selon son taux d'hydrolyse) ce qui lui confère des taux de gonflement importants dans les milieux aqueux. Par ailleurs, étant semi-cristallin, il présente des propriétés mécaniques intéressantes du fait de la présence de zones cristallines qui agissent comme des nœuds de réticulation physique, renforçant le matériau, au même titre que des nœuds de réticulation chimique. Peppas et al. ont largement étudié la formation de ces zones cristallines qui se font selon une conformation transplanare, à partir de solutions concentrées de PVA [201,202,203,204]. Elles sont favorisées par des cycles de variation thermique répétés de 4 à 48 h. Ainsi, des hydrogels avec une cristallinité de 60% peuvent être obtenus. Les masses entre zones cristallines, les propriétés de diffusion, de gonflement, les propriétés mécaniques ou la libération de principe actif sont affectées par ce taux de cristallinité.

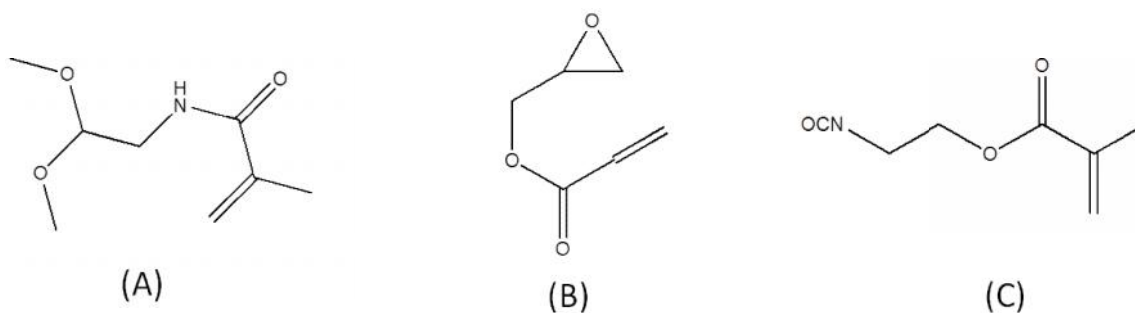
## II]1) Modification du PVA

Il existe plusieurs méthodes de réticulation pour le PVA. La plus commune consiste à réticuler le PVA avec du glutaraldéhyde par condensation des fonctions aldéhyde sur les fonctions alcool conduisant à la formation d'un cycle acétal [205].

Cependant, l'introduction de glutaraldéhyde dans l'élaboration d'un biomatériau est très contraignante du fait de sa toxicité [206]. Son usage nécessiterait une purification totale du matériau avant toute application. De plus, il ne serait plus possible de réaliser les RIPs selon une synthèse *in situ* car le glutaraldéhyde réagirait indifféremment sur les fonctions alcool de la fibrine, du fibrinogène, de la thrombine et du PVA conduisant à la formation d'un seul et même co-réseau. Cette réaction secondaire empêcherait également certainement la formation du réseau de fibrine par voie enzymatique.

Une autre stratégie consiste à modifier une partie des fonctions alcool du PVA avec des groupements réactifs qui permettront ensuite sa réticulation. Dans le chapitre précédent, le réseau POE est synthétisé par voie radicalaire amorcée photochimiquement. Nous avons montré que cette voie de synthèse n'affecte pas la formation du gel de fibrine, c'est pourquoi nous avons choisi de la conserver. Des fonctions acrylate ou méthacrylate doivent donc être greffées sur le PVA.

Une étude bibliographique a permis d'identifier trois réactions de fonctionnalisation du PVA. La première correspond à la réaction, en milieu aqueux, du N-méthacrylamidoacétaldehyde diméthyle acétal (Figure 37A) sur les fonctions alcool du PVA conduisant au greffage d'une proportion choisie de fonctions acrylamide sur le PVA [207]. Ces polymères modifiés ont ensuite été réticulés via une polymérisation radicalaire pour former des hydrogels de PVA biocompatibles. Cependant le N-méthacrylamidoacétaldehyde diméthyle acétal n'est pas commercialisé et est protégé par brevet de la société Biocure®. Sa production à façon représenterait un coût trop élevé (2900 \$ / g) pour l'application visée.



**Figure 37 : Formule chimique du (A) N-méthacrylamidoacétaldehyde diméthyle acétal, (B) du glycidyl acrylate et (C) du 2-isocyanatoethyl méthacrylate**

La deuxième réaction est réalisée en milieu acide (pH = 1,5), entre l'époxy du glycidyl acrylate (Figure 37B) et les fonctions alcool du PVA [208]. Bien qu'intéressante, la biocompatibilité de ce réactif n'a pas été testée. C'est pour cette raison que la troisième réaction qui a déjà montré sa biocompatibilité lors d'encapsulation de chondrocytes, a été privilégiée. Les fonctions alcool du PVA réagissent avec les fonctions isocyanate du méthacrylate de 2-isocyanatoethyle (2-ICEMA) (Figure 37C) conduisant à la formation de liaisons uréthane [209].

## II]2) Synthèse du PVAm

Selon les conditions expérimentales décrites par Bryant et al. [209], la réaction a été réalisée à 60°C pendant 4 h dans le DMSO. 1 à 4% (m/m) des fonctions alcool du PVA (13 000-23 000 g/mol, 98% d'hydrolyse) ont été fonctionnalisées par le 2-ICEMA avec un rendement de greffage, évalué par RMN, compris entre 80 et 100%. Dans notre étude, le taux de modification du PVA affectera la densité de réticulation du réseau de polymère et ainsi sa résistance mécanique. Un taux trop faible peut également rendre la réticulation impossible si l'on se trouve en dessous de la concentration seuil en méthacrylate. D'un autre côté, un taux trop élevé conduirait à un réseau trop densément réticulé au sein des RIPs, diminuant son taux de gonflement en bon solvant. Or le contraire est souhaité lors de la réhydratation des RIPs.

Dans un premier temps, le PVA a donc été modifié avec différentes proportions de 2-ICEMA variant de 1 à 5% (m/m). Pour cela, le PVA est dissous à 20% (m/v) dans le DMSO, puis le 2-ICEMA est ajouté goutte à goutte. La solution est ensuite placée 4 h à 60°C. Le polymère est récupéré par précipitation dans l'acétone. La fonctionnalisation du PVA ne pose pas de problème jusqu'à 3% d'2-ICEMA. Au-delà de cette proportion, un précipité insoluble se forme au cours de la fonctionnalisation. La purification du produit de synthèse devient alors problématique. Ainsi, le taux de modification a été fixé à 3%. Le PVA modifié selon cette synthèse sera noté PVAm dans la suite du manuscrit.

## II]3) Purification du PVAm

Afin d'obtenir un hydrogel de PVA utilisable pour la culture cellulaire, il est essentiel de purifier le PVAm selon le protocole mis au point au cours de cette étude.

Plusieurs techniques ont été testées. L'une d'elles a consisté à dialyser le PVAm en solution dans le DMSO contre de l'eau déionisée, à l'aide d'une membrane de filtration de seuil de coupure 6-

8KDa. Le dialysat a ensuite été lyophilisé. Toutefois, il n'a pas été possible de le sécher complètement puisqu'il est récupéré sous forme d'une « gomme » et non d'une poudre (Figure 38D). L'analyse par RMN du proton a montré que l'élimination du DMSO n'était pas complète.

Par ailleurs, le PVAm a été précipité dans du toluène, comme décrit dans le protocole [210]. Le précipité obtenu n'est plus soluble dans l'eau après séchage. Lorsque de l'acétone a été ajouté à la solution de toluène contenant le précipité, après évaporation des solvants, une fraction du polymère est sous forme de poudre (soluble dans l'eau) et l'autre d'un film (insoluble dans l'eau) (Figure 38B). L'analyse par RMN de la fraction soluble montre l'absence de DMSO, de toluène et d'acétone. La partie insoluble du PVAm (dans l'eau pendant 2 semaines) est vraisemblable due au processus de purification qui a engendré un taux de cristallinité élevé. Or pour solubiliser du PVA à fort taux de cristallinité, il est nécessaire de porter le polymère à 80°C, ce qui n'est pas envisageable du fait de la présence des fonctions méthacrylate. Lorsque le PVAm est précipité dans l'acétone au lieu du toluène, le précipité est obtenu sous forme de gros « grains » qui ne sont pas solubles dans le tampon même après 2 semaines (Figure 38C).

Pour éviter la cristallisation du PVAm au cours de la précipitation, la solution de PVAm à 20% en masse dans le DMSO a été diluée avec de l'eau distillée jusqu'à une concentration massique de 3%. Le polymère, précipité goutte à goutte dans l'acétone, est alors très fin. Il est récupéré par filtration sur un fritté et rincé plusieurs fois à l'acétone pour éliminer au maximum l'eau et le DMSO. Le précipité est ensuite séché sous vide à 30°C pendant au minimum 48h. La poudre obtenue est très fine (Figure 38A) et se solubilise facilement dans le tampon Tris, tampon de synthèse utilisé ensuite.



**Figure 38 : Comparaison des produits obtenus selon le mode de purification: Solution de PVAm diluée à 3% et précipitation dans l'acétone (A), Solution de PVAm 20% et précipitation dans le toluène puis ajout d'acétone (B), Solution de PVAm 20% et précipitation dans l'acétone (C) et dialyse du PVAm (D)**

De plus, l'absence de traces de DMSO ( $\delta = 2,6$  ppm) et d'acétone ( $\delta = 2,2$  ppm) dans le polymère purifié est confirmée par l'analyse RMN  $^1\text{H}$  (Figure 39).

#### **II]4) Caractérisation du PVAm**

Le PVAm purifié a ensuite été caractérisé.

### II]4)1. RMN du proton

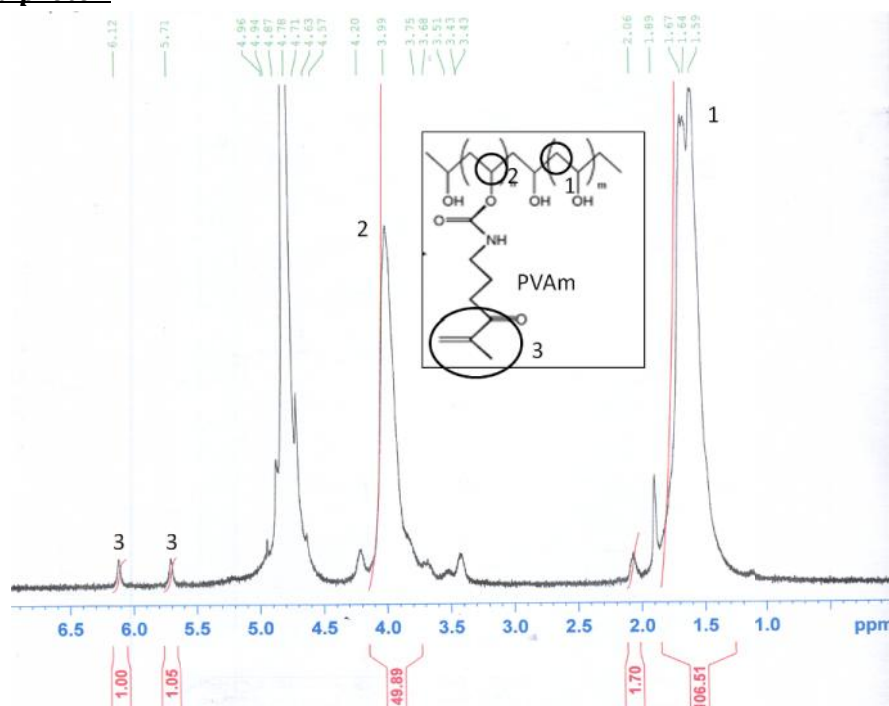


Figure 39 : Spectre RMN du proton du PVAm dans le D2O

Le spectre RMN du PVAm permet de déterminer la valeur moyenne du nombre de fonctions méthacrylate greffées sur le PVA. Ce calcul est réalisé en intégrant les aires des pics caractéristiques des protons méthacrylate (notées  $A_{\text{Meth}}$ ) à  $\delta = 5,58$  et  $6,15$  ppm, des protons  $\text{CH}_2$  à  $\delta = 1,4-1,8$  ppm et des protons  $\text{CH}$  à  $\delta = 3,8-4,1$  ppm (notés  $A_{\text{PVA}}$ ) de la chaîne principale du PVA (Figure 39). Ainsi, il est possible de calculer le pourcentage molaire de fonctions alcool modifiées comme:

$$\% (\text{fonctionnalisation}) = A_{\text{Meth}} / A_{\text{PVA}} * 100$$

Le pourcentage de fonctionnalisation est donc de 2%, soit un nombre moyen de motifs PVA entre chaque méthacrylate estimé à  $51 \pm 8$ . Le rendement du greffage par rapport au 2-ICEMA est donc de  $65 \pm 9$  %. Ce rendement est plus faible que celui obtenu par Anseth et al. (entre 80 et 100% pour 1 à 4% d'2-ICEMA) [208], ce qui est vraisemblablement lié à la méthode de purification différente qui conduirait à l'élimination des PVA de faibles masses molaires.

### II]4)2. Analyse enthalpique différentielle

Afin de déterminer si le caractère semi-cristallin du PVA est conservé après sa modification, une analyse enthalpique différentielle (DSC) a été réalisée (Figure 40). Préalablement, l'analyse thermogravimétrique (TGA) du PVAm confirme que le polymère est relativement sec puisqu'il ne contient qu'environ 1,5% d'eau.

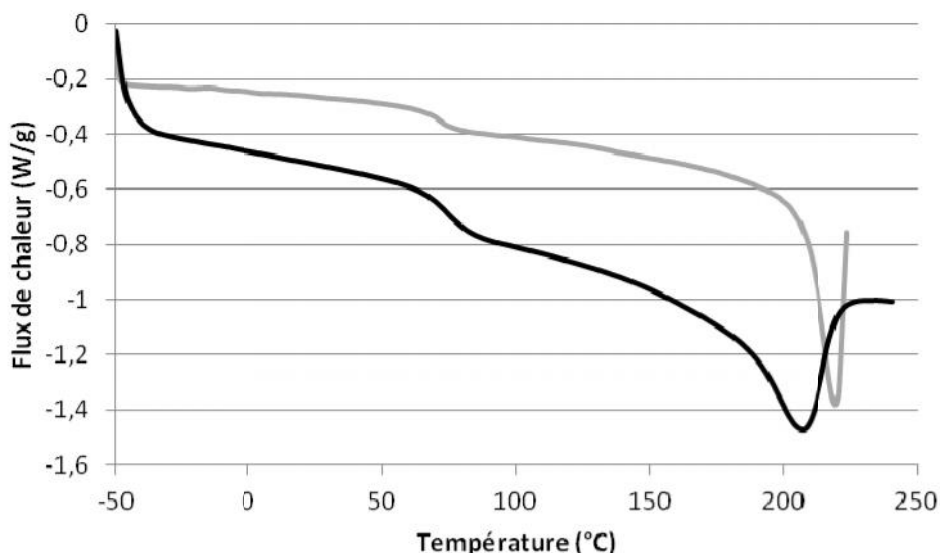


Figure 40 : Thermogramme enregistré sur du PVA modifié (noir) ou non (gris) par DSC – vitesse de balayage : 20°C/min

La température de transition vitreuse ( $T_g$ ) est détectée à environ 71°C pour le PVA non modifié contre 75°C pour le polymère modifié (Figure 40). Le caractère semi-cristallin du PVAm est confirmé mais la fusion des zones cristallines ( $T_f$ ) a lieu à environ 220°C pour le polymère non modifié alors qu'elle n'est que de 208°C pour le PVAm. Les décalages de la  $T_g$  et de la  $T_f$  peuvent s'expliquer par une cristallinité plus faible du PVAm par rapport au polymère non modifié. Cette hypothèse est corrélée avec une enthalpie de cristallisation des zones cristallines plus élevée pour le PVA (65 J/g) que pour le PVAm (37 J/g). La diminution du taux de cristallinité peut être due soit à la méthode de purification, soit au greffage des fonctions méthacrylate gênant la formation des zones cristallines transplanaires. Le faible taux de cristallinité du PVAm par rapport au polymère non modifié est en accord avec sa solubilisation plus aisée que le PVA dans le tampon Tris.

Des analyses complémentaires par spectroscopie infrarouge en mode ATR ont montré l'absence de pic isocyanate résiduel dans le PVAm ce qui permet d'écarter les risques de toxicité liés à cette fonction chimique.

### III] Réseau de PVAm

La suite de l'étude a consisté à synthétiser des matériaux à partir de ce polymère modifié.

#### III]1) Synthèse des réseaux simples PVAm

Afin de rester dans des conditions favorables à la formation du réseau de fibrine, le tampon et les forces ioniques utilisés pour les synthèses des matériaux à base de POE ont été conservés. Ainsi, le PVAm est dissous à différentes concentrations dans le tampon de synthèse. Le photoamorceur, l'Irgacure 2959, est introduit à la concentration de 4.5 mol% par rapport aux fonctions méthacrylate. La réticulation est réalisée pendant 1h sous U.V à température ambiante. Les photographies des matériaux obtenus sont rassemblées sur la Figure 41.



**Figure 41 : Photographies des réseaux simples PVAm à 10 (A), 5 (B) et 3% (m/v) (C)**

Le matériau obtenu avec une concentration de 10% (m/v) en PVAm est autosupporté. Le matériau à 5% (m/v) est formé mais il est très fragile et difficilement manipulable. Quant au matériau contenant 3% de PVAm, il n'a aucune cohésion et n'est pas autosupporté (Figure 41C, la fraction non gélifiée absente de la photo s'est écoulée). Ces expériences préliminaires ont permis de déterminer qu'une concentration limite de 5% (m/v) en PVAm est nécessaire pour former un hydrogel autosupporté. Seules des concentrations supérieures seront donc étudiées par la suite. Ces matériaux seront nommés PVAm (X %), X représentant la concentration en masse en PVAm dans la solution initiale.

### **III]2) Suivi de formation du réseau simple PVAm**

Les conditions de synthèse fixées, la réticulation du PVAm a été étudiée *in situ* par rhéologie. Pour cela, la solution contenant l'ensemble des précurseurs est déposée entre les géométries cône/plan en verre du rhéomètre. Elle est exposée à une source U.V ( $4,46\text{mW}\cdot\text{cm}^2$ , minimum possible de la source, contre  $1,16\text{mW}\cdot\text{cm}^2$  en synthèse classique) pendant la mesure et une température de  $37^\circ\text{C}$  est maintenue.

La formation des réseaux est suivie en enregistrant le module de stockage ( $G'$ ) et le module de perte ( $G''$ ) en fonction du temps d'exposition. Différentes concentrations massiques en PVAm variant de 15% à 5% (m/v), ont été testées le rapport molaire photoamorceur/fonction méthacrylate restant égal à 4,5 mol%. Le début de l'expérience  $t=0$ , correspond au début de l'exposition aux U.V. Pour plus de lisibilité, seuls les modules élastiques sont reportés en Figure 42.



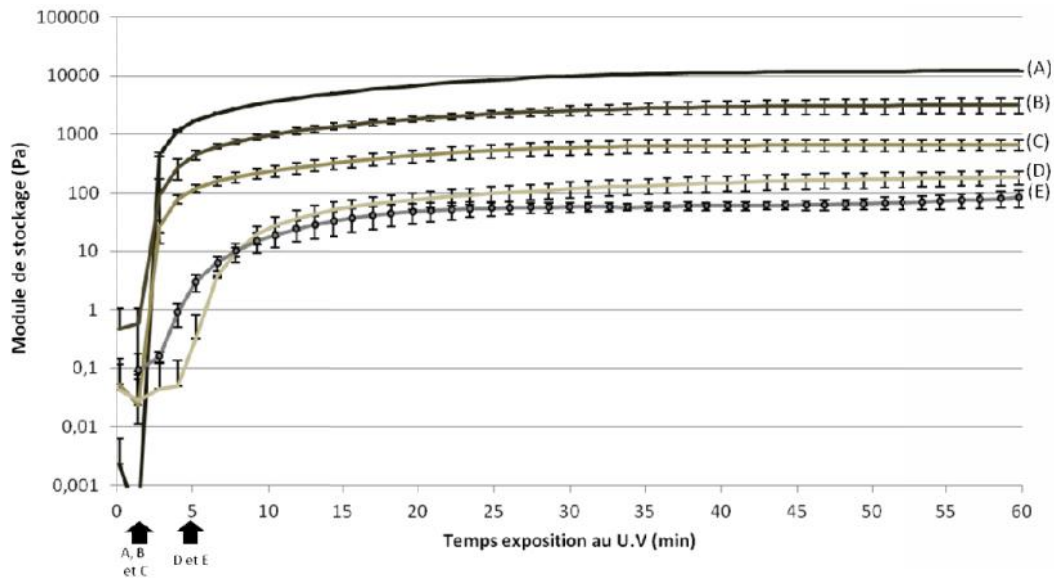


Figure 42 : Suivi de la formation des réseaux simples de PVAm à différentes concentrations massiques X : 15 (A), 10 (B), 7,5 (C) et 5% (m/v) (D). La formation du gel de fibrine à 0,5 (m/v) est représentée par la courbe (E). T=37°C. Les flèches indiquent les temps de gel correspondants

Le point de gel est déterminé au moment où le module de stockage est égal au module de perte. Pour les réseaux PVAm (7,5%) et PVAm (10%), le point de gel est atteint après 2 min d'exposition, alors que pour le réseau PVAm (5%), il n'est obtenu qu'après 5 min. Lorsque la concentration est supérieure à 7,5%, le module de stockage atteint une valeur constante après 30 min alors que pour des concentrations plus faibles, cet équilibre est obtenu après 45 min d'exposition. Ainsi dans les conditions utilisées, la réticulation du PVAm est terminée après 30 à 45 min d'exposition aux U.V

Les modules de stockages à la fin de la réticulation (60 min) augmentent exponentiellement avec la concentration en PVAm (Figure 43).

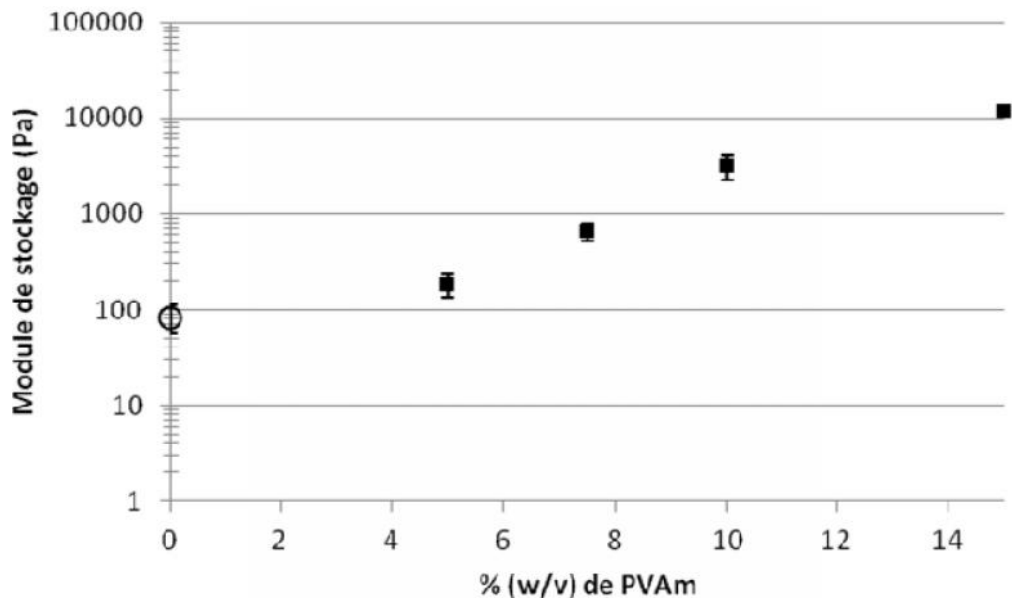


Figure 43 : Module de stockage ( $G'$ ) après 60 min d'exposition aux U.V en fonction de la concentration en PVAm par rapport au gel de fibrine (o)

Le module de stockage le plus élevé est obtenu à 12 100 Pa pour le réseau PVAm (15%) et le plus bas est de 183 Pa pour le réseau PVAm (5%), valeur trois fois plus élevée que celle du réseau simple de fibrine (60 Pa). Par contre, la solution de précurseurs du réseau PVAm (15%) étant très visqueuse, la mise en forme avant réticulation est délicate. De plus, des modules aussi élevés ne sont pas forcément indiqués pour la culture de cellules du derme. En effet, un module de 12kPa correspond à un module de stockage du muscle squelettique et non à celui du derme. Un module aussi élevé est plutôt connu pour être favorable à la prolifération des chondrocytes [210]. La proportion à 15% de PVAm a donc été écartée dans la suite de l'étude.

### III]3) Quantification de la réticulation du réseau simple PVAm

La qualité de la réticulation du PVAm en fonction de sa concentration a été évaluée. Pour cela, des réseaux simples PVAm (10%) et PVAm (5%) ont été synthétisés puis séchés pendant 48h à 30°C sous vide. Des mesures de TGA ont permis de valider cette méthode puisque seuls 2% d'eau sont contenus dans les réseaux après ce traitement. Ces réseaux simples sont extraits au Soxhlet avec de l'eau pendant 48h. Les taux de fractions solubles sont regroupés dans le Tableau 36.

<b>Concentration en PVAm (% w/v)</b>	<b>10</b>	<b>5</b>
<b>fraction soluble (% massique)</b>	23	36
<b>fraction soluble – sels (%)</b>	8	14

**Tableau 36 : Taux de fraction soluble contenue dans les réseaux simples PVAm :**

La fraction soluble contenue dans les PVAm (10%) et (5%) est importante puisque comprise entre 23 et 36%. Cependant, durant le processus d'extraction, les sels présents lors de la synthèse sont eux aussi extraits. En retranchant la fraction massique des sels, la fraction soluble en PVA est d'environ 8% pour le réseau simple PVAm (10%) ce qui est comparable à celle obtenue sur les réseaux PEO (Chapitre I, III]3)). L'analyse RMN <sup>1</sup>H de la partie extraite montre qu'elle contient du PVA ne portant pas de fonction méthacrylate. En ce qui concerne le PVAm (5%), bien que plus élevée (14%), la fraction soluble reste raisonnable pour un matériau synthétisé à partir de précurseur en solution diluée.

Pour conclure, la formation du réseau PVAm est possible pour des concentrations supérieures à la concentration seuil de 5% (m/v). Ces réseaux se forment rapidement (30 min) et sont correctement réticulés. Les matériaux obtenus sont translucides et ont alors les propriétés mécaniques suffisantes pour qu'ils soient aisément manipulables et autosupportés.

### III]4) Caractérisation des réseaux simples de PVAm

Les réseaux ont été ensuite étudiés par DSC (Figure 44). Pour cela, les matériaux sont préalablement séchés sous cloche à 30°C pendant au moins 48h.

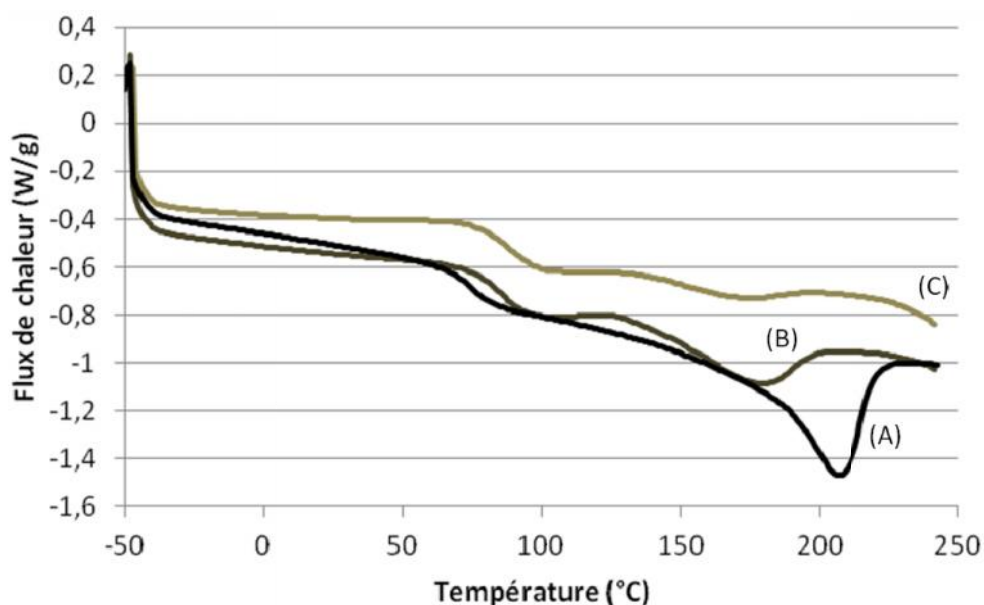


Figure 44 : Thermogrammes de la poudre de PVAm (A) et des réseaux simples PVAm (10%) (B) et (5%) (C) mesurés par DSC (20°C/min) – Second balayage -

Le polymère PVAm (Figure 44A) présente une transition de phase vitreuse ( $T_g$ ) à 75°C. Cette transition est décalée à 85 et 89°C pour, respectivement, les réseaux PVAm (10%) et PVAm (5%). Ce décalage est lié à la réticulation qui provoque une augmentation de la température de transition vitreuse, mais aussi à la présence de sels dans les réseaux qui peuvent conduire à une réticulation physique supplémentaire. Pour confirmer ce dernier point, il aurait fallu synthétiser des réseaux PVAm dans l'eau pure et comparer leur valeur de  $T_g$  à celles-ci.

L'endotherme à 208°C est attribué à la fusion des zones cristallines du PVAm. La température de fusion des zones cristallines diminue à 176 et 170°C pour, respectivement, les réseaux PVAm (10%) et PVAm (5%). Simultanément, la proportion des zones cristallines diminue lorsque la concentration diminue. En effet, l'enthalpie de fusion diminue de 35,6 J/g pour la poudre de PVAm à 21,9 J/g pour les réseaux PVAm (10%) et 5,3 J/g pour le PVAm (5%). La solubilisation du PVAm dans le tampon Tris, nécessaire pour réaliser la synthèse des réseaux, induit donc la disparition d'une partie des zones cristallines. Cela est d'autant plus marqué que la solution est diluée. De plus, il a été montré que la proportion de zone cristalline diminue avec la réticulation des matériaux [211].

#### IV] Synthèse des RIP PVAm/Fb

Dans toute la suite du manuscrit, seul le réseau de Fb à la concentration de 0,5% (w/v) a été utilisé. Les RIPs à base de PVAm et de fibrine seront notés RIP PVAm(X%)/Fb où X représente la concentration massique du PVAm dans la solution de précurseur.

#### IV]1) Mélange des précurseurs

Comme pour le POE, l'ordre d'introduction du PVAm (10% (m/v)), du fibrinogène (0,5% (m/v)) et de la thrombine (2 U/mL) a été optimisé. En effet, une séparation de phase est observée si la réaction enzymatique débute avant homogénéisation complète du mélange. Ainsi l'enzyme est introduite en dernier. La synthèse des RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb est réalisée de la façon suivante : la solution de précurseurs est réalisée dans le tampon de synthèse. Le photoamorceur (Irgacure 2959) est introduit à une concentration de 4,5% (m/m) par rapport aux fonctions méthacrylate. Le fibrinogène (0,5% (m/v)), puis le PVAm (en différentes proportions selon le RIP synthétisé) sont ajoutés à la solution précédente. La thrombine (2U/mL) est finalement introduite juste avant que la solution soit placée dans le moule. Ce dernier est ensuite simultanément incubé à 37°C (pour la formation du gel de fibrine) et exposé aux U.V (pour la formation du réseau de PVAm) afin d'obtenir les RIPs suivant une synthèse « in situ ».

#### IV]2) Formation des réseaux dans les RIPs :

Afin de déterminer le temps optimal d'exposition aux U.V, la formation des réseaux RIPs a été suivie *in situ* en rhéologie. En comparant ces mesures avec celles réalisées préalablement sur les réseaux simples de PVAm (Figure 42), il sera possible de connaître l'impact du réseau de fibrine sur la formation du réseau de PVAm. Pour cela, la solution de précurseur du RIP a été placée dans le rhéomètre puis est exposée aux U.V pendant 1h à 37°C. Les mesures rhéologiques sont réalisées sous une déformation maximale de 1% à une fréquence de 1 Hz. Seules les valeurs du module de stockage en fonction du temps d'exposition sont présentées (Figure 45) pour plus de lisibilité.

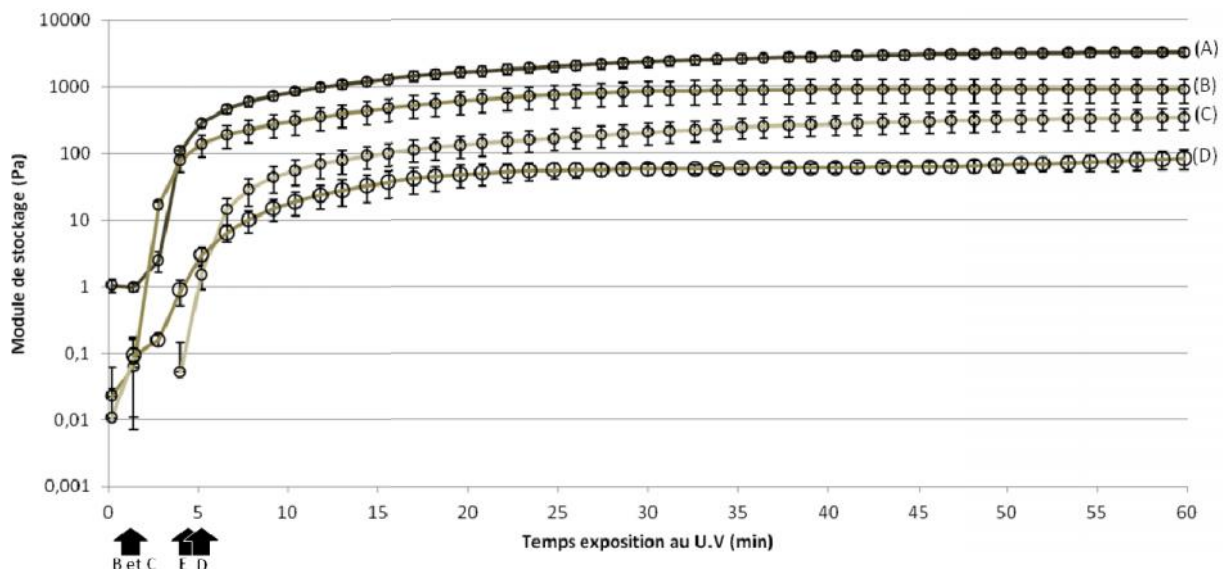


Figure 45 : Suivi de la formation des RIP PVAm/Fb contenant 10% (A), 7,5% (B), 5% (C) de PVAm ainsi que du gel de Fb (D) par rhéologie. T=37°C. Les temps de gels correspondant sont représentés par des flèches

Comme précédemment, le point de gel est repéré par le croisement des courbes des modules de stockage et de perte. Les mélanges gélifient en 3 min lorsque la concentration de PVAm est supérieure à 7,5% (m/v). A une concentration de 5% (m/v), ce temps est de 6 min. La présence de

fibrinogène et de thrombine (Tb) n'a donc pas d'influence significative sur la vitesse de formation du matériau qui reste similaire à celle des réseaux simples PVAm correspondants (5 min). Toutefois, il est à noter que les temps de gels des réseaux fibrine (5 min) et PVAm (2 min) sont très proches. De même, le temps d'exposition nécessaire pour atteindre une valeur stable de module reste inchangé, c'est-à-dire 30 min pour les matériaux contenant plus de 7,5% (m/v) de PVAm et 45 min pour les matériaux avec 5% (m/v) de PVAm.

Après 60 min d'exposition, la valeur finale du module de stockage est comparée à celle obtenue pour les réseaux simples de PVAm sur la Figure 46.

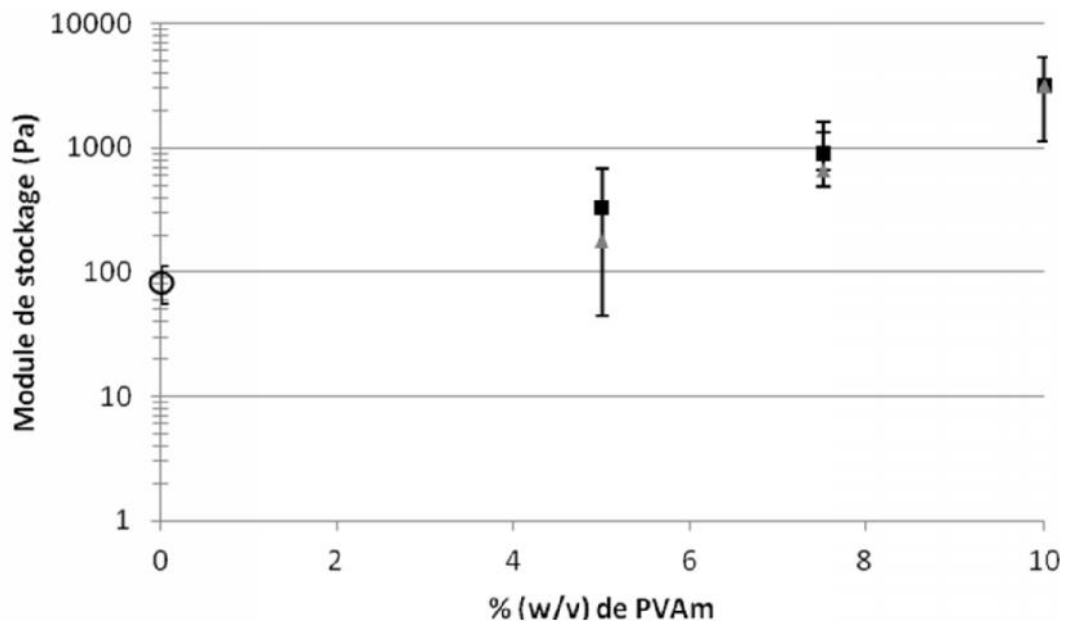


Figure 46 : Valeur du module de stockage après 60 min d'exposition aux U.V en fonction de la concentration de PVAm avec ( ■ ) ou sans fibrine ( ▲ )

Comme observé précédemment (Figure 43), les valeurs du module de stockage après 60 min d'exposition aux U.V augmentent exponentiellement avec la concentration en PVAm. En effet, les modules de stockage sont de l'ordre de 3200, 900 et 330 Pa pour des RIPs contenant respectivement 10%, 7,5% et 5% (m/v) de PVAm. Ainsi les modules de tous les hydrogels sont au moins 5 fois supérieurs à celui du gel de fibrine (60 Pa). Il est à noter que la différence entre les modules de stockage des réseaux simples PVAm et des RIPs correspondants est faible, mais peut s'expliquer par la faible augmentation de masse sèche globale de polymère (PVA et Fb) dans les RIPs par rapport à celle des réseaux simples. En effet, cette différence est plus marquée à faible concentration de PVA : l'ajout de Fb pour le RIP PVAm(5%)/Fb correspond à une augmentation de 10% de sa masse par rapport au réseau simple. Par contre, pour les RIP PVAm(10%)/Fb, la masse de polymère n'augmente que de 0,5% par rapport à celle du réseau simple.

D'après les mesures réalisées en rhéologie *in situ*, les modules de stockage des RIPs n'évoluent plus après 30min ou 45min d'exposition ( $4,46 \text{ mW/cm}^2$ ) pour respectivement les RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb. Cependant, la source lumineuse utilisée pour la synthèse en dehors du rhéomètre étant de moindre puissance ( $1,16 \text{ mW/cm}^2$ ), le temps de polymérisation a donc été fixé à 60 min pour la suite de l'étude. De plus, afin de pouvoir mener à bien toutes les caractérisations, nous nous sommes limités à l'étude des RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb.

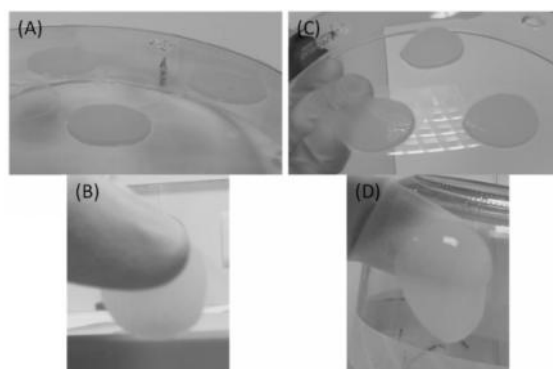


Figure 47 : Photographies des RIPs PVAm(10%)/Fb (A et B) et RIP PVAm(5%)/Fb (C et D) en sortie de synthèse

Les matériaux obtenus sont homogènes, translucides et autosupportés (Figure 47). Il est intéressant de noter que l'introduction de seulement 0,5% de fibrine dans le réseau PVAm (5%) permet de le transformer en matériau manipulable (Figure 47D) alors que le réseau simple PVAm à 5% ne l'est pas (Figure 41B). Les réseaux simples PVAm(5%) étant à la concentration limite pour l'obtention d'un matériau, l'augmentation de masse sèche de 10% dans le RIP PVAm(5%)/Fb est suffisante pour augmenter le module de stockage de 150 Pa et obtenir un hydrogel RIP manipulable.

### IV]3) Caractérisation de l'architecture RIP

Afin de s'assurer que les matériaux obtenus selon ce protocole « in situ » sont bien formés, la réticulation du PVAm et l'hydrolyse du fibrinogène ont été vérifiées.

#### IV]3)1. Fraction soluble du réseau de PVAm

Les mesures rhéologiques *in situ* reportées Figure 45, montrent clairement que le réseau PVAm se forme en présence de fibrine puisque le module de stockage augmente significativement au cours de la synthèse. Pour évaluer la qualité de la réticulation du PVAm dans les RIPs PVAm(10%)/Fb et RIPs PVAm(5%)/Fb, ces derniers ont été extraits pendant 48h au Soxhlet avec de l'eau afin de déterminer la fraction soluble qu'ils contiennent. Les différentes fractions solubles sont comparées à celles des réseaux simples PVAm équivalents (Tableau 37).

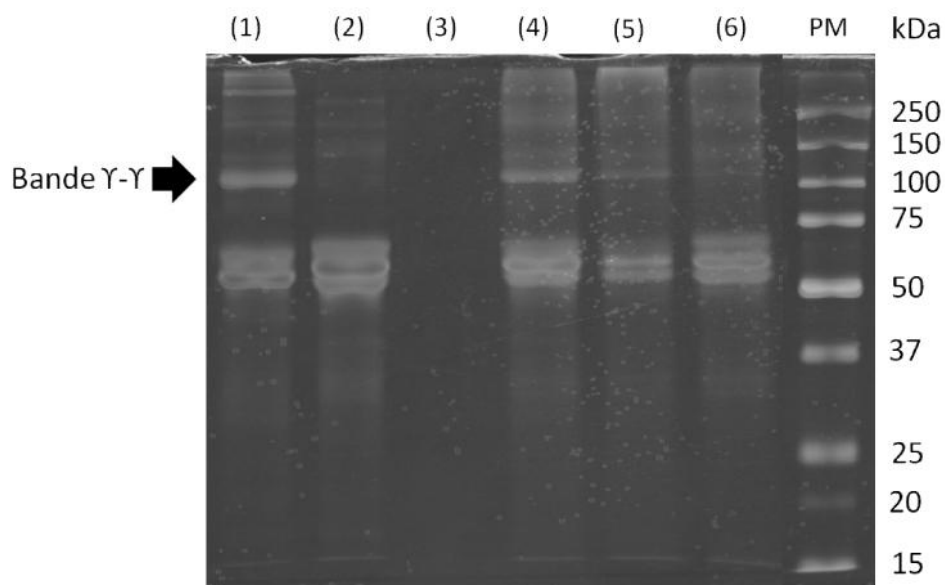
Matériaux	RS PVAm(10 %)	RIP PVAm(10%)/Fb	RS PVAm(5 %)	RIP PVAm(5%)/Fb
% massique de fraction soluble	23	25	36	39
fraction soluble sans les sels	8	11	14	16

Tableau 37: Fractions solubles contenues dans les RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb après 48h d'extraction au soxhlet avec de l'eau

Pour rappel les fractions solubles du polymère de PVAm contenues dans les réseaux simples PVAm (5%) et (10%) sont de 14 et 8%. Celles contenues dans les RIP PVAm (5%)/Fb et RIP PVAm(10%)/Fb sont, après la prise en compte de la proportion massique en sel récupéré également pendant l'extraction, respectivement de 16 et 11%. Leur analyse RMN  $^1\text{H}$  montre que seul du PVA non fonctionnalisé est extrait. Ces taux extractibles restent corrects pour des réseaux de polymère synthétisés à partir de solutions diluées, même s'ils sont supérieurs à ceux des réseaux simples à concentration en PVAm identique. L'augmentation de la fraction soluble entre le réseau simple et le RIP peut s'expliquer de deux manières. Tout d'abord, il est possible que la réticulation du réseau PVAm soit gênée par le réseau fibrine en cours de formation. Une deuxième possibilité est que l'eau utilisée pour l'extraction, déstabilise le réseau physique de Fb et extraie une partie de la protéine. Cette extraction protéique augmenterait la fraction soluble. Cependant, cette extraction n'est que partielle car, après 48h au Soxhlet, les RIP sont toujours positifs à une coloration au bleu de Coomassie ce qui signifie que des protéines sont encore présentes dans les RIPs. Enfin, il est probable que l'augmentation du taux d'extractible soit une combinaison de ces deux phénomènes.

#### ***IV]3)2. Extraction du réseau de fibrine***

Nous avons ensuite vérifié que le réseau de fibrine se formait bien dans les matériaux. Pour cela, les RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb ont été plongés dans du tampon de dégradation chimique, pendant 72h à 37°C, afin de détruire le réseau de fibrine. Les surnageants sont ensuite analysés par électrophorèse sur un réseau de polyacrylamide 10%. Les résultats obtenus sont comparés sur la Figure 48, à ceux enregistrés avec un gel de fibrine (RS Fb) et sur le fibrinogène (Fg), chacun à une concentration protéique de 0,5% (m/v). Un réseau de PVAm contenant du fibrinogène (semi-RIP PVAm(10%)/Fg, dépourvu de thrombine) a également été synthétisé et analysé afin de s'assurer que la présence du réseau PVAm n'altère pas le découpage protéique par le tampon. Enfin, un réseau simple PVAm (10%) a été soumis au même traitement afin de servir de contrôle négatif et de s'assurer qu'il n'y aura pas de faux positif à la révélation à l'argent, ce qui est bien le cas.



**Figure 48** : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des surnageants obtenus après 72h d'incubation des différents matériaux dans du tampon de dégradation chimique du gel de Fb. (1) RS Fb 0,5%, (2) Fg, (3) RS PVAm 10%, (4) RIP PVAm(10%)/Fb, (5) RIP PVAm(5%)/Fb et (6) Semi RIP PVAm(10%)/Fg.

Après la révélation au nitrate d'argent du gel d'électrophorèse, la bande dite « bande  $\gamma$ - $\gamma$  » est parfaitement visible, à environ 105 kDa, pour le réseau de fibrine alors qu'elle est absente pour le fibrinogène. Cette bande  $\gamma$ - $\gamma$  est spécifique de l'action de la thrombine sur le fibrinogène conduisant à l'appariement des molécules de fibrine. Cette bande est détectée pour les RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb alors qu'elle est absente du semi RIP PVAm/Fg. Ceci confirme que, durant la synthèse des RIPs, la réaction enzymatique de la thrombine sur le fibrinogène a bien lieu dans les conditions utilisées (présence de PVAm, irradiation, ...).

La qualité de formation du réseau de protéine a ensuite été évaluée. Pour cela, des RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb sont plongés dans du tampon Tris (pH 7,4) avec 0,02% d'azoture de sodium pendant 24h à 37°C. La fibrine et/ou le fibrinogène non lié au réseau protéique peuvent en être extraits et la solution tampon a été ensuite dosée selon un protocole Elisa indirect. Un gel de fibrine à 0,5% (m/v) est utilisé pour comparaison. Afin de s'assurer que le taux d'extractible n'est pas biaisé par la séquestration de protéine par le PVAm, un semi RIP PVAm(10%)/Fg (dépourvu de Tb) et un réseau simple PVAm (10%) ont été également soumis au même protocole. Les différents taux d'extractible sont regroupés dans le Tableau 38.

Matériaux	Gel de Fb	RIP PVAm(10%)/Fb	RIP PVAm(5%)/Fb	Semi-RIP PVAm(10%)/Fg	PVAm 10%
<b>fraction de protéine soluble (% massique)</b>	0,03 ± 0,03	0,18 ± 0,22	1,00 ± 0,15	100 ± 12,61	0,00 ± 0,00

**Tableau 38** : Fractions de fibrine ou de fibrinogène extraites des matériaux et quantifiées par méthode Elisa

Les dosages réalisés sur les fractions solubles du réseau simple PVAm et du semi RIP PVAm(10%)/Fg montrent respectivement que le PVAm ne provoque pas de faux positif (pas de mesure d'absorbance) et que 24h d'incubation sont suffisantes pour permettre à l'intégralité des protéines de diffuser hors de la matrice PVAm. Le gel de fibrine (0,5% w/v) contient un taux

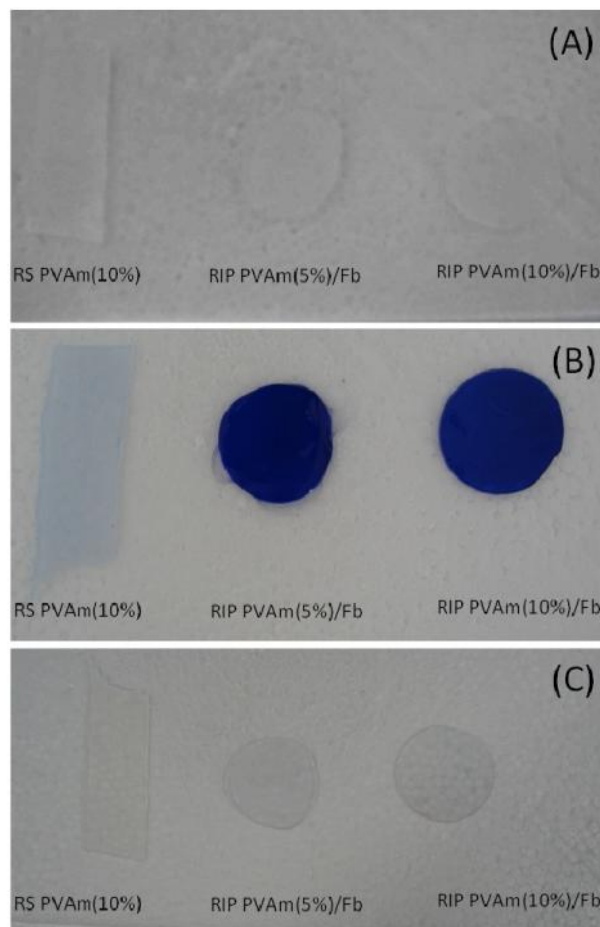


d'extractible inférieur à 0,1%. Ainsi, le dosage en Elisa des extractibles protéiques des RIPs montre un taux de fraction soluble très faible (inférieur ou égal à 1%) quelle que soit la concentration en polymère. Ces résultats confirment que le réseau PVAm n'inhibe pas, à l'intérieur des RIPs, l'hydrolyse du fibrinogène par la thrombine, ce qui est nécessaire à la formation du réseau de fibrine.

### **IV]3)3. Répartition du réseau de fibrine dans les matériaux**

La répartition de la fibrine dans les RIP (continuité, accessibilité en surface du matériau, ...) a été étudiée à l'échelle macroscopique (œil nu) et à l'échelle microscopique (microscopie confocale).

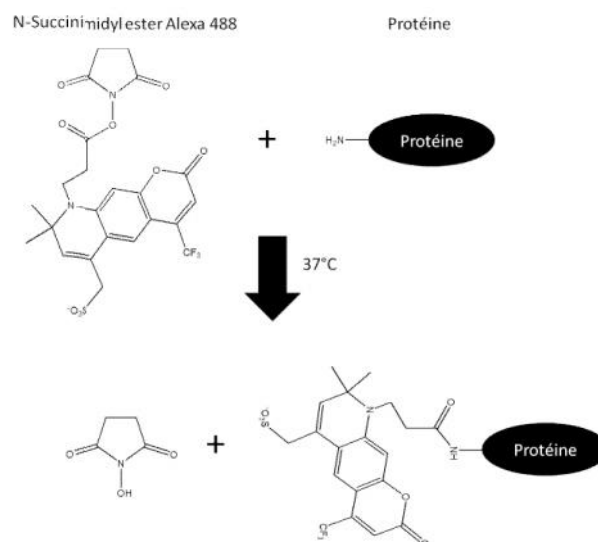
La première méthode a consisté à marquer le réseau de fibrine des RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb en les immergeant dans une solution de bleu de Coomassie pendant 1h30. Le bleu de Coomassie se fixe essentiellement aux acides aminés aromatiques. Après incubation, les matériaux sont abondamment rincés pendant plus de 72h avec une solution d'éthanol 20% (v/v) et d'acide acétique 10% (v/v)). Les bains de décoloration sont changés jusqu'à absence de coloration résiduelle. Les matériaux ainsi colorés sont ensuite immergés dans un tampon de dégradation chimique contenant l'urée (8M) pendant 72h à 37°C. Les photographies des matériaux après chaque étape sont regroupées sur la Figure 49.



**Figure 49 : Photographies des différents matériaux RS PVAm(10%), PVAm(5%)/Fb et RIP PVAm(10%)/Fb juste après synthèse (A), après coloration au bleu de Coomassie (B) et après dégradation du réseau de Fb (C)**

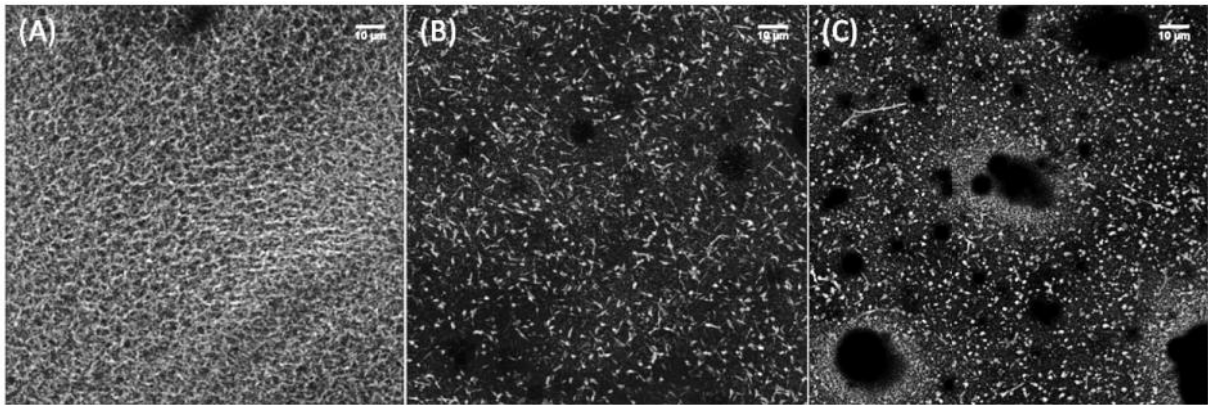
En sortie de synthèse, les 3 matériaux sont parfaitement transparents et homogènes. Après incubation dans le colorant et les différentes étapes de rinçages, les RIP sont de couleur bleu uniforme alors que le réseau simple PVAm (10%) ne présente qu'une faible coloration résiduelle. Enfin, la destruction du réseau de fibrine dans les RIP entraîne la décoloration des matériaux (retour à la coloration post synthèse) qui restent uniformes et autosupportés. Ces observations montrent qu'il y a bien une répartition macroscopiquement homogène du réseau de fibrine dans les RIPs. Par ailleurs, le réseau PVAm est continu sur l'ensemble du matériau, puisque la dégradation du réseau de fibrine n'entraîne pas de destruction du matériau qui reste autosupporté. Cette constatation est logique au vu de la proportion massique du polymère dans le matériau sec (90%).

Cependant, la répartition de la fibrine n'est définie ici qu'à une échelle macroscopique. Afin de déterminer sa répartition à l'échelle micrométrique, nous avons caractérisé les matériaux par microscopie confocale. Pour cela, le réseau protéique a été marqué de manière spécifique à l'aide de fluorophores pouvant facilement diffuser dans le matériau. Ainsi, nous avons utilisé un n-succinimide ester Alexa 488, dont le groupement succinimidyl réagit avec les amines des protéines (Figure 50).



**Figure 50 : schéma de la réaction de couplage du n-succinimidyl ester Alexa 488 sur des fonctions amine d'une protéine**

Dans un premier temps, le gel de fibrine est plongé dans une solution de marquage (tampon HEPES et n-succinimide ester Alexa 488) pendant une nuit à 37°C. Il est ensuite rincé à trois reprises dans un tampon HEPES, puis observé au microscope confocal (Figure 51A). Ce fluorophore permet bien un marquage du gel de fibrine. De plus, nous avons vérifié qu'il ne se greffe pas sur les fonctions alcool du PVAm (résultat non montré). Il n'y a donc pas de faux positif avec le PVAm pour ce type de marquage. Les RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb ont été également marqués par le n-succinimide ester Alexa 488, puis observés au microscope confocal (Figure 51 B et C).



**Figure 51 : Observation par microscopie confocale des matériaux marqués par le n-succinimide ester Alexa 488 : gel de Fb (A), RIP PVAm(5%)/Fb (B) et RIP PVAm(10%)/Fb (C)**

La comparaison des images obtenues sur les RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb à celle enregistrée sur le gel de fibrine montre des différences importantes quant à la répartition du réseau de fibrine. Alors que le gel de fibrine seul apparaît homogène et dense, sa répartition est moins dense et moins homogène dans les RIPs. Cependant, il convient de mentionner que cette répartition est la même sur la profondeur des matériaux (images non montrées).

Ce résultat peut s'expliquer par un marquage moins efficace du réseau de Fb par le n-succinimide ester Alexa 488 dans les RIPs. La matrice PVA ralentirait la diffusion du fluorophore. Une autre explication pourrait être que la formation rapide du réseau PVAm dans les RIPs (environ 2 à 5 min) oblige le réseau de fibrine à adopter une conformation moins dense. Une telle modification dans la densité du réseau de fibrine a déjà été observée lors de la variation du rapport entre le calcium et la thrombine [212]. Cette hypothèse est renforcée par l'augmentation sensible de l'épaisseur moyenne des fibres de fibrine mesurée à l'aide du logiciel imageJ. Cette épaisseur est de l'ordre de  $360 \pm 40$  nm dans un gel de Fb. Dans les RIPs, elle est augmentée d'environ un facteur 3, indépendamment de la concentration en polymère. En effet, elle est de l'ordre de  $890 \pm 80$  et  $970 \pm 120$  nm pour, respectivement les RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb. D'après ces mesures, il semble que la présence du PVAm, même s'il n'empêche pas la formation de fibre de fibrine, impacte tout de même l'épaisseur de ses fibres.

Ces observations ne permettent cependant pas de savoir si le réseau de fibrine est continu ou non sur l'ensemble du matériau. Pour le vérifier, il faudrait marquer une partie du fibrinogène avant qu'il ne soit intégré dans le milieu réactionnel. Des études ont déjà montré qu'il était possible de marquer 10% du fibrinogène sans gêner la formation du réseau de fibrine [213]. L'utilisation d'un n-succinimide Alexa 633 serait alors plus adaptée car il ne risque pas de subir de photo-blanchiment durant la polymérisation aux U.V.

## V] Propriétés des RIPs

### VJ1) Propriétés thermiques

Afin de vérifier que la fibrine n'affecte pas les transitions de phases du réseau de polymère, une analyse par calorimétrie différentielle à balayage (DSC) a été réalisée sur les RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb. Les matériaux ont été séchés au minimum 48h à 30°C sous cloche à vide. Les différents thermogrammes obtenus sont comparés à ceux des réseaux simples PVAm ayant les mêmes concentrations en polymère (Figure 52).

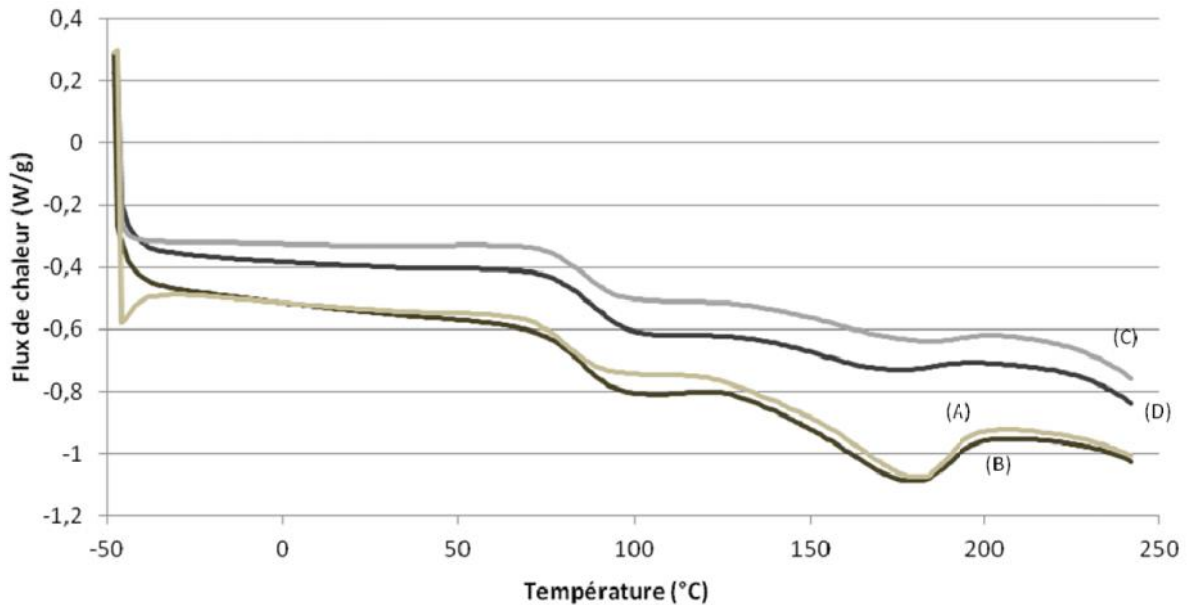


Figure 52 : Thermogrammes des réseaux simples PVAm(10%) (B) et PVA(5%) (D) et des RIPs PVAm(10%)/Fb (A) et PVAm(5%)/Fb (C) obtenus par DSC (20°C/min de chauffe et refroidissement, second cycle).

Tout d'abord, il est à noter que l'analyse DSC du réseau de fibrine ne présente aucun signal lors deuxième passage. Les thermogrammes des RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb montrent que les réseaux de PVAm conservent un caractère semi-cristallin. Les températures de transition vitreuse ( $T_g$ ) et de fusion des zones cristallines ( $T_f$ ) sont légèrement modifiées dans le RIP en comparaison au réseau simple à même concentration en polymère. En effet, la  $T_g$  diminue de 85°C, pour le réseau simple PVAm (10%), à 80°C pour le RIP PVAm(10%)/Fb. Au contraire, la température de fusion augmente légèrement de 176 à 179°C. Ces observations sont également valables pour le réseau simple PVAm (5%) et le RIP PVAm(5%)/Fb puisque la  $T_g$  passe de 89 à 85°C et la  $T_f$  de 170 à 178°C. Ces faibles variations de  $T_g$  et de  $T_f$  suggèrent que la présence de fibrine affecte très peu le réseau de PVAm.

## VJ2) Propriétés mécaniques

Les propriétés mécaniques des matériaux ont ensuite été évaluées à l'état humide (totalement hydraté).

Le module de stockage des RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb ainsi que celui du réseau simple PVAm (10%) ont été évalués à leur taux d'hydratation maximum. Pour cela, les matériaux ont été stockés en sortie de synthèse pendant 24h à température ambiante dans du tampon de synthèse. Les mesures ont été effectuées à une fréquence de 1 Hz à 37°C. Les modules obtenus sont regroupés dans le Tableau 39.

	Matériaux	PVAm (10%)	RIP PVAm(10%)/Fb	PVAm (5%)	RIP PVAm(5%)/Fb
Hydratation maximum	Module de stockage (Pa)	585 ± 159	2140 ± 397	/	257 ± 88
	Taux d'hydratation maximum	8,7	8,9	21,2	19,8
<i>In situ</i> pendant synthèse	Module de stockage (Pa) *	3160	3243	184	334
	Taux d'hydratation (sortie de synthèse) **	7,8	7,5	13,5	12,5

**Tableau 39 : Module de stockage des matériaux mesurés en rhéologie - \* Figure 42 et Figure 45- \*\* Figure 53**

Il est à noter que ces valeurs de module sont plus faibles que celles relevées en rhéologie *in situ* (Figure 42 et Figure 45). En effet, les modules de stockage passent de 3160 à 585 Pa pour le réseau PVAm (10%), de 3243 à 2140 Pa pour le RIP PVAm(10%)/Fb et de 334 à 257 Pa pour le RIP PVAm(5%)/Fb. Ces différences sont dues aux taux de gonflement des matériaux qui sont plus élevés à leur hydratation maximum qu'en sortie de synthèse (Tableau 39). La différence entre ces taux de gonflement vient de l'immersion des matériaux synthétisés dans le tampon de synthèse avant la mesure. Ces observations sont les mêmes pour les matériaux avec 2 fois moins de polymère puisque le RIP PVAm(5%)/Fb présente un taux de gonflement maximum de 19,8 contre 12,5 en sortie de synthèse.

Ces mesures montrent que l'introduction du gel de fibrine dans le réseau PVAm provoque une augmentation significative du module de stockage. En effet, le réseau simple PVAm (10%) a un module élastique de 585 Pa et le gel de fibrine de 30 Pa. L'association de ces deux réseaux conduit à un RIP PVAm(10%)/Fb autosupporté ayant un module de 2140 Pa, c'est-à-dire presque quatre fois ou soixante-dix fois supérieur à celui des deux réseaux simples. Cette architecture RIP permet donc d'obtenir un gel de fibrine autosupporté ayant un module élastique 70 fois supérieur à celui du gel de fibrine seul. Ce constat reste valable lorsqu'une quantité de polymère plus faible est utilisée. Contenant deux fois moins de polymère, le RIP PVAm(5%)/Fb présente un module élastique de 257 Pa soit un module 10 fois supérieur à celui du gel de fibrine seul. Bien que fragile, ce matériau reste un hydrogel autosupporté.

### VJ3) Cycle hydratation/séchage

Lors d'une application comme biomatériau, les RIPs seront stockés à l'état sec, puis réhydratés sur le lieu d'utilisation. Il faut rappeler que le gel de fibrine a une capacité à la réhydratation de seulement 6% alors qu'une réhydratation complète de 100% serait souhaitable. Cette propriété est évaluée par mesure des masses des matériaux au cours de cycles de déshydratation/ réhydratation. Ils doivent, à la fois, conserver leur intégrité et présenter une réversibilité à l'hydratation optimale en retrouvant leur état de post synthèse.

Pour estimer l'impact de la fibrine, les réseaux PVA(10%) et PVA(5%) ont été traités de la même façon. Les taux de gonflement des différents matériaux sur plusieurs cycles sont reportés sur la Figure 53

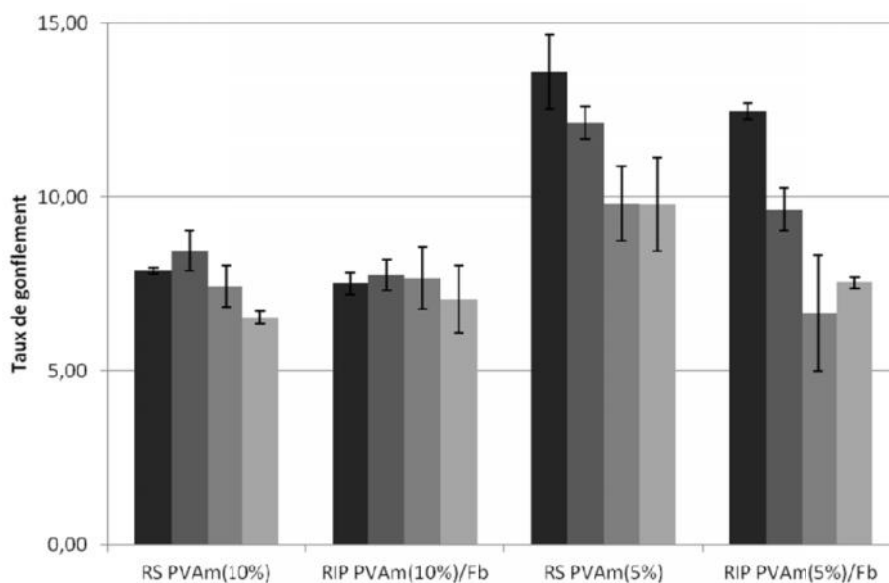
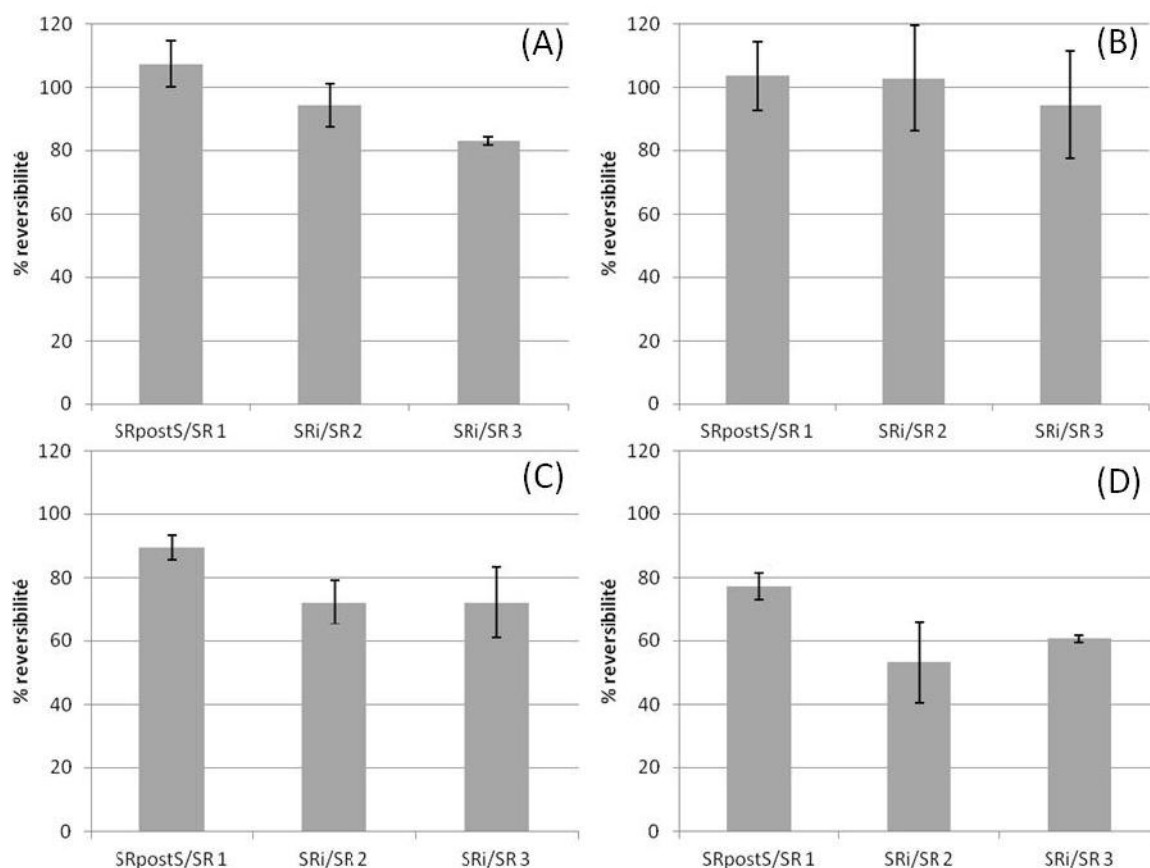


Figure 53 : Taux de gonflement des différents matériaux après synthèse et après 1, 2 et 3 cycle de déshydratation / réhydratation.

Les taux de gonflement du réseau simple PVAm(10%) et du RIP PVAm(10%)/Fb sont proches de 8 et sont plus faibles que ceux des matériaux à base de 5% de PVAm qui sont initialement proches de 13. Plus la fraction de polymère synthétique est faible et plus le taux de gonflement du matériau est élevé.

Afin de comparer facilement le comportement des matériaux entre eux, leurs réversibilités à la déshydratation sont reportées sur la Figure 54.



**Figure 54 : Réversibilité à la déshydratation des RS PVAm(10%) (A) et PVAm(5%) (C), des RIPs PVAm(10%)/Fb (B) et PVAm(5%)/Fb (D).**

Comme espéré, le réseau simple PVAm (10%) se réhydrate de façon réversible sur les deux premiers cycles (SR1/SRi et SR2/SRi proches de 100%). Cette réversibilité totale se retrouve également sur le RIP PVAm(10%)/Fb. A partir du troisième cycle, la réversibilité diminue à la fois pour le réseau simple PVAm(10%) et le RIP PVAm(10%)/Fb à, respectivement, 83% et 93%. Lorsque la concentration en PVAm est plus faible (5%), la réversibilité est également plus faible dès le premier cycle, que ce soit pour le réseau simple PVAm(5%) ou le RIP PVAm(5%)/Fb avec, respectivement, 90 et 77%. A partir du deuxième cycle, la réversibilité se stabilise à 72% pour le réseau simple PVAm (5%) et aux alentours de 60% pour le RIP PVAm(5%)/Fb. La diminution de la réversibilité à la réhydratation des matériaux après plusieurs cycles pourrait être due à une augmentation du taux de cristallinité du PVAm pendant le séchage. La densification du réseau qui en découle limiterait alors le taux de gonflement. Cette hypothèse a pu être vérifiée avec des mesures de DSC réalisées sur le réseau simple PVAm (10%) ainsi que sur le RIP PVAm(10%)/Fb avant et après 3 cycles de réhydratation. En effet, les réseaux simple PVAm et RIP PVAm(10%)/Fb présentent alors des températures de fusion à, respectivement, 199 et 194 °C (au lieu de 176 et 179, initialement) et leur enthalpie de fusion des zones cristallines respective est augmentée à 28,0 et 24,5 J/g (au lieu de 11,9 et 13,06, initialement). Ces résultats confirment donc qu'il y a bien une augmentation du taux de cristallinité du PVAm suite aux séchages répétés.

Afin de diminuer la cristallinité du réseau PVAm et ainsi augmenter la réhydratation au cours des cycles, le PVA a été co-réticulé avec du PEGDM. Nous avons synthétisé un RIP composé d'un co-réseau PVAm(5%)-co-POE(5%) et d'un réseau de fibrine (0,5%) puis nous lui avons ensuite fait subir le même protocole de cycles de déshydratation/réhydratation (Figure 30).

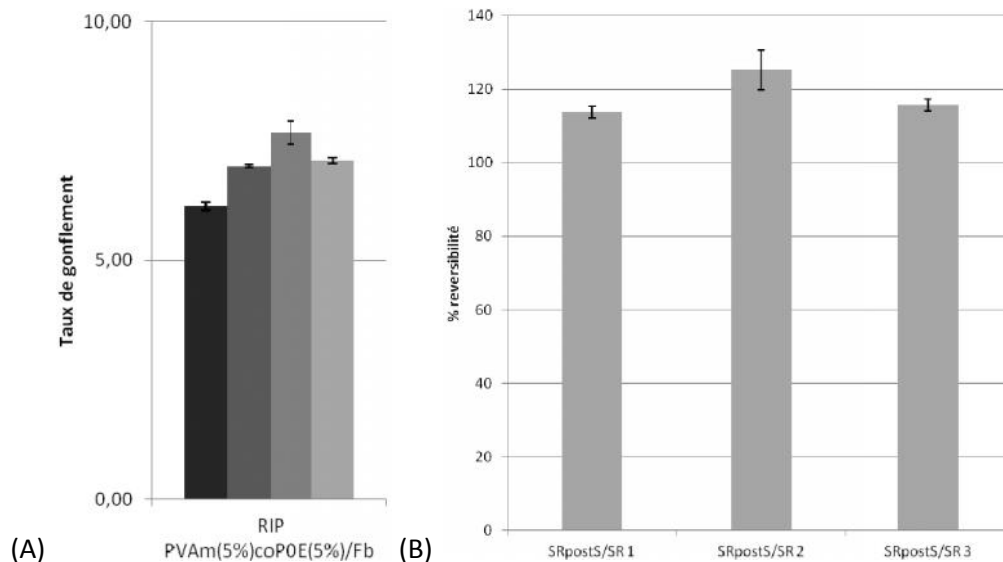


Figure 55 : (A) Taux de gonflement et (B) Réversibilité à la déshydratation du RIP PVAm(5%)-co-POE(5%)/Fb après synthèse puis 1, 2 et 3 cycles de déshydratation/réhydratation.

La Figure (Figure 55A) montre que le RIP PVAm(5%)-co-POE(5%)/Fb, composé de 10% de polymère synthétique, présente un taux de gonflement de 7, proche des matériaux composés de 10% de PVA (RS et RIP). Par contre, sa réhydratation (114%) est réversible sur 3 cycles (Figure 55B). L'introduction de POE dans le réseau PVAm semble donc limiter la formation de zones cristallines au cours des séchages. Ce point devra être vérifié par des mesures de DSC.

Copolymériser le PVAm avec du POE permet d'augmenter la capacité de réhydratation des matériaux sur plusieurs cycles de séchage, si besoin. Cependant, l'utilisation du PVAm permet déjà d'obtenir une réhydratation supérieure à 77% (RIP PVAm(5%)/Fb) ou totale (RIP PVAm(10%)/Fb) sur le 1<sup>er</sup> cycle de séchage/réhydratation. Ainsi, ces matériaux peuvent être facilement stockés à l'état sec et être réhydratés avant utilisation.

#### V]4) Cytotoxicité et prolifération cellulaire

Si ces matériaux sont utilisés en tant que pansement, le comportement des cellules à leur contact doit être testé. Il est nécessaire qu'ils soient non cytotoxiques et que l'adhésion cellulaire puisse se faire même en présence du polymère synthétique.

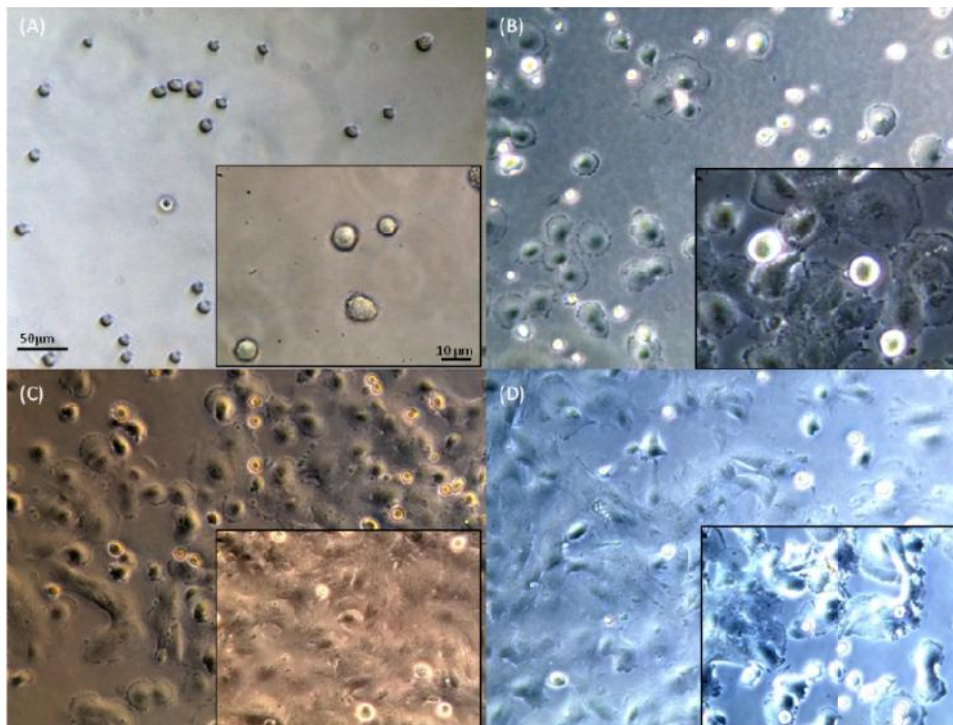
##### V]4)1. Modèle cellulaire : lignée de fibroblaste de derme humain

Pour l'étude de la cytotoxicité des matériaux, le modèle cellulaire utilisé est différent des CHO utilisées pour les matériaux à base de POE (Chapitre 1, V]). En effet, afin de se rapprocher de l'application visée, les fibroblastes de derme humain ont été privilégiés en tant que modèle cellulaire.



La lignée cellulaire choisie est le fibroblaste BJ (ATCC CRL-2522). Les fibroblastes (FB-BJ) ont été isolés à partir d'un derme de prépuce de nouveau-né et immortalisés. Cette lignée est adaptée pour évaluer la prolifération cellulaire sur des biomatériaux puisqu'elle a l'avantage d'avoir un temps de division court (22h) et doit adhérer pour proliférer. La morphologie de cette lignée évolue en fonction de la densité cellulaire. Faiblement concentrées, les cellules adoptent une forme caractéristique « d'œuf au plat » (Figure 56B). 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<sup>2</sup>.

Ce type cellulaire est capable d'adhérer très rapidement. Une cinétique d'adhérence sur du polystyrène de culture traité pour la culture cellulaire a été réalisée en ensemencant 50 000 cellules dans un puits de plaque (48 puits) (Figure 56).



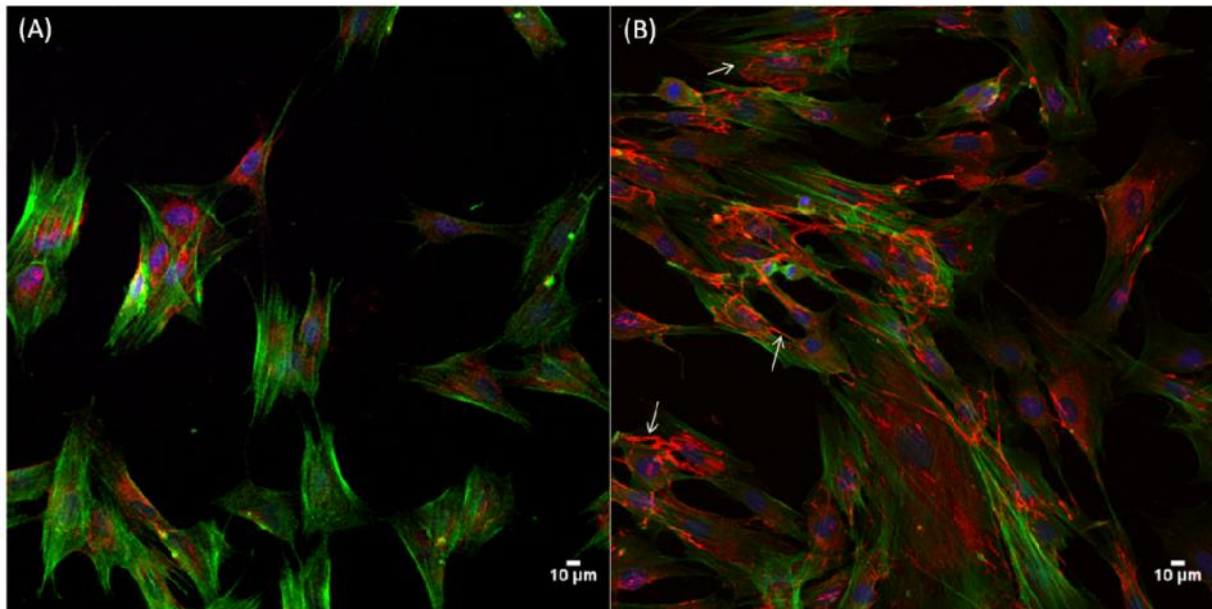
**Figure 56 : cinétique d'adhérence cellulaire des fibroblastes BJ sur polystyrène de culture. Observations réalisées avec un microscope inversé Leica à l'objectif X10 (et X20 encadré) à t = 15min (A), 1h (B), 2h (C), 3h (D).**

Dès 15 min, des cellules adhérentes à la surface et des bourgeonnements à la périphérie cellulaire sont observés. Les cellules montrent un étalement important après 1h et total après 3h.

Le cytosquelette des fibroblastes FB-BJ a été étudié par microscopie confocale à 24 et 72h de culture sur lamelle de verre, en le marquant à la phalloïdine couplée à l'Alexa fluor® 532 (en vert sur la Figure 57). Ce type cellulaire montre une forte organisation du cytosquelette par une importante présence de fibres de stress sur l'ensemble du cytoplasme y compris dans les extensions cytoplasmiques.

*In vivo*, les fibroblastes sont présents dans le derme profond excréant de nombreuses protéines de la matrice extracellulaire (MEC) telles que la fibronectine, le collagène mais aussi des

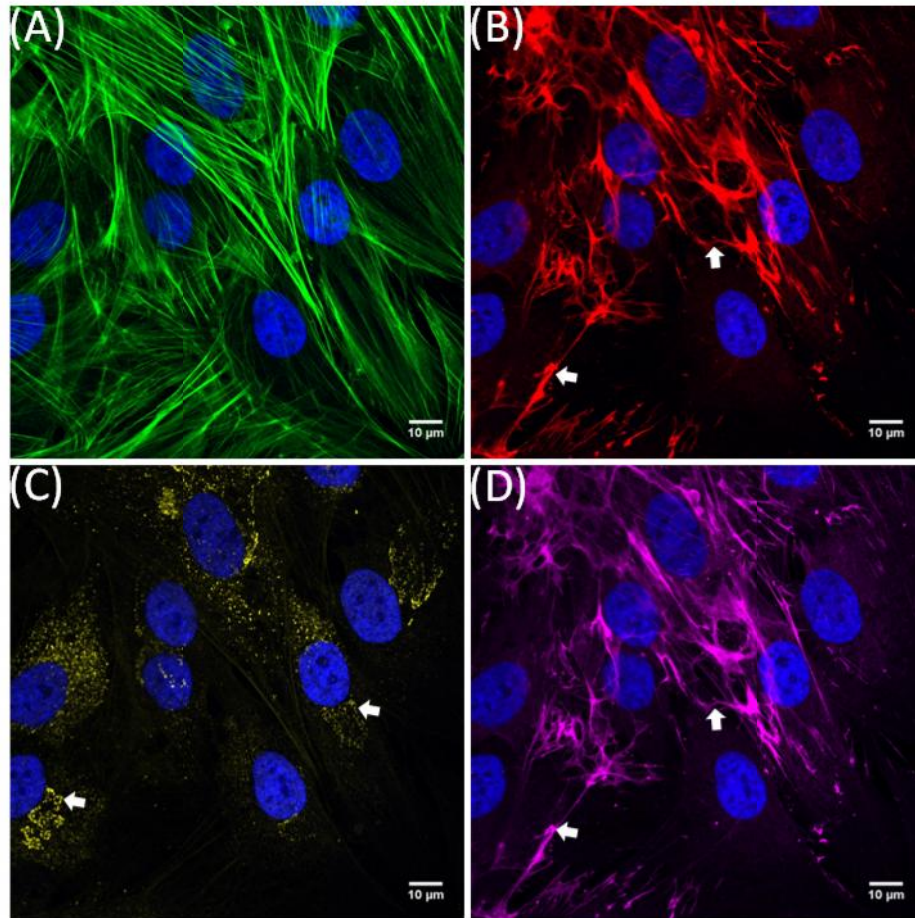
polysaccharides comme l'acide hyaluronique [214]. La capacité de la lignée de fibroblaste BJ à synthétiser des protéines de la MEC a donc été aussi évaluée. Un marquage de la Fibronectine (Fn) a été réalisé à l'aide d'un anticorps polyclonal et d'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa fluor<sup>®</sup> 350 (en rouge sur la Figure 57). Les noyaux ont été marqués à l'Iodure de Propidium (en bleu sur la Figure 57).



**Figure 57 : Observation au microscope confocal (objectif x10) d'une population cellulaire de FB-BJ à 24h (A) et 72h (B) de culture sur lamelle de verre. Le noyau a été marqué au Iodure de Propidium (bleu), le cytosquelette a été marqué à la phalloïdine couplé Alexa 532 (vert) et la Fibronectine par un anticorps primaire polyclonal et un anticorps secondaire couplé FITC (rouge)**

L'observation au microscope confocal a permis d'imager le phénotype caractéristique des cellules FB-BJ adhérentes. A 24h de culture, la fibronectine est intra cellulaire. Après 72h de culture, les FB-BJ sont capables d'excréter la protéine et de la structurer en fibre (flèche photographie B sur la Figure 57). La lignée des FB-BJ est donc capable de synthétiser des protéines de la matrice extracellulaire in vitro.

Les capacités d'excrétion de protéines de la matrice ont été évaluées à partir de tapis cellulaires cultivés pendant 3 jours sur lamelle de verre à l'aide d'anticorps spécifiques de l'acide hyaluronique (excrétion rapide par les fibroblastes), la fibronectine et le collagène de type I, excrétés plus tardivement. Ces différents marquages ont été réalisés sur les mêmes échantillons, en même temps que celui du noyau et du cytosquelette d'actine. Ils ont pu être ensuite observés par microscopie confocale à l'objectif d'immersion x63 (Figure 58).



**Figure 58 : Observation par microscopie confocale (objectif x63) d'une population de fibroblaste BJ après 3 jours de culture sur surface en verre. Le noyau est bleu (DAPI) et (A) cytosquelette en vert (Phalloïdine Alexa 532), (B) fibronectine en rouge (Anticorps secondaire Alexa 633), (C) collagène de type I en jaune (Anticorps secondaire Alexa 488), (D) acide hyaluronique en magenta (anticorps secondaire Alexa 568)**

Après 3 jours de culture sur lamelle de verre, les fibroblastes FB-BJ, sont capables de sécréter, en plus de la fibronectine (Figure 58B), de l'acide hyaluronique (Figure 58D), ces protéines étant colocalisées (flèche). Ceci est dû, soit au marquage par anticorps secondaire Alexa 568 de glycosylation sur la fibronectine, proche du motif acide hyaluronique, soit à la présence d'acide hyaluronique lié à la fibronectine, puisque celle-ci est connue pour son affinité avec ce polysaccharide [215]. La présence de collagène de Type I a également pu être observée après 3 jours de culture. Le marquage de cette protéine est ponctiforme (Figure 58C) et localisé dans le périmètre cellulaire. Cependant ce marquage est réalisé à l'aide d'un anticorps monoclonal spécifique du collagène de type I et non du procollagène. La protéine marquée est bien excrétée puisque la maturation du collagène est extracellulaire [89].

Pour conclure, le modèle utilisé est un modèle fibroblastique de phénotype adhérent, ce qui signifie qu'un défaut d'adhérence conduit à une mort cellulaire (anoïkis). Son adhérence est rapide (environ 1h) sur substrat approprié et sa morphologie est fibroblastique. Enfin, cette lignée cellulaire est capable d'excréter des macromolécules de la matrice extracellulaire telles que la fibronectine, l'acide hyaluronique et le collagène. Il sera intéressant de contrôler que la synthèse de ces macromolécules peut avoir lieu à la surface des RIPs, dans un premier temps, mais aussi à l'intérieur

de ces derniers pour savoir s'ils pourront être utilisés comme support pour la régénération tissulaire d'une zone lésée.

#### ***VJ4)2. Culture cellulaire sur les hydrogels***

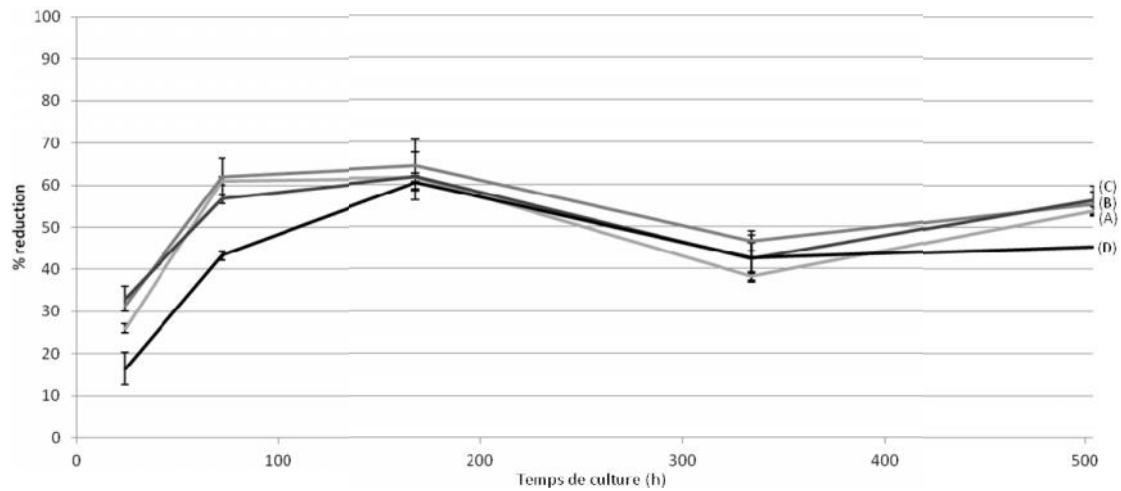
Afin d'étudier la toxicité des matériaux, nous avons privilégié l'approche de culture en deux dimensions. Le réseau simple PVAm(10%), le RIP PVAm(10%)/Fb et le RIP PVAm(5%)/Fb ont été immergés, en sortie de synthèse, dans du milieu de culture pendant 24h au minimum. Ce traitement permet de remplacer les sels du tampon Tris, néfastes à la croissance cellulaire, par un milieu de culture propice aux FB-BJ. Le milieu est ensuite remplacé par une suspension cellulaire de façon à avoir une concentration de 50 000 cellules par matériau, correspondant à l'état de confluence. Les matériaux sont observés à cinq temps de culture (24, 72, 168, 240 et 312h). Le fond de plaques des P48 traitées pour la culture cellulaire a été utilisé comme contrôle positif. Une fois le temps d'incubation atteint, les différents matériaux sont soumis au test d'activité métabolique à l'Alamar Blue® puis sont fixés au para-formaldéhyde 3% avant d'être marqués pour les observations en microscopie confocale.

#### ***VJ4)3. Suivi métabolique***

La mesure est réalisée en remplaçant le milieu de culture des cellules FB-BJ cultivées au contact des matériaux par du milieu de culture auquel est ajouté 10 % (v/v) d'Alamar Blue®. Puis les cellules sont incubées à 37°C en atmosphère humide et à 5% de CO<sub>2</sub> pendant 3h avec cette solution. L'absorbance à 595 nm de la solution d'incubation est alors mesurée afin de quantifier la disparition de rezazurine. En comparant l'évolution de cette absorbance par rapport à celle du contrôle négatif sans cellule, il est possible de déterminer le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue® selon la relation :

$$\% \text{ reduction} = 100 - \left( \frac{\text{Abs}(595\text{nm})}{\text{Abs}(595\text{nm})_{\text{Ctrl négatif}}} * 100 \right)$$

Le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue® est proportionnel à l'activité mitochondriale, donc, plus la quantité d'Alamar Blue® réduite est importante, plus les cellules viables sont nombreuses. Le pourcentage de réduction a été reporté en fonction du temps sur chaque matériau (Figure 59).



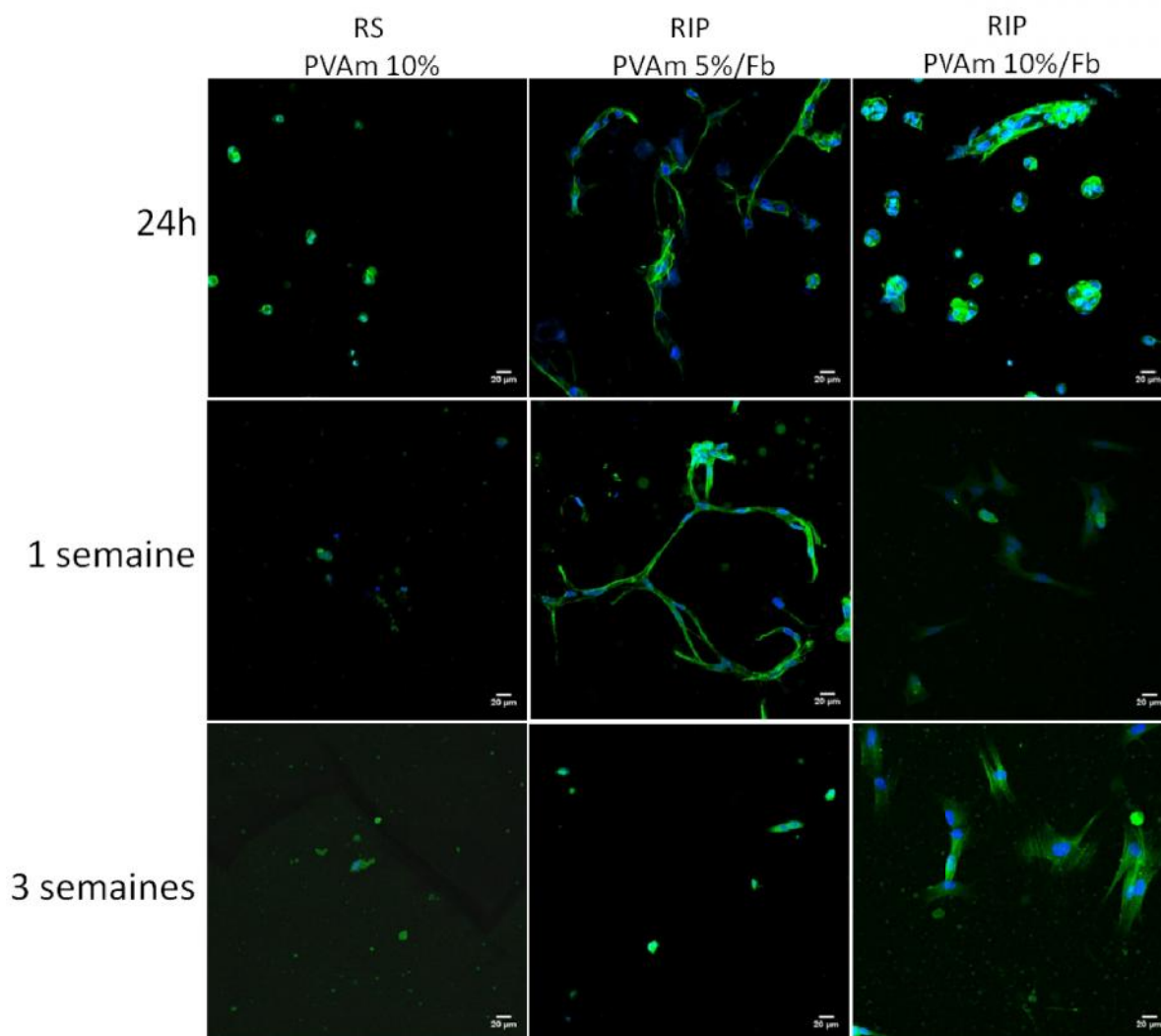
**Figure 59 :** Evolution de la réduction de l'amar blue après 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de culture. Les matériaux testés sont le RS PVAm(10%) (A), le RIP PVAm(10%/Fb) (B), le RIP PVAm(5%/Fb) (C) et le polystyrène de culture cellulaire (D)

Quel que soit le matériau testé, l'activité mitochondriale augmente entre 24h à 72h de culture, puis celle-ci reste stable pendant 168h de culture et ne décroît que légèrement lors des 312h de culture suivantes. Par rapport au polystyrène de culture (D), les matériaux à base de PVAm ((A), (B) et (C)) ne présentent pas de toxicité puisque l'activité métabolique et donc la présence de cellules vivantes sont comparables. De plus, l'activité mitochondriale n'est pas ralentie en comparaison avec des surfaces modèles comme le polystyrène de culture.

Ces premières mesures montrent que les matériaux ne présentent pas de cytotoxicité pour la lignée fibroblastique de derme humain BJ. Cependant, il n'est pas possible de différencier la participation des cellules présentes sur les matériaux de celles à la surface des puits. Afin de déterminer la capacité des cellules à adhérer, à proliférer et à synthétiser des protéines de la MEC sur les matériaux, la population cellulaire présente à leur surface a été observée.

#### ***V]4)4. Morphologie cellulaire***

La morphologie des cellules sur les matériaux a été observée au microscope confocal après 24h, 1 semaine et 3 semaines d'incubation (Figure 60). En effet, l'altération de la morphologie cellulaire peut directement conduire à l'altération de son comportement et de ses sécrétions <sup>[219]</sup>. Les noyaux ont été marqués au DAPI (en bleu) et le cytosquelette à la phalloïdine-Alexa 532 (en vert).



**Figure 60 : Morphologie des FB-BJ à la surface des RS PVAm(10%), RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb. Les noyaux ont été colorés par le DAPI (bleu) et le cytosquelette a été marqué à l'aide de phalloïdine Alexa 532 (vert). Objectif x20.**

Deux types de comportement cellulaires sont observés. Sur le réseau simple PVAm(10%), la morphologie cellulaire à 24h est ronde, sans présence de cellule étalée. Il n'y a pas d'évolution de cette morphologie après 3 semaines de culture. En ce qui concerne les cultures cellulaires sur les RIPs, des cellules rondes et étalées sont observées à la surface des matériaux. Cependant, à des temps de culture plus importants (1 à 3 semaines), la proportion de cellules étalées augmente par rapport à celle des cellules rondes sur le RIP PVAm(10%)/Fb et décroît légèrement sur le RIP PVAm(5%)/Fb. Dans le cas du RIP PVAm(5%)/Fb, la morphologie des cellules allongées est très fusiforme et se rapproche de celle de fibroblastes sub-confluents. Les cellules à la surface du RIP PVAm(10%)/Fb, quant à elles, montrent une morphologie plus étalée et géométrique se rapprochant d'un myofibroblaste. Ces différences de morphologie peuvent s'expliquer par une différence de rigidité entre les deux matériaux (Figure 46), connue pour engendrer des différences de morphologie cellulaire et d'organisation du cytosquelette d'actine [216] mais également une différenciation des fibroblastes en myofibroblastes. Afin de conclure sur la différenciation ou non de ces populations cellulaires, il aurait été intéressant de réaliser un marquage de la protéine cytosquelettique SMA spécifique des myofibroblastes et absente chez le fibroblaste.

#### VJ4)5. Densité nucléaire

Afin de quantifier de manière plus spécifique la croissance cellulaire à la surface des matériaux, les noyaux des fibroblastes ont été marqués, comme précédemment, à l'aide d'un intercalant, le DAPI. Les densités cellulaires (quantifiées en traitant les images confocales avec le logiciel imageJ) après 24 h et 72 h, 1, 2 et 3 semaines d'incubation avec la suspension cellulaire sont représentées dans la Figure 61.

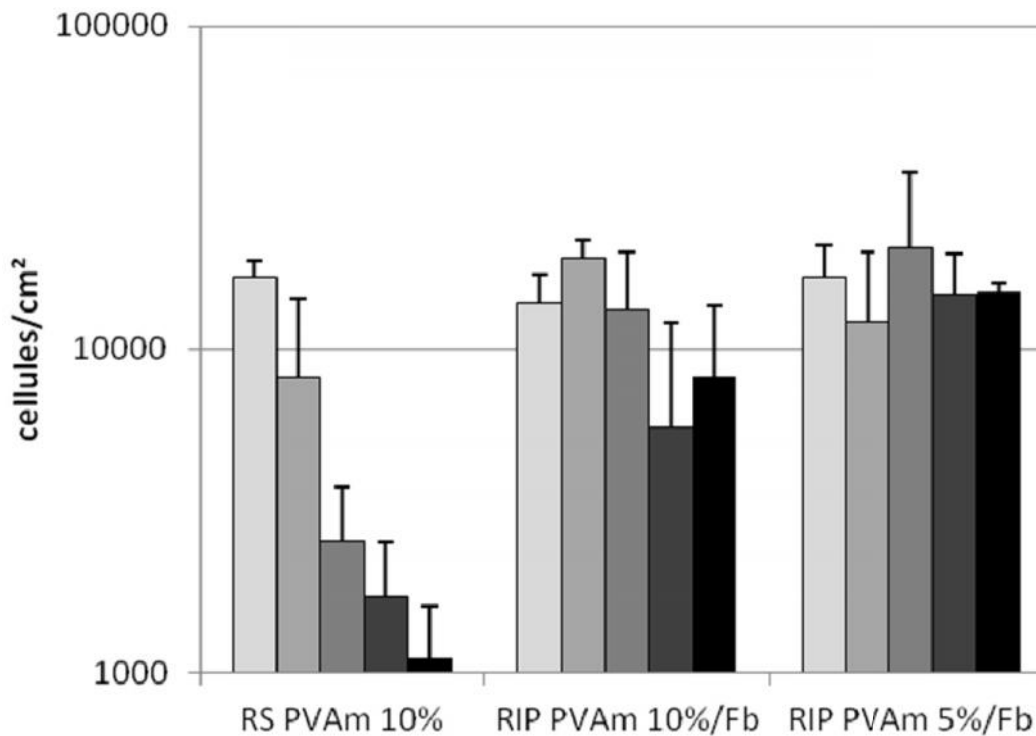



Figure 61 : Densité cellulaire mesurée à la surface des matériaux RS PVAm(10%), RIP PVAm(10%/Fb) et RIP PVAm(5%/Fb) à 24h , 72h , 1 semaine , 2 semaines  et 3 semaines  de culture

Deux évolutions différentes de la population cellulaire sont observables. Tout d'abord, sur le réseau simple de PVAm(10%), la concentration cellulaire diminue continuellement pendant les 3 semaines d'incubation. En effet, il est connu que les réseaux hydrophiles neutres limitent l'absorption protéique [217] et que nombre de ces matériaux limitent également l'établissement des points focaux d'adhésion [218] essentiels à la survie cellulaire. Leur absence entraîne la formation de morphologies particulières, puis l'apoptose [219]. Lorsque la fibrine est présente dans les matériaux (RIP PVAm(5%)/Fb et RIP PVAm(10%)/Fb), la densité cellulaire reste constante au cours des 3 semaines d'incubation. Le réseau de fibrine apporte les motifs protéiques RGD propices à l'adhérence cellulaire. Cette observation étant valable pour les deux RIPs, la diminution de moitié de la quantité de polymère n'a pas d'influence significative sur la prolifération cellulaire. La présence de fibrine dans les matériaux permet le maintien de la population cellulaire, sans prolifération.

#### VJ4)6. Taux de viabilité

Pour finir, la viabilité des cellules à la surface des matériaux a été évaluée. Cet indicateur représente la proportion de cellules vivantes par rapport aux nombres de cellules en état de stress ou pro apoptotique. Pour cela, un kit Live and Dead, composé de calcéine AM et de bromure d'éthidium homodimère, est utilisé. En présence de cellules vivantes, la calcéine AM est hydrolysée par des activités enzymatiques cellulaires et émet alors une fluorescence verte. En présence de cellules en état pro-apoptotique ou mortes, le bromure d'éthidium homodimère s'intercale entre les brins d'ADN et émet une fluorescence rouge. Ainsi, après coloration au Live and Dead, une cellule entièrement verte est en bonne santé alors qu'une cellule verte avec un noyau rouge ou la présence d'uniquement un noyau rouge, est pro-apoptotique ou déjà morte.

Les images des cellules sur les matériaux à différents temps de culture sont rassemblées dans la Figure 62.

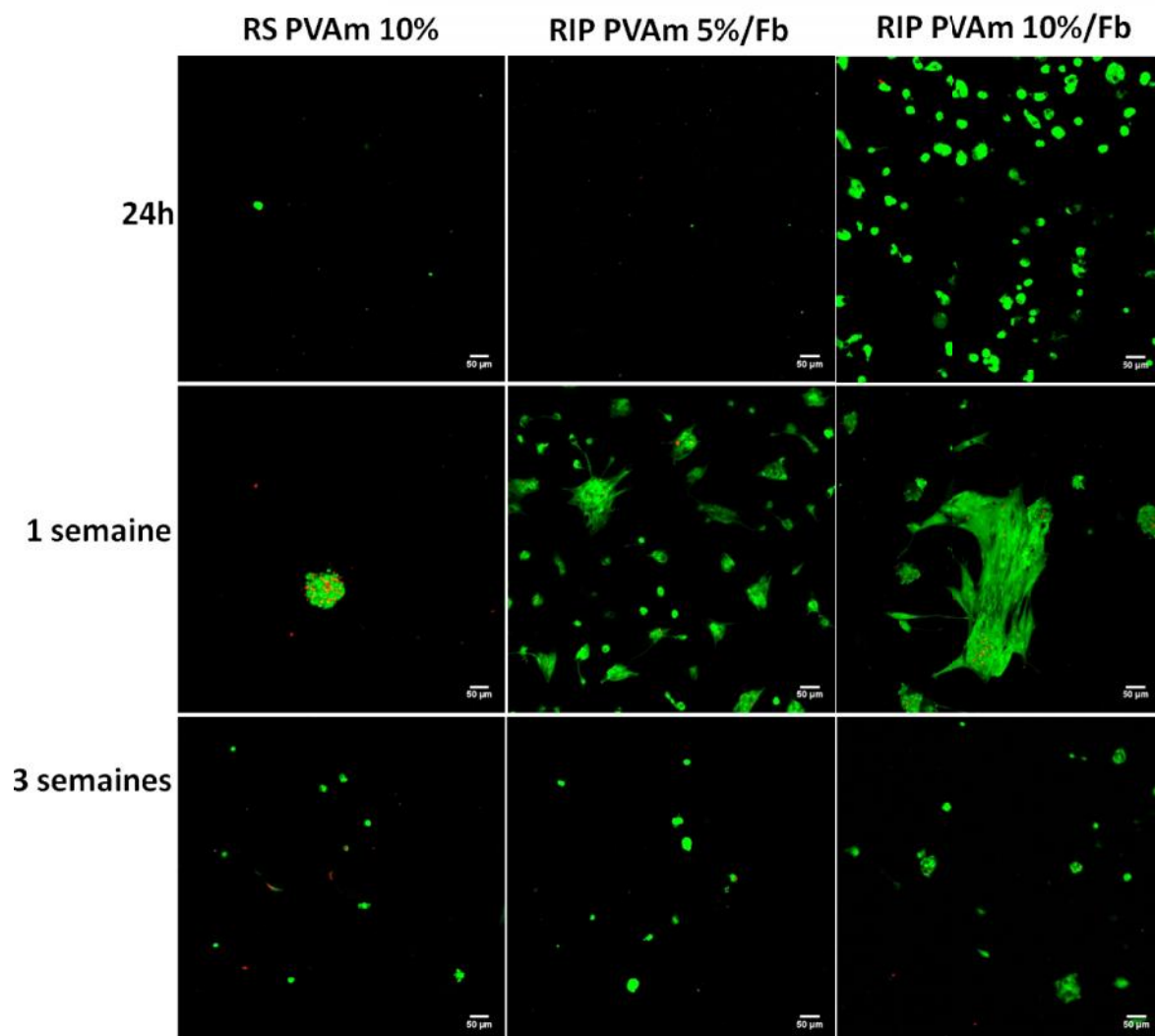


Figure 62 : répartition des cellules vivantes (verte) et mortes (rouge) sur le RS PVAm(10%), RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb à 24h, 1 semaine et 3 semaines. Le marquage a été réalisé à l'aide du kit Live and Dead - Microscopie confocale - Objectif x10.



Comme pour la morphologie, deux tendances de comportements cellulaires sont observées selon le type de matériaux étudiés. Tout d'abord, très peu de cellules sont présentes à la surface du réseau simple PVAm(10%) et, quel que soit le temps de culture, ces cellules restent rondes. De plus, des structurations de cellules en grappe sont observées, ce qui est généralement interprété comme un défaut d'adhérence des cellules sur le substrat. Enfin à 1 semaine de culture sur les RS PVA(10%), la grande majorité des cellules montrent un marquage rouge au bromure d'éthidium homodimère suggérant des profils apoptotiques, que ce soit en état isolé ou bien à l'intérieur des grappes. Par contre, sur le RIP PVAm(10%)/Fb et le RIP PVAm(5%)/Fb, des cellules étalées sont observées parmi les cellules rondes qui ont tendance à se regrouper. Les cellules étalées sont majoritairement vertes, en bonne santé. La mortalité cellulaire détectée est principalement présente en dehors des regroupements cellulaires sur des cellules rondes.

Afin de comparer les taux de survie des cellules à la surface de ces 3 matériaux, le nombre de cellules pro apoptotiques ou mortes a été quantifié par rapport au nombre de cellules totales à l'aide du logiciel imageJ (Figure 63).

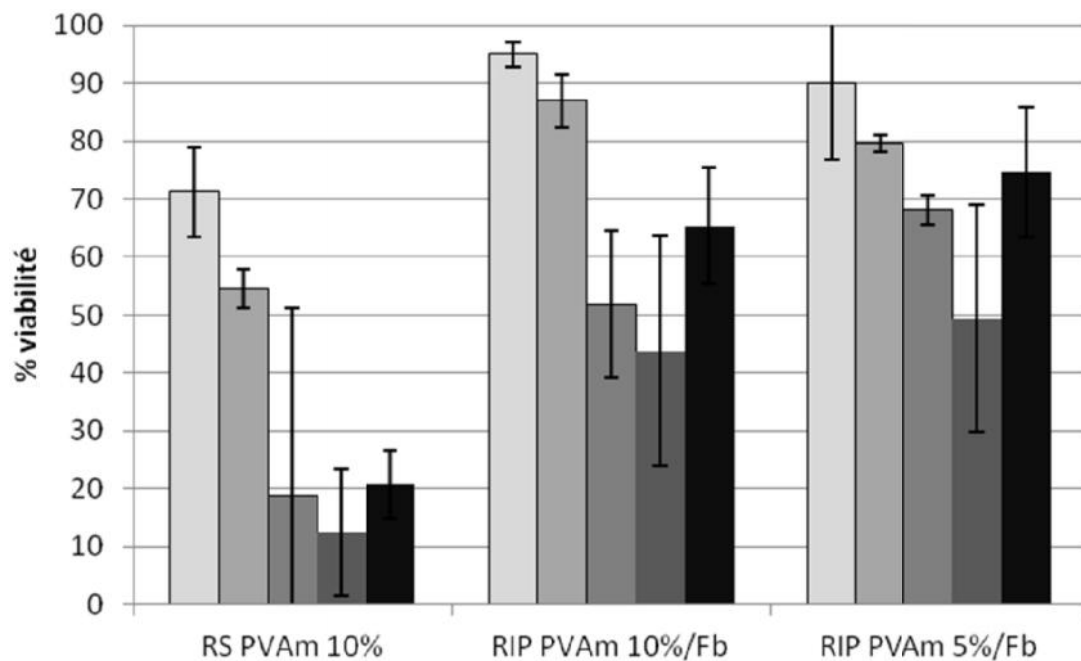


Figure 63 : viabilité cellulaire sur les RS PVAm(10%), RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb à 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de culture

La capacité de survie des cellules à la surface du réseau simple PVAm(10%) est faible dès 24h d'incubation (70%) ce qui est en accord avec les mesures de densité cellulaire (Figure 61). Elle décroît avec le temps de culture pendant la première semaine jusqu'à une valeur moyenne d'environ 20%, puis se maintient à ce taux au cours des deux semaines suivantes. Sur les matériaux RIPs, de par la présence du réseau de fibrine, les cellules montrent une meilleure viabilité à temps courts (95 et 90 % de viabilité pour respectivement le RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb à 24h). Cependant, la viabilité chute comme pour le réseau simple tout en restant plus élevée après trois semaines de culture (65 et 70% pour respectivement le RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb contre 20% pour le réseau simple)

Les cultures cellulaires réalisées sur les matériaux à base de PVAm ont permis de montrer que ce réseau n'interférait pas sur le métabolisme cellulaire. Par contre, ce réseau seul très hydrophile, ne permet pas l'étalement cellulaire à sa surface, ce qui induit une forte mortalité cellulaire puisque le modèle cellulaire utilisé est adhérent. L'absence du phénotype sain dans la population cellulaire ne permet pas une multiplication cellulaire. Cependant, l'ajout du réseau de fibrine au réseau de PVAm dans une architecture RIP apporte des motifs RGD à la surface des matériaux. La présence de ces motifs protéiques permet d'observer des étalements cellulaires en surface et une augmentation de leur capacité de survie aux temps courts. La population cellulaire ne se développant pas, la mortalité cellulaire reste élevée sur un temps long de culture (3 semaines).

Le réseau de PVAm hydrophile ne favorise pas l'absorption de protéines néo synthétisées et ne permet donc pas aux cellules d'augmenter leur surface d'adhérence pour croître en nombre. De plus, la non-dégradabilité de ce réseau empêche les cellules de remodeler leur environnement et d'accéder au réseau de fibrine, ce qui conduit à terme à une augmentation de leur mortalité. Afin de limiter ce phénomène, il faudrait envisager que le réseau synthétique du RIP puisse subir une dégradation enzymatique.

## **VI] Conclusion**

Au cours de ce chapitre, le réseau de polymère synthétique du RIP a été modifié afin que les matériaux présentent un comportement réversible sur un cycle de séchage puis de réhydratation. Dans un premier temps, du méthacrylate de 2-hydroxyéthyle (HEMA) a été introduit dans le réseau POE du RIP POE/Fb, en le copolymérisant avec le diméthacrylate de polyéthylène glycol (PEGDM), à différentes proportions. Contrairement à ce qui était attendu, l'introduction de PHEMA dans les RIPs réduit son taux de gonflement dans le tampon Tris lors de la réhydratation par rapport à celui du RIP POE/Fb. Cette voie a donc été abandonnée au profit d'un autre polymère hygroscopique l'alcool polyvinylique (PVA).

Afin de conserver une polymérisation du réseau synthétique par voie radicalaire n'affectant pas la formation du gel de fibrine, une partie des fonctions alcool du PVA a, préalablement, été fonctionnalisé avec des groupements méthacrylate. Ainsi, des RIPs PVAm/Fb ont été synthétisés et caractérisés. Ils contiennent entre 11 et 16% de fractions solubles de polymère, composées de PVA non fonctionnalisé. La fraction soluble de protéine est, quant à elle, inférieure ou égale à 1% de la teneur en protéine. La répartition de la fibrine est homogène à l'échelle macroscopique. Elle forme un réseau fibrillaire peu dense et homogène sur la profondeur des matériaux. Ces matériaux sont autosupportés à l'état hydraté. Leur module de stockage augmente de 260 à 3240 Pa selon le taux d'hydratation et la proportion massique de PVA. L'étude de leur comportement à la réhydratation, paramètre qui avait motivé la synthèse de ces RIPs, a montré que le remplacement du réseau POE par un réseau PVAm, en mêmes proportions massiques, permet d'obtenir une réhydratation totale (RIP PVAm(10%)/Fb) lors du premier cycle de séchage/réhydratation. Ces matériaux peuvent donc être stockés à l'état sec, puis réhydratés juste avant utilisation.

Les RIPs à base de PVAm ayant les caractéristiques physicochimiques recherchées, des cultures cellulaires de fibroblastes de derme humain FB-BJ ont été réalisées à leur surface. En

présence du seul réseau PVAm, les cellules maintiennent leur activité métabolique mais ne s'étalent pas à sa surface, ce qui induit une forte mortalité de cellules (81% en une semaine). L'introduction du réseau de fibrine dans le réseau PVAm apporte des motifs RGD à la surface des matériaux. Les cellules s'étalent alors en surface et leur capacité de survie augmente aux temps courts. Toutefois, la population cellulaire ne se développe pas et la mortalité cellulaire apparaît sur les temps longs (30-35% en 3 semaines). Le réseau PVAm, hydrophile et non biodégradable empêche vraisemblablement les cellules de remodeler leur environnement. Afin de palier ce défaut, nous avons cherché à développer un réseau synthétique, à associer à la fibrine dans les RIPS, qui soit dégradable par voie enzymatique. Ces matériaux sont présentés dans le chapitre suivant.

# **Chapitre III : Matériaux biodégradables**

Le PVA est un polymère classifié comme biodégradable [220]. Cependant, la notion de « polymère biodégradable » ne précise ni la durée, ni les conditions dans lesquelles cela est possible. Dans notre cas, le matériau doit être dégradé au cours d'un processus physiologique, la cicatrisation, donc sur la durée correspondante. Le PVA est connu pour être dégradé par des enzymes bactériennes et plus précisément par l'action combinée de deux enzymes : la polyvinyl alcool oxydase et la  $\beta$ -dicétone hydrolase présentes toutes deux chez l'organisme procaryote *Pseudomonas putida* [221] ou encore chez *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* [222] (Figure 64).

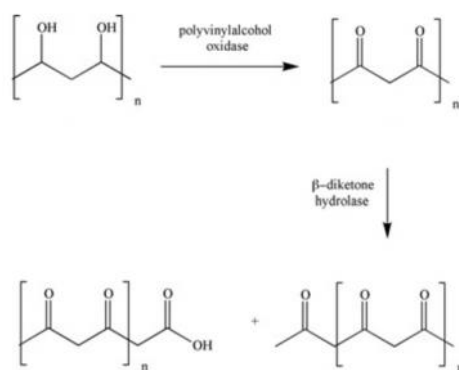


Figure 64 : dégradation enzymatique du PVA

Des enzymes hépatiques humaines sont capables de dégrader les acides  $\beta$ -dicétones (Figure 65) [221]. Cependant, l'existence de polyvinyl alcool hydrolase dans les tissus humains n'est pas reportée à l'heure actuelle. Il est donc peu probable que le PVA soit dégradé lors de l'invasion cellulaire ou du remodelage de la plaie.

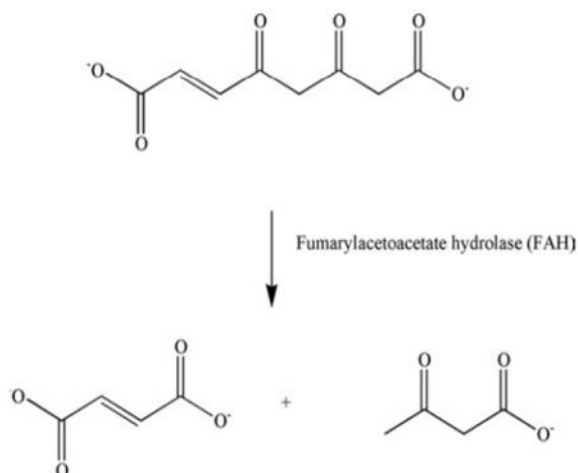


Figure 65 : dégradation de liaison S-dicétone

Il est donc nécessaire de prévoir dès leur conception la biodégradabilité des matériaux.

## I] Précurseurs d'un matériau dégradé par une enzyme

### I]1) Stratégie :

Deux mécanismes de dégradation [223] pourraient être utilisés dans notre cas. Le premier est basé sur l'hydrolyse des liaisons ester en présence d'eau. Ce type de dégradation concerne des polymères tels que les polylactiques, polycaprolactones, polyesters, (chapitre bibliographique, II]4)) ... Le deuxième type de dégradation est de type enzymatique. L'enzyme reconnaît des sites spécifiques du polymère et catalyse leur hydrolyse, conduisant à terme à la dégradation du matériau par coupure de chaînes. L'ensemble des biomacromolécules d'origine naturelles dont le collagène, la fibrine, la chitine sont soumis à ce type de dégradation.

Dans cette étude, la dégradation enzymatique a été privilégiée. En effet, lors de la cicatrisation, de nombreuses protéases sont excrétées et jouent un rôle actif dans la cicatrisation (MMP 1, 2, ...). Conférer au réseau de polymère synthétique la possibilité d'être dégradé par ces enzymes, permettra de faire évoluer le matériau en fonction de l'état de cicatrisation de la plaie. Afin de rendre les matériaux sensibles aux enzymes de dégradation, la stratégie développée a consisté à copolymériser le PVAm avec une proportion suffisante d'un réticulant hydrolysable par voie enzymatique (Figure 66). L'introduction du réticulant hydrolysable devrait permettre, sous l'action d'une protéase, soit d'affaiblir le réseau polymère (Diminution critique des propriétés mécaniques), soit de conduire à une dégradation complète du matériau (solubilisation du réseau). Au même titre que le PVAm le réticulant hydrolysable doit être photoréticulable et contenir un ou plusieurs sites de coupure pour des hydrolases.

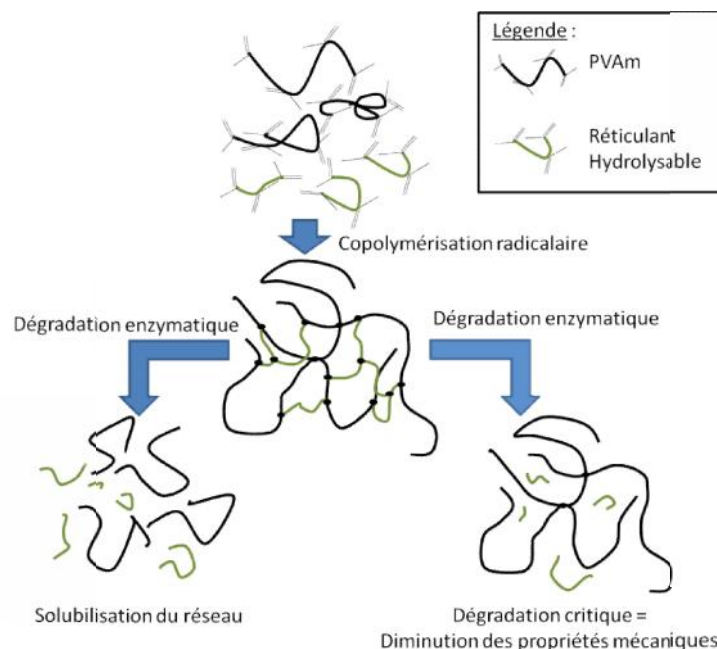


Figure 66 : Schéma de la formation et de la dégradation enzymatique du réseau de polymère partenaire du gel de fibrine

La stratégie la plus courante pour obtenir un composé hydrolysable est de faire produire des peptides à façon, soit par des organismes modifiés, soit par synthèse sur résine. Ces peptides sont ensuite fonctionnalisés avec des fonctions polymérisables (vinyle, acrylate, méthacrylate) grâce à des agents de couplage du type succinimidyle ou glycidyle. Cependant, le prix de revient et les faibles quantités produites de ce type de monomères, les rendent difficilement utilisables pour une

production de matériaux à grande échelle. Une alternative est d'obtenir des peptides à partir d'une protéine facile à purifier, présente en abondance et de coût faible, et de le fonctionnaliser avec des groupements polymérisables. La protéine choisie sera préalablement digérée par la trypsine.

Pour rappel, la trypsine est une sérine protéase produite sous forme inactive par le pancréas et relarguée dans l'intestin. Physiologiquement, cette enzyme de 24 kDa participe à la digestion. Elle possède une activité endoprotéasique et hydrolyse les liaisons peptidiques impliquant les lysines et des arginines après leur groupement carbonyle. Cette activité hydrolytique permet d'obtenir des peptides présentant, soit des arginines, soit des lysines en carbone terminal (Cter). Cependant, l'utilisation de la trypsine est problématique du fait d'un contaminant récurrent lors de sa purification : la chymotrypsine. Cette enzyme est également une protéase qui a comme cible les acides aminés aromatiques (tyrosine, tryptophane, phénylalanine). Cette hydrolyse a lieu également en aval des résidus reconnus. Pour éviter que ce contaminant hydrolyse la protéine en même temps que la trypsine, la solution de protéase est traitée à l'aide de TPCK qui inhibe de manière irréversible et spécifique l'activité de la chymotrypsine. La trypsine-TPCK permet d'hydrolyser la protéine uniquement après les arginines et les lysines.

Les conditions de mesure de l'activité de l'enzyme et le rapport enzyme/substrat à utiliser ont tout d'abord été déterminées. Les peptides obtenus ont ensuite été fonctionnalisés avec une fonction méthacrylate via un greffage EDC/NHS. Ainsi, tous les peptides présentant des résidus lysine en extrémité Cter auront des fonctions méthacrylate sur le N-terminal (Nter) et sur le NH<sub>2</sub> de la chaîne latérale des lysines en Cter. L'efficacité de ce type de peptide en tant que réticulant hydrolysable, sera comparée à celle de la protéine entière fonctionnalisée selon le même protocole.

## **I]2) Précurseur protéique : le lysozyme :**

### ***I]2)1. Choix de synthèse***

La première protéine choisie a été le lysozyme. Cette petite protéine de 14,3 kDa est très bien caractérisée et peut être facilement purifiée. De plus, elle est connue pour avoir une activité bactéricide et son utilisation en santé humaine est déjà approuvée par la FDA.

Une prévision *in silico* a montré qu'après hydrolyse par la trypsine, les fragments protéiques obtenus comprendraient entre 1 et 23 résidus correspondant à une masse molaire maximum de 2,23 kDa. Or, à des masses si faibles, la purification des fragments par dialyse (membrane MW 1kDa) ne permettrait pas de récupérer suffisamment de peptides. Afin d'obtenir des peptides de plus grande masse, les arginines ont été préalablement protégées pour limiter l'hydrolyse de la protéine en aval des lysines. Seuls des peptides téléchéiques de 1 à 63 acides aminés devraient être obtenus et ceux de 25, 39 et 63 acides aminés, correspondant respectivement à des poids moléculaires de 2,6 kDa, 4,4 kDa et 6,9kDa, seraient purifiés.

Les arginines peuvent être protégées par voies enzymatique ou chimique.

- La voie enzymatique : la peptidylarginine déiminase [<sup>224</sup>] convertit l'arginine en citruline ce qui bloque la reconnaissance et l'action enzymatique de la trypsine. Toutefois cette enzyme est chère et semble peu adaptée à une utilisation pour une production massive, mais avant tout, la modification de l'arginine en citruline est irréversible.

- La voie chimique : Le 1,2 cyclohexanedione [<sup>225,226</sup>](CHD), le phenylglyoxal [<sup>227</sup>] ou encore le butanedione [<sup>228</sup>] transforme l'arginine en une espèce non chargée ce qui empêche la reconnaissance de l'arginine par la trypsine. Ainsi, le 1,2 cyclohexanedione transforme l'arginine en DHCH-arginine (Figure 67A). De plus, cette réaction est réversible lorsqu'une forte concentration d'amine libre (tampon Tris, triéthanolamine, ...) est introduite à pH 7 (Figure 67B). Le cyclohexanedione réagit préférentiellement avec l'arginine, mais peut réagir également avec la lysine. Cependant cette dernière réaction se produit après la consommation des arginines et peut être suivie par spectrophotométrie (Absorbance à 440 nm).

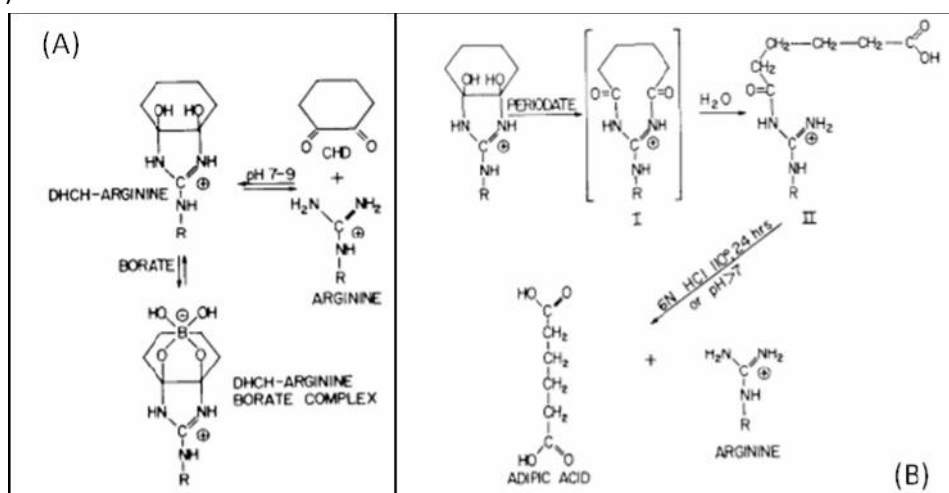


Figure 67 : Mécanisme de protection (A) et de déprotection (B) des arginines par le CHD

Du fait de sa réversibilité, la voie chimique avec le CHD a été privilégiée.

## 1]2)2. Protection des arginines par le CHD

Le lysozyme est solubilisé à 4% (w/m) dans du tampon borate pendant 24h à 37°C. Le CHD est ensuite solubilisé à différentes concentrations (5.6, 2.8, 1.4 molécule de CHD par arginine) dans du tampon borate puis introduit goutte à goutte dans la solution de protéine. Le mélange est incubé à 40°C entre 30 min et 24h. La concentration en CHD et le temps d'incubation ont été optimisés afin de protéger le maximum d'arginines tout en modifiant le minimum de lysines.

La modification des lysines est suivie par un dosage spectrophotométrique car le produit de réaction coloré absorbe à 440 nm. Le pourcentage de lysines modifiées est calculé comme le rapport entre l'absorbance mesurée au temps  $t$  et l'absorbance mesurée après 24h d'incubation pour la plus haute proportion en CHD, condition où la modification est supposée totale.

$$\% \text{ lysines modifiées} = \frac{Abs(440nm)}{Abs(440nm)_{max}} \times 100$$

La protection des arginines n'induit pas de variation de coloration. Les arginines non protégées ont donc été marquées avec la phénanthrènequinone, composé fluorescent se fixant spécifiquement sur cet acide aminé. Une fois fixé à l'arginine, il est excité à 312nm et émet une fluorescence à 395nm. Le pourcentage d'arginines modifiées est calculé comme suit :

$$\% \text{ arginines protégées} = \left(1 - \frac{Fluo395nm(t)}{Fluo395nm(t_0)}\right) \times 100$$



Où Fluo395nm (t) est la fluorescence après un temps d'incubation et Fluo395nm (t<sub>0</sub>) est la fluorescence d'une solution de lysozyme (temps d'incubation = 0). La modification a été suivie pour différentes concentrations de CHD. L'évolution après 2 h 30 étant négligeable, seul le début des courbes est représenté sur la Figure 68.

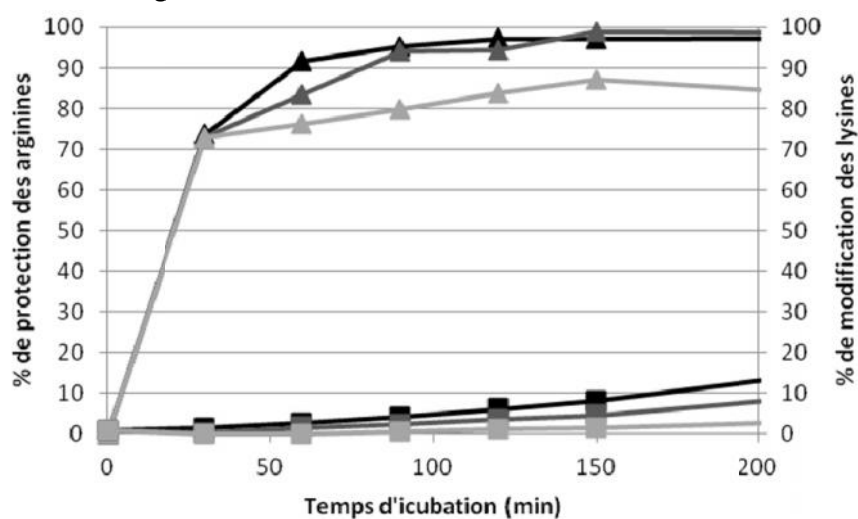


Figure 68 : Suivi de modification des arginines ( ▲ ) et des lysines ( ■ ) du lysozyme à des proportions de 5,6 ( ■ ), 2,8 ( ■ ) et 1,4 ( ■ ) molécules de CHD par arginine .T=40°C

Quelle que soit la proportion en CHD, la protection des arginines est rapide puisque 70% d'entre elles sont protégées après seulement 30 min. La réaction devient très lente après 90 min. Parallèlement, la modification de la lysine est lente puisqu'en fonction de la proportion de CHD introduit, seulement 0,5 à 4,3 % des lysines sont modifiées après 90 min. Les pourcentages de résidus arginine et lysine modifiés après 90 min sont rassemblés dans le Tableau 40 :

Proportion de CHD/arginine	5,6	2,8	1,4
% modification des lysines	4	2	1
% protection des arginines	95	95	80

Tableau 40 : Pourcentage de résidus arginine et lysine du lysozyme modifiés après 90 min d'incubation en fonction de la proportion de CHD

Ces résultats montrent qu'une proportion en CHD d'environ 2,8 CHD pour une arginine permet d'obtenir après 90 min de réaction une protection élevée des arginines (95%) pour un minimum de lysines modifiés (2%).

Cependant cette protection conduit à une agrégation de la protéine. Cette agrégation est réversible en présence d'agents chaotropiques (8M d'urée), mais réapparaît dès le dessalage de la solution de protéine protégée. Elle est vraisemblablement due à la neutralisation des amines primaires des arginines qui diminue la solubilité de la protéine dans le tampon utilisé. Suite à cette étude, la synthèse d'un réticulant hydrolysable à partir du lysozyme s'est avéré inadapté, la protéine modifiée ne pouvant pas être solubilisée à une concentration suffisante. Une autre protéine, comportant davantage d'acides aminés a donc été testée. L'albumine de sérum a été choisie pour sa purification facile, l'absence d'interaction avec la fibrine et le fait que la protéine peut être d'origine autologue. Dans la suite de cette étude, une protéine d'origine bovine (BSA) est utilisée.

### I]3) Précurseur protéique : la BSA :

La BSA est une protéine synthétisée par le foie, circulant dans le flux sanguin. Son poids moléculaire est de 66 kDa. Elle est liée à des mécanismes du métabolisme comme le maintien de la pression osmotique et le transport d'hormones non hydrosolubles ou d'acide gras.

Une simulation *in silico* a permis de déterminer qu'une hydrolyse totale de la BSA par la trypsine permettrait de produire environ 21 peptides de masses comprises entre 1 et 3,7 kDa, pouvant être purifiés par dialyse (membrane de MW 1kDa). Si les arginines de la BSA sont préalablement protégées par le CHD, environ 20 peptides de masses comprises entre 1 et 7,8 kDa seraient obtenus. Ces peptides permettraient de synthétiser ensuite des polymères téléchéiques ce qui n'est pas le cas lorsqu'il y a hydrolyse complète de la protéine. Ainsi, l'hydrolyse complète de la BSA par la trypsine et l'hydrolyse après protection au CHD conduit à des peptides de tailles et de répartitions différentes. Les fonctionnalisations de la protéine entière et de la BSA hydrolysée complètement ou modérément ont donc été testées.

#### I]3)1. Protection des arginines de la BSA par le CHD

La protection des arginines de la BSA a été étudiée de la même manière que celle du lysozyme. La BSA est solubilisée dans du tampon borate à une concentration de 4% (w/v) pendant 2h à 37°C. Du CHD est ensuite solubilisé dans ce tampon, puis la solution est introduite goutte à goutte dans la solution de protéine. L'incubation est réalisée à 40°C. La proportion de CHD et le temps d'incubation sont optimisés par le suivi au cours du temps de la modification des lysines par spectrophotométrie et de la protection des arginines par fluorimétrie (Figure 69).

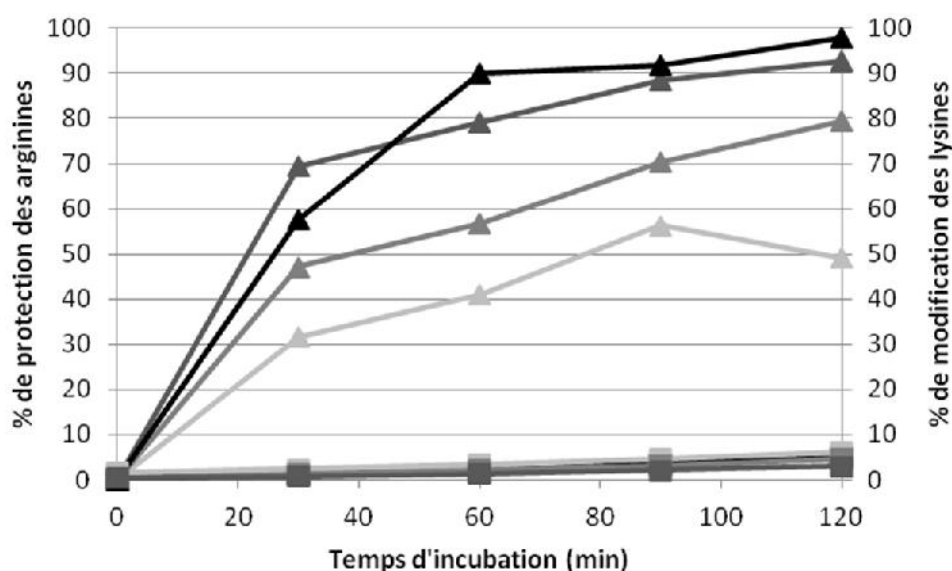


Figure 69 : Suivi de modification des arginines (▲) et des lysines (■) de l'albumine de sérum bovin à des proportions de 0,5 (■), 1 (■) et 1,5 (■) et 2 (■) molécules de CHD par arginine. T=40°C

Comme avec le lysozyme, la protection des arginines est très rapide. En effet, de 30 à 70% des arginines sont protégées après 30 min d'incubation pour, respectivement, une proportion de 0,5

à 2 molécules de CHD par arginine. Après 90 min, la réaction de protection évolue très lentement. Parallèlement, la modification des lysines est beaucoup plus lente en raison de la sélectivité du CHD. En effet, après 90 min, seulement environ 6% des lysines sont modifiées pour la plus forte proportion en CHD introduit, soit environ 2 lysines par protéine. Un temps d'incubation de 90 min à 40°C apparaît donc comme le meilleur compromis, puisque, au-delà de ce temps, la modification concerne essentiellement les lysines.

Les différentes valeurs de protection des arginines et des lysines sont reportées dans le tableau suivant en fonction de la proportion de CHD introduite et après 90 min d'incubation :

Proportion de CHD/arginine	2	1,5	1	0,5
% arginine protégé	92	89	70	56
% lysines modifiées	5	3	5	6

**Tableau 41: Pourcentage de modification des arginines et des lysines de la BSA après 90 min de réaction avec la CHD à différentes concentrations à 40°C**

Il en ressort qu'une proportion de 1,5 molécule de CHD par arginine permet d'obtenir après 90 min de réaction 89% d'arginines protégées (soit moins de 3 arginines non protégées par BSA), pour un minimum (3%) de lysines modifiées (soit environ 1 lysine par protéine).

### ***1)3)2. Hydrolyse de la BSA par la trypsine***

Comme mentionné précédemment (1)1), la trypsine a été choisie car elle hydrolyse les protéines après le groupement carbonyle des lysines. Après fonctionnalisation des amines libres, nous obtiendrons soit des peptides fonctionnalisés sur l'extrémité Nter pour les peptides finissant par les arginines, soit des polymères téléchéliques pour les peptides terminant par des lysines.

Le but de la protéolyse est de produire des peptides de différentes tailles, soit après hydrolyse complète de la protéine (BSA non protégée par le CHD), soit après une hydrolyse ménagée (protection préalable des arginines). Toutefois, pour que cette protection soit stable, il est nécessaire de réaliser l'hydrolyse en tampon borate. D'autre part, pour limiter l'autolyse de la trypsine, il est nécessaire que le tampon comporte son cofacteur, le  $\text{CaCl}_2$ , à une concentration de 20 mM, car, sans ce cofacteur, l'hydrolyse de la trypsine n'a pas lieu. Enfin, l'activité hydrolytique de la trypsine est optimale dans une gamme de pH compris entre 7 et 9. Or il n'est pas possible de préparer un tampon borate contenant 20mM de  $\text{CaCl}_2$  à un pH au-delà de 8 car un précipité de borate de calcium apparaît. Ainsi, la solution de BSA dont les arginines ont été protégées, est dialysée pendant 3 jours contre du tampon borate 250 mM pH 7,4 contenant 20 mM de  $\text{CaCl}_2$  afin d'obtenir des conditions propices à l'action à venir de l'enzyme et éliminer le CHD n'ayant pas réagi. Les réactions d'hydrolyse enzymatiques ont été réalisées pendant 72h à 37°C.

### I]3)2.A Rapport de concentration enzyme / substrat protéique

La trypsine est généralement employée en proportion massique comprise entre 1 : 100 et 1 :20 (w/w) par rapport au peptide. Afin de déterminer la concentration optimale, des hydrolyses enzymatiques sur la BSA ont été réalisées à différentes proportions massiques : 1 :100, 1 :80, 1 :60, 1 :50, 1 :40, 1 :30, 1 :20, 1 :10 (soit 25.8, 32.2, 42.9, 51.5, 64.4, 85.8, 128.9 et 257.8 U/mg de BSA).

La première information obtenue est visuelle : la turbidité de la solution après 72h d'incubation augmente avec la concentration de l'enzyme au point qu'une sédimentation importante apparaît pour une proportion de 1 :10. Cela est dû à l'hydrolyse poussée de la BSA par la trypsine. Il est vraisemblable que les peptides obtenus alors deviennent insolubles. En effet, en cas d'hydrolyse totale de la BSA, 25% en masse des peptides obtenus ont un indice de GRAVY supérieur à 0 et sont donc hydrophobes [229]. Il est probable que ces peptides s'agrègent entraînant une augmentation de la turbidité avec la concentration en protéase. A forte concentration de trypsine, ces agrégats sont suffisamment importants pour sédimenter rapidement. Comme ces agrégats ne pourront pas être utilisés en solution lors de la synthèse des matériaux, le rapports enzyme/substrat de 1 :10 a donc été éliminé.

Les solutions de peptides obtenues sont ensuite caractérisées par électrophorèse (Figure 70).

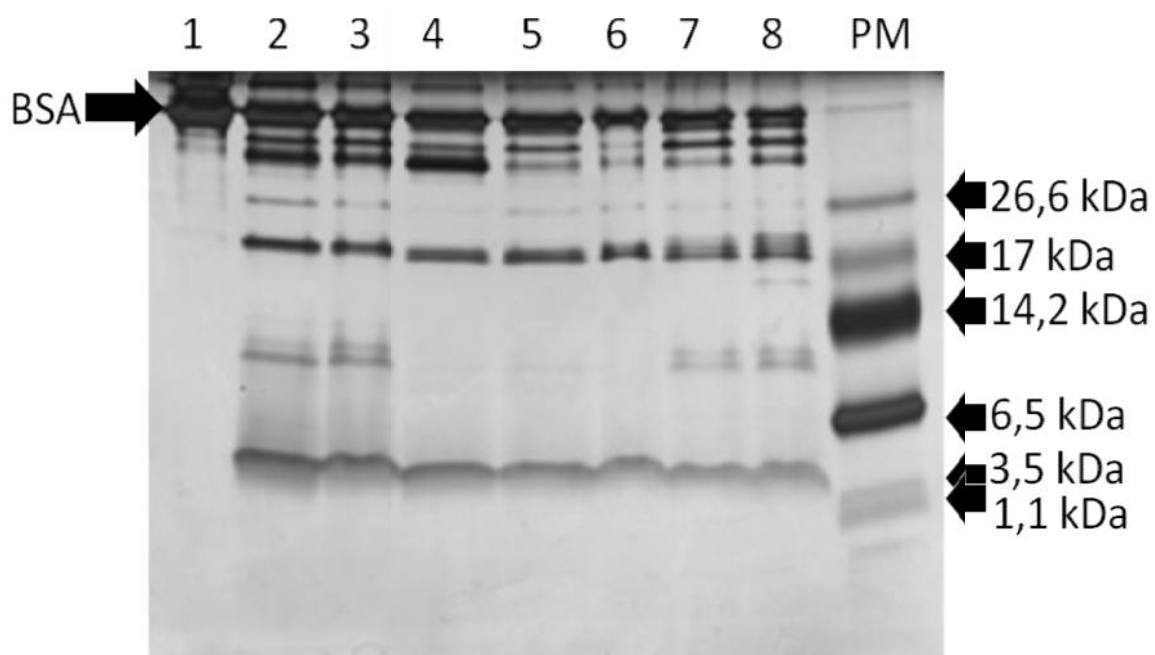


Figure 70 : Gel d'électrophorèse de polyacrylamide à 16,5% de la BSA (1), et d'hydrolysats de BSA (72h à 37°C) obtenus avec des proportions massiques Trypsine/BSA : 1:100 (2), 1:80 (3), 1:60 (4), 1:50 (5), 1/40 (6), 1:30 (7), 1:20 (8). Migration 1h sous 80 V. Révélation au nitrate d'argent

Les répartitions des peptides obtenus sont comparées en fonction des rapports protéase/protéine utilisés. Par rapport à la BSA qui a subi le même temps d'incubation, 1% de trypsine suffit pour débiter une hydrolyse puisque des bandes correspondant à des masses molaires plus faibles apparaissent quelle que soit la proportion de trypsine utilisée. Ces bandes correspondent à des masses d'environ 43, 37, 19 kDa et un smir vers 4 kDa. L'intensité de la bande de BSA non digérée diminue lorsque la proportion de trypsine augmente ce qui traduit l'augmentation de

l'activité protéolytique. Avec la concentration d'enzyme la plus élevée (1:20), les peptides obtenus présentent des poids moléculaires d'environ 49, 43, 37, 26, 21, 20, 18, 16, 11, 10 kDa et le smir autour de 4.5 kDa. Afin d'avoir un maximum de petits peptides, cette proportion en trypsine de 1 :20 a été choisie pour la suite.

### I]3)2.B Durée de l'hydrolyse

Afin d'optimiser le temps d'incubation, une solution de BSA à 4% dans dutampon borate pH 7,4 et 20mM de CaCl<sub>2</sub> contenant une proportion massique de trypsine de 1 :20 a été maintenue à 37°C pendant 24, 48 et 72h.

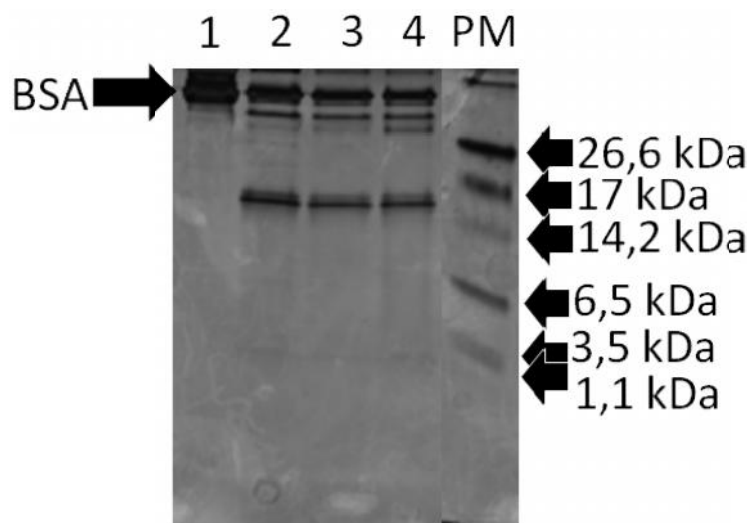


Figure 71 : Evolution de l'hydrolyse de la BSA à 37°C en fonction du temps : 0 (1), 24 (2), 48 (3) et 72h (4) par l'action de la trypsine à une proportion massique de 1:20. Migration 1h sous 80 V. Révélation du gel au nitrate d'argent.

De nouvelles bandes peptidiques apparaissent dès 24h d'incubation. L'évolution continue à 48h tout en montrant la même répartition des peptides. Entre 48 et 72h, les bandes de la BSA et des peptides issus de la digestion évoluent peu, indiquant que la réaction enzymatique est terminée. Ainsi l'ensemble des sites de coupure facilement accessibles ont été reconnus par l'enzyme. Le temps de 72h a été choisi pour la réaction enzymatique d'hydrolyse afin de garantir une hydrolyse totale de la protéine.

### I]3)3. Préparation des peptides polymérisables

A partir de ces différents résultats, 3 précurseurs de réticulants hydrolysables ont été synthétisés comme résumé dans la Figure 72.

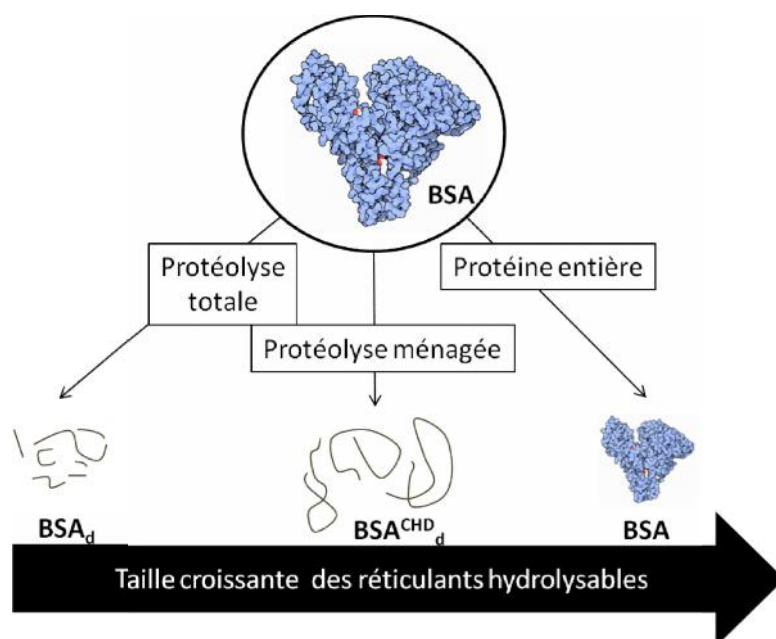


Figure 72 : Résumé des précurseurs hydrolysables synthétisés

La BSA<sup>CHD</sup> et la BSA sont hydrolysées par la trypsine à 37°C pendant 72h. Les solutions sont dialysées 24h (membrane 1 kDa) contre un tampon borate pH 7,4 afin d'éliminer les peptides de petite taille et de stopper la réaction enzymatique en déstabilisant la trypsine par l'absence de CaCl<sub>2</sub>. Une fois dialysées, les solutions de peptides restent turbides. Comme avancé précédemment, il est probable que cette turbidité soit associée à la formation d'agrégats de peptides dont la solubilité dans le tampon est plus faible que celle de la protéine native. La turbidité est particulièrement prononcée dans le cas de la digestion de BSA non protégée. Afin d'éliminer ces agrégats, la solution est filtrée au Büchner avec une porosité de 0,45 µm, puis de 0,22 µm. A la suite de cette filtration, la solution obtenue est translucide et un important dépôt visqueux est récupéré dans le Büchner. Les solutions sont ensuite stockées à -20°C avant fonctionnalisation des peptides par le méthacrylate de N-succinimidyle ester.

#### ***1|3)4. Fonctionnalisation des peptides***

La fonctionnalisation des peptides obtenus ou de la BSA a été réalisée sur les amines des Nter et de la chaîne latérale des lysines. L'objectif de cette fonctionnalisation est de greffer des fonctions polymérisables par voie radicalaire. Afin de limiter par la suite, la différence de réactivité entre le PVAm et le réticulant hydrolysable, le groupement méthacrylate a été privilégié. Le N-succinimidyle ester méthacrylate (NHS-m) (Figure 73) a été choisi comme molécule de greffage car il contient à la fois d'une fonction succinimidyle, pour réagir sur les amines de la protéine, mais aussi une fonction méthacrylate qui sera ensuite copolymérisée avec celles du PVAm.

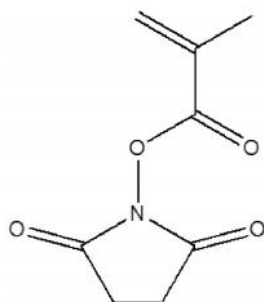


Figure 73 : formule chimique du méthacrylate de N-succinimidyle ester (NHS-m)

Les peptides ( $BSA_d$  ou  $BSA^{CHD}_d$ ) ou la BSA entière sont solubilisés à 4% (w/v) dans du tampon borate. 0.7 mol / lysine de NHS-m (solution à  $6,4 \times 10^{-1}$  mol/L dans l'acétone) sont introduites goutte à goutte. Cette proportion molaire entre le NHS-m et les lysines a été déterminée à partir d'une simulation *in silico*. Le greffage est réalisé pendant 24h à température ambiante.

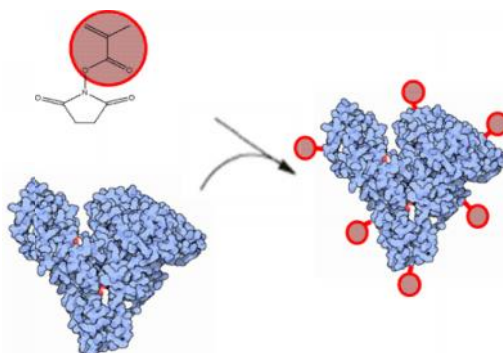


Figure 74 : schéma de réaction entre le NHS-m et la BSA.

Les solutions de protéine ne changent pas d'aspect indiquant que l'ajout d'acétone ne provoque pas d'agrégation protéique. Les solutions de peptides et protéines fonctionnalisés ont ensuite été dialysées 3 jours contre du tampon Tris. Cette dialyse permet d'éliminer le NHS-m qui n'aurait pas réagi, mais aussi de déprotéger les arginines car le CHD est complexé par les amines libres du tampon Tris. De plus, il faut éliminer le borate du tampon car il risque de précipiter en présence du calcium qui sera nécessaire à l'action de la thrombine. Afin de stocker les peptides modifiés sur le long terme, les solutions ont été lyophilisées.

Les peptides fonctionnalisés, c'est-à-dire les réticulants hydrolysables, seront dorénavant intitulés BSAm,  $BSA_d m$  et  $BSA^{CHD}_d m$  selon qu'ils sont synthétisés à partir de précurseurs issus respectivement de l'hydrolyse de la BSA,  $BSA_d$  et  $BSA^{CHD}_d$ . Les rendements de synthèse de ces peptides modifiés ont été calculés (Tableau 42). Pour cela, il est nécessaire de retrancher à la masse obtenue après lyophilisation, la masse des sels de Tris présents dans le tampon.

peptides modifiés	BSAm	$BSA_d m$	$BSA^{CHD}_d m$
Rendement	91%	25%	53%

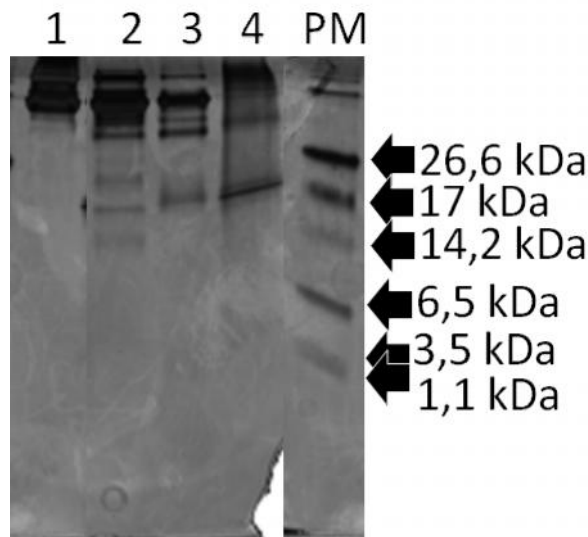
Tableau 42 : Rendement des réactions d'hydrolyse et fonctionnalisation pour la production de réticulants hydrolysables

Les rendements de la réaction sont affectés par les différents traitements. Ceci est vraisemblablement dû à la filtration de la solution de peptides après hydrolyse. En effet, une partie des peptides doit être retenue dans le dépôt visqueux retenu par le filtre provoquant une perte

importante dans la masse de peptides produits. Il est à noter que ce dépôt est plus important dans le cas de la BSA<sub>d</sub> que dans le cas de la BSA<sup>CHD</sup><sub>d</sub>, ce qui est cohérent avec les rendements calculés.

### ***1)3)5. Caractérisation des réticulants hydrolysables :***

Les trois réticulants ont été solubilisés à 20% (w/v) dans du tampon Tris pendant 2h à 37°C. Il est à noter que les sels du tampon Tris sont présents dans les peptides lyophilisés. Nous avons tenu compte de la présence de ces sels pour réaliser la solution à la concentration voulue et avons vérifié par un dosage de Bradford que ces concentrations de réticulant sont exactes. Afin de connaître la répartition massique des réticulants, ces solutions ont été analysées par électrophorèse (Figure 75).



**Figure 75 : Distribution massique des réticulants BSA<sub>m</sub> (2), BSA<sup>CHD</sup><sub>m</sub> (3) et BSACHDdm (4) issus de la BSA (1) visualisés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide à 16,5%. Révélation du gel au nitrate d'argent**

La comparaison des bandes entre la BSA et ses versions modifiées (BSA<sub>m</sub>, BSA<sub>d</sub>m et BSA<sup>CHD</sup><sub>d</sub>m) montre que l'hydrolyse (quand elle a eu lieu) conduit bien à des fragments de masse égale ou inférieure à celle de la BSA non modifiée. La fonctionnalisation de la BSA n'a donc pas engendré de réticulation entre les protéines fonctionnalisées. Enfin, la protection des arginines de la protéine avant sa digestion a fortement perturbé son schéma d'hydrolyse par la trypsine. Ainsi, les masses des peptides modifiés sont beaucoup plus dispersées que celles des peptides après hydrolyse (Figure 71) car les bandes sont réparties en smir de 66 à 8 kDa.

Comme l'hydrolyse totale ou ménagée de la BSA n'est pas conforme à la simulation théorique, il n'est pas possible de déterminer la proportion exacte de méthacrylate greffé pour la BSA<sub>d</sub>m et la BSA<sup>CHD</sup><sub>d</sub>m. Cependant, il est possible d'obtenir une approximation de l'efficacité de greffage dans le cas de la BSA<sub>m</sub> en réalisant un dosage au TNBS des amines libres présentes sur la protéine avant et après modification. Pour cela, des solutions de BSA et de BSA<sub>m</sub> ont été préparées dans un tampon borate à des concentrations variant de 0.1 à 2 mg.mL<sup>-1</sup>. Les dosages des amines libres de ces différentes solutions sont rassemblés sur la Figure 76.



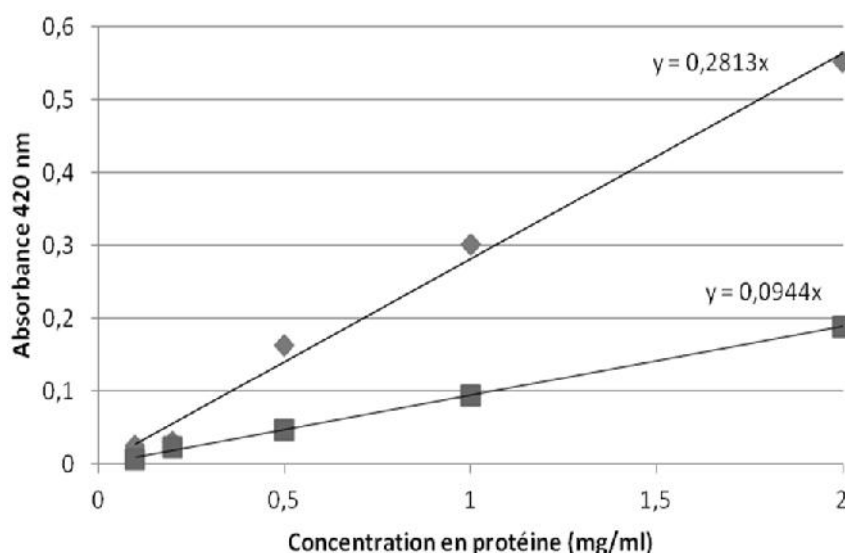


Figure 76 : Absorbance à 420 nm d'une gamme de BSA (♦) et de BSAm (■) après un test au TNBS

Les courbes de dosage au TNBS de la BSA et de la BSAm sont différentes ce qui tend à prouver qu'il y a bien eu un greffage de fonctions méthacrylate sur la protéine. La proportion des amines libres entre la BSA et la BSAm est déduite expérimentalement du rapport des pentes des deux droites obtenues. Ainsi, environ 66% des fonctions amine de la BSA sont modifiées par des fonctions méthacrylate dans la BSAm.

### **1]3)6. Synthèse d'hydrogel de peptides modifiés :**

La façon la plus simple pour vérifier que la modification a été efficace pour les différents peptides (BSA<sub>d</sub>m et BSA<sup>CHD</sup><sub>d</sub>m) et la BSAm, c'est-à-dire qu'ils sont tous porteurs de plusieurs fonctions méthacrylate, est de montrer qu'il est possible de synthétiser par voie radicalaire des hydrogels avec ces différents composés. Pour cela, les précurseurs sont introduits à une concentration de 10% (w/v) dans du tampon de synthèse. La photoréticulation est amorcée avec  $4,2 \times 10^{-2}$  % (w/v) d'Irgacure 2959. Nous avons choisi d'introduire la même concentration de photoamorceur que pour la formation des réseaux simples PVAm(10%), soit une proportion molaire entre les méthacrylate et le photoinitiateur de 3,4%. La solution est placée dans le moule sous U.V pendant 1h à 37°C.

Il est effectivement possible de former un matériau contenant uniquement de la BSAm qui sera ensuite noté RS BSAm(10%). Ce matériau bien qu'auto-supporté est plus fragile que le réseau simple PVAm(10%) (Figure 41 A). L'exposition aux UV d'une solution de BSA<sub>d</sub>m à 10% (w/v) contenant le photoamorceur conduit également à la formation d'un matériau (noté réseau simple BSA<sub>d</sub>m(10%) par la suite). L'hydrogel obtenu, bien qu'auto supporté, est fragile. Par contre, il n'est pas possible, dans les mêmes conditions, de former un matériau à partir de la solution de BSA<sup>CHD</sup><sub>d</sub>m à 10% (w/v). Ceci peut être dû au fait que des CHD résiduels ait pu limiter le greffage des groupements méthacrylate ou que la masse molaire moins élevée des polymères augmente considérablement la conversion au point de gel en rendant la formation d'un amas percolant plus difficile.

En conclusion, trois réticulants hydrolysables ont été synthétisés, l'un est issu de la fonctionnalisation directe de la BSA (BSAm), les autres d'une hydrolyse enzymatique préalable de la BSA avec (BSA<sup>CHD</sup><sub>d</sub>) ou sans (BSA<sub>d</sub>) protection préalable des arginines suivie de la fonctionnalisation. Seuls les polymères BSA<sub>m</sub> et BSA<sub>d</sub><sub>m</sub> permettent de synthétiser des hydrogels à une concentration de 10% (w/v), témoignant de la fonctionnalisation de ces polymères par les groupements méthacrylate. Il est maintenant nécessaire de vérifier qu'il est possible de les inclure dans un matériau en présence de PVAm, puis d'estimer la possibilité de les dégrader par voie enzymatique.

#### I]4) Synthèse de co-réseaux dégradables avec le PVAm

Les composés précédemment synthétisés sont introduits dans le réseau de PVA afin d'inclure des zones qui pourront ultérieurement être dégradées par voie enzymatique. Cette dégradation devrait ensuite entraîner la dégradation globale du réseau PVA. Les conditions de synthèse de ces co-réseaux sont les mêmes que celles employées précédemment pour la synthèse du réseau simple PVAm(10%).

Quel que soit le composé issu de la BSA, les différents matériaux sont synthétisés en introduisant 7%, 5%, 3% (w/v) ou pas de PVAm, tout en conservant une concentration totale massique de 10%. Le réseau simple RS PVAm(10%) (Figure 41 A) est utilisé comme référence. La concentration est d'environ  $5,15 \times 10^{-2}$  mol/L en méthacrylate dans une solution à 10% (w/v) de BSA<sub>m</sub> contre  $4,375 \times 10^{-2}$  mol/L à concentration massique égale de PVAm. Ainsi, les concentrations en groupements méthacrylate peuvent être considérées comme identiques dans les deux cas. L'obtention ou non d'un matériau en (co)polymérisant les différents composés avec le PVAm est résumée dans le Tableau 43.

		Proportion de PVAm (w/v)			
		7%	5%	3%	0%
Réticulant pour complément à 10% (w/v)	BSAm	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	BSA <sup>CHD</sup> <sub>d</sub> <sub>m</sub>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>
	BSA <sub>d</sub> <sub>m</sub>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>

Tableau 43 : Récapitulatif de la formation de matériaux en fonction du réticulant et de sa proportion.  : formation ou  non d'un matériau.

En présence de PVAm, il est possible d'avoir des matériaux autosupportés dans tous les cas et dans toutes les proportions. Lors de leur manipulation, ils présentent tous un comportement comparable à celui du réseau simple PVAm(10%). Ainsi, l'introduction de composés d'origine protéique ne diminue pas la tenue du matériau. Il est à noter que pour une faible concentration de PVAm, (3% (w/v)), un matériau se forme alors que cela n'était pas possible en absence de réticulant hydrolysable.

Afin de vérifier que la copolymérisation avait bien lieu, c'est-à-dire que les deux composés sont bien liés de façon covalente l'un à l'autre, les matériaux contenant de la BSA<sub>m</sub> ont été colorés au bleu de Coomassie. Pour cela, ils sont plongés après synthèse pendant 24h dans du tampon Tris avant d'être colorés pendant 90 min au bleu de Coomassie 2,5 % (w/v). L'excédent de coloration est

ensuite éliminé par rinçages successifs dans une solution d'éthanol 20% (v/v) et d'acide acétique 10% (v/v) jusqu'à ce que cette dernière reste incolore (Figure 77).











		Proportion de PVAm (w/v)				
		10%	7%	5%	3%	0%
BSAm (complément à 10% (w/v))	Sortie de synthèse					
	coloration au bleu de Coomassie					

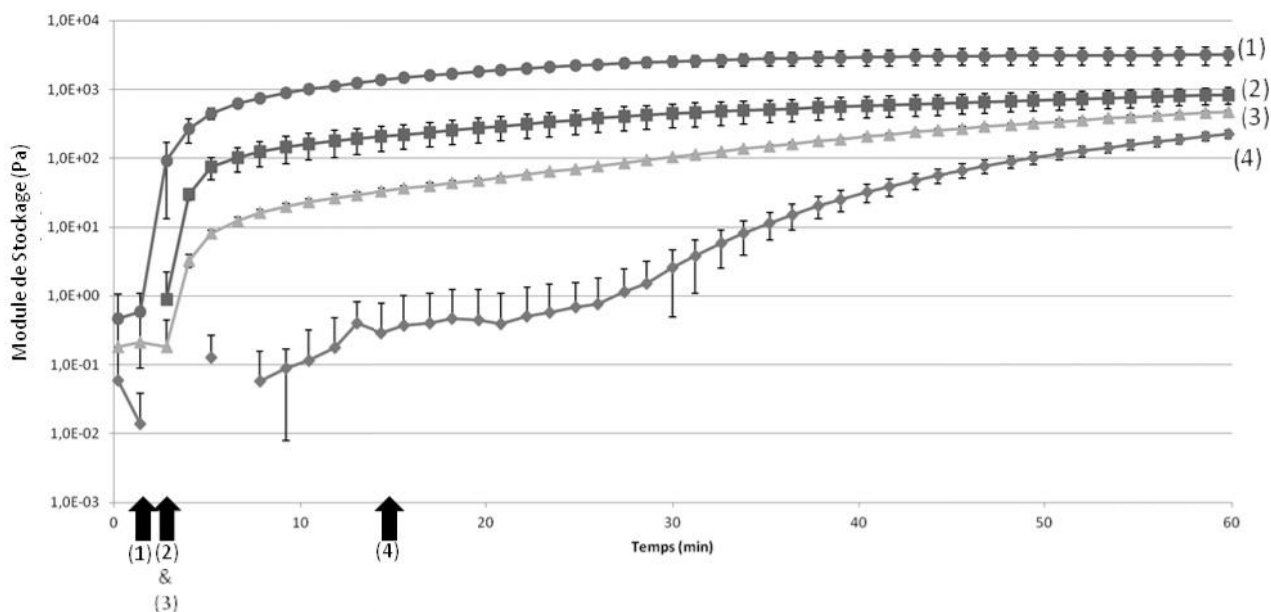
Figure 77 : Comparaison des coréseaux PVAmcoBSAm et des réseaux simples PVAm(10%) et BSAm(10%), sortis de synthèse et après coloration au bleu de Coomassie et décoloration .

Si la BSAm n'était pas liée au réseau PVAm, elle pourrait diffuser hors de la matrice au cours du traitement. Cependant la coloration spécifique des protéines par le bleu de Coomassie reste détectable sur tous les matériaux contenant de la BSAm. Cela montre qu'elle est bien liée de façon covalente dans le matériau, soit au réseau PVAm, soit par homopolymérisation. De plus, à des proportions plus élevées de PVAm (5% (w/v)) le matériau ne devrait être que difficilement manipulable alors qu'avec 5% (w/v) de BSAm complémentaire, le matériau obtenu est facilement manipulable. Il est donc plus probable qu'une partie au moins de la BSAm soit réticulée avec le PVAm.

Pour conclure, 3 réticulants hydrolysables fonctionnalisés avec des groupements méthacrylate, différant dans la répartition de leurs masses molaires, ont été testés. Il est possible de les copolymériser avec le PVAm, en différentes proportions, et d'obtenir des matériaux manipulables au même titre que le réseau simple PVAm(10%). Il reste à mettre en évidence le caractère hydrolysable des matériaux obtenus.

### **I]5) Analyse rhéologique des Co-réseaux PVAmcoBSAm**

La formation des réseaux est suivie en enregistrant le module de conservation ( $G'$ ) et le module de perte ( $G''$ ) en fonction du temps d'exposition,  $t=0$  étant le début de l'exposition aux U.V. (Figure 78). Seul le suivi du module  $G'$  a été représenté pour plus de lisibilité.



**Figure 78 : Module de stockage en fonction du temps du (1) réseau simple PVAm (10%), (2) co-réseau PVAm(5%)coBSAm(5%), (3) co-réseau PVAm(3%)coBSAm(7%), et (4) réseau simple BSAm (10%). Les flèches représentent les temps de gel associés aux différents matériaux**

Lors de la réticulation des matériaux, le point de gel est déterminé par l'intersection entre la courbe du module de stockage et celle du module de perte. Le point de gel du réseau simple PVAm(10%) est atteint après 2 min d'exposition et un plateau est atteint après 30 min (Figure 42). Par contre, le point de gel du réseau simple BSAm(10%) est atteint après 15 min et son module de stockage augmente pendant 60 min. Par contre, les temps de gel des co-réseaux PVAmcoBSAm évoluent peu (de l'ordre de 3 min) quelle que soit la proportion de PVAm ou de BSAm. Cependant, le module du co-réseau PVAm(5%)coBSAm(5%) est stable après 50 min alors que celui du coréseau PVAm(3%)coBSAm(7%) n'est toujours pas à l'équilibre après 60 min. La comparaison des courbes enregistrées sur le réseau simple PVAm(5%) (Figure 42) et du coréseau PVAm(5%)coBSAm(5%) montre que la présence de la BSAm ne ralentit pas la gélification, mais retarde la stabilisation du module  $G'$ . De plus les valeurs des modules de stockage sont 4,5 fois supérieures en présence de la BSAm. Il y a bien vraisemblablement co-réticulation en les deux composés car les valeurs des modules au plateau sont proportionnelles aux compositions massiques des réseaux simples.

Après 60 min d'exposition aux U.V, le module de conservation du réseau simple BSAm(10%) est de 220 Pa ce qui est en accord avec son caractère autosupporté, mais fragile. Le remplacement de seulement 3% de BSAm par du PVAm permet de doubler le module (470 Pa). Lorsque 5% de BSAm sont remplacés par le PVAm, le module est quasiment multiplié par 4 (830 Pa).

## **I]6) Dégradation des matériaux**

Afin de vérifier que ces matériaux peuvent être dégradés par une enzyme, ils ont été tous immergés à 37°C dans une solution de tampon Tris contenant 0,02% (w/v) de  $\text{NaN}_3$  et de la thermolysine à 20 U.mL<sup>-1</sup>. La thermolysine est une protéase présentant une activité hydrolytique en amont des acides aminés hydrophobes à chaîne latérale volumineuse. La dégradation des matériaux

est constatée, ou pas, après 24h d'incubation. Il a été vérifié que la dégradation n'évolue plus jusqu'après 2 semaines d'incubation. Nous avons vérifié, au préalable, qu'aucune dégradation n'est observée lorsque les matériaux sont immergés dans une solution tampon Tris en absence de thermolysine, ainsi que sur le réseau simple PVAm(10%) en présence de thermolysine. Ainsi, lorsqu'elle a lieu, la dégradation est bien spécifique de l'action de la thermolysine sur des groupements de la BSA.

Les résultats de la dégradation des matériaux ont été regroupés dans le Tableau 44.

		Proportion de PVAm (w/v)			
		7%	5%	3%	0%
Réticulant pour complément à 10% (w/v)	BSAm	☒	≈	☑	☑
	BSA <sup>CHD</sup> <sub>d</sub> m	☒	☒	☑	-
	BSA <sub>d</sub> m	☒	☒	☑	☑

Tableau 44 : Récapitulatif des dégradations enzymatiques des matériaux en fonction de leur composition. ☒ pas d'altération visible, ≈ dégradation partielle, ☑ solubilisation totale du matériau.

Lorsqu'elle est observée, la dégradation est soit complète (solubilisation du matériau), soit partielle. La dégradation dépend principalement de la proportion massique en PVAm dans le matériau. Ainsi, aucune dégradation enzymatique n'est détectée sur les matériaux contenant une proportion massique de PVAm égale ou supérieure à 7% (w/v) et cela indépendamment du réticulant hydrolysable. Parallèlement, une proportion inférieure ou égale à 3% (w/v) de PVAm permet d'obtenir un réseau hydrolysable par la thermolysine. La dégradation dépend, dans une moindre mesure, de la nature du réticulant hydrolysable. Ainsi, pour la proportion équi-massique en réticulant hydrolysable et PVAm, seule la BSA<sub>m</sub> permet une dégradation partielle du matériau.

Pour conclure, la fonctionnalisation de la BSA permet d'obtenir un réticulant hydrolysable pouvant former un réseau simple à 10% (w/v) par photoréticulation, mais aussi, des co-réseaux avec du PVAm. De plus, la BSA<sub>m</sub> permet d'obtenir un matériau dégradé avec des concentrations massiques de PVAm jusqu'à 5% (w/v), ce qui n'est pas possible avec la BSA<sub>d</sub>m. Cela est peut-être dû au fait que, plus courts, ces segments protéiques sont plus difficilement accessibles par la protéase et donc moins sensibles à la dégradation au sein du réseau polymère.

Parmi les trois réticulants hydrolysables, seule la BSA<sub>m</sub> a été sélectionnée pour la suite du travail. En effet, photopolymérisée seule à 10 % (w/v) ou copolymérisée avec 5% (w/v) de PVAm, des matériaux autosupportés et dégradables sont obtenus.

Enfin, le remplacement de 5% du PVAm par de la BSA<sub>m</sub> permet d'obtenir un matériau dont le module de stockage est multiplié par 4 tout en permettant sa dégradation partielle par voie enzymatique.

L'introduction de BSA<sub>m</sub> permet donc de conférer son caractère biodégradable au matériau et le PVAm permet de maintenir de bonnes propriétés mécaniques. Les rôles des deux précurseurs semblent complémentaires et la synthèse de leur coréseaux permet d'obtenir un matériau avec de

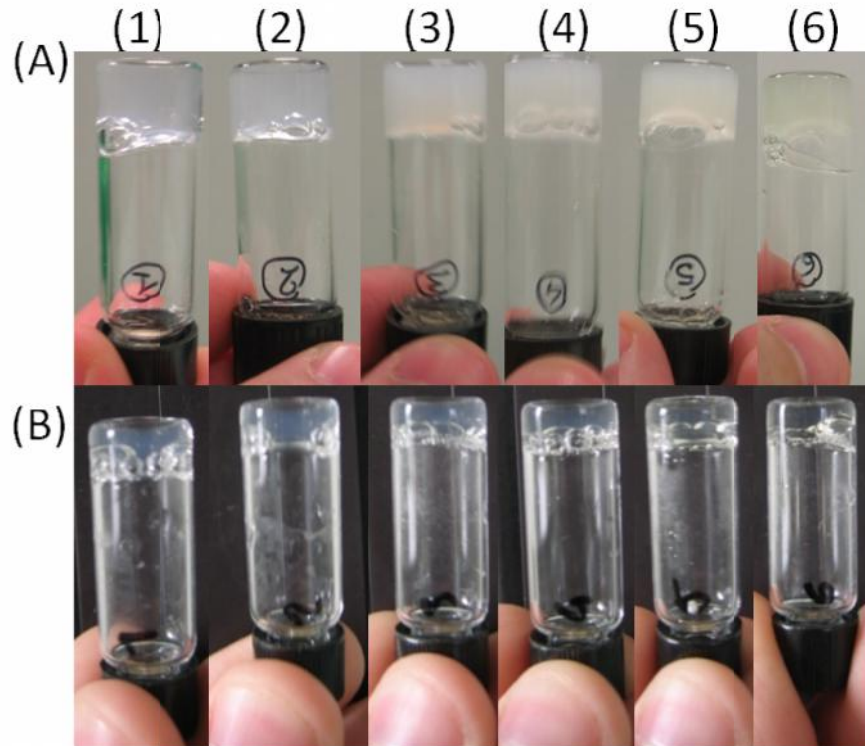
nouvelles propriétés. Pour la suite des études, le coréseau PVAm(5%)coBSAm(5%) et le réseau simple BSAm(10%) (pour comparaison) seront associés à un réseau de fibrine dans des RIP.

## **II] Synthèse de RIP biodégradables**

Ayant montré qu'il est possible de synthétiser des coréseaux à base de PVAm qui sont biodégradable, nous allons étudier dans un premier temps l'impact de leur présence sur la gélification de la fibrine et inversement l'impact du réseau de fibrine sur le réseau de BSAm ou des coréseaux PVAmcoBSAm. La qualité de la réticulation de chacun des réseaux dans différentes formulations sera évaluée. Nous vérifierons ensuite que le réseau de fibrine est réparti dans les RIPs de manière homogène. Enfin les propriétés de réversibilité à la déshydratation seront évaluées par des cycles de séchage et d'hydratation. Pour finir la toxicité de ces matériaux sera testée en suivant l'évolution d'une population cellulaire de lignée de fibroblastes de prépuce humain à leur surface. Cette toxicité sera évaluée par le suivi métabolique des cellules, leurs densités, ainsi que leur morphologie.

### **II]1) Gélification du réseau de fibrine en présence de BSA**

Nous avons vérifié que le réseau de fibrine à la concentration de 0,5% (w/v) pouvait toujours être synthétisé par l'action de la thrombine en présence de différentes concentrations de BSA et de BSAm variant de 1,5 à 10% (w/v) (Figure 79). La BSA et la BSAm sont non réticulés et enchevêtrés dans un réseau réseau de fibrine, il s'agit donc d'architecture de réseaux semi-interpénétrés de polymères (semi-RIP)



**Figure 79 : Gel de Fb (0,5% (w/v)) (1) et semi RIP BSA/Fb (A) et BSAm/Fb (B) contenant (2) 1.5, (3) 3, (4) 5, (5) 7.5 et (6) 10% (w/v) de BSA ou BSAm.**

L'hydrolyse du fibrinogène en fibrine a lieu quelle que soit la concentration en BSA introduite entre 1,5 et 10%. De plus, la formation du réseau de Fb est très rapide car, dès 2 min après l'ajout de la thrombine, un gel est formé dans tous les tubes au lieu de 3 min pour le réseau de fibrine seul. Il est à noter que l'ajout de BSA conduit à un gel plus turbide. Ces augmentations de la vitesse de gélification et de la turbidité ont déjà été observées [230]. La modification de la gélification de la Fb par la BSA ou d'autres protéines plasmatiques a également été reportée comme augmentant la taille des fibres de Fb [231].

Dans le cas de la BSAm, suite à l'ajout de la thrombine, un gel de Fb se forme quelle que soit la proportion de BSAm introduite. La présence des groupements méthacrylate sur la BSAm n'empêche donc pas la formation du réseau protéique. Par contre, le gel de Fb qui est turbide en présence de BSA, l'est moins en présence de BSAm. Cette observation suggère que le réseau de Fb est différent si la BSA utilisée est fonctionnalisée ou non.

## **II]2) Synthèse des RIP PVAmcoBSAm/Fb**

La présence du BSAm n'inhibe pas la formation du réseau de fibrine (Figure 79). Cependant il est nécessaire de vérifier que, comme dans le cas du PVAm, la réticulation de la BSAm amorcée parallèlement à la réaction enzymatique n'empêche pas la formation du réseau de Fb. Pour cela, des RIP BSAm(10%)/Fb, PVAm(7%)coBSAm(3%)/Fb, PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb et PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb ont été synthétisés. Le réseau simple BSAm(10%) a également été réalisé comme référence.

Afin de vérifier que le réseau de fibrines est bien formé, les matériaux sont ensuite immergés dans un tampon de dégradation chimique pendant 72h à 37°C, afin de détruire le réseau de fibrine. Les surnageants sont ensuite analysés par électrophorèse.

Afin de rendre visible uniquement le signal des fragments de Fg ou de Fb, la technique de Western Blot a été utilisée (Figure 80). Le réseau simple de BSAm est utilisé comme contrôle négatif.

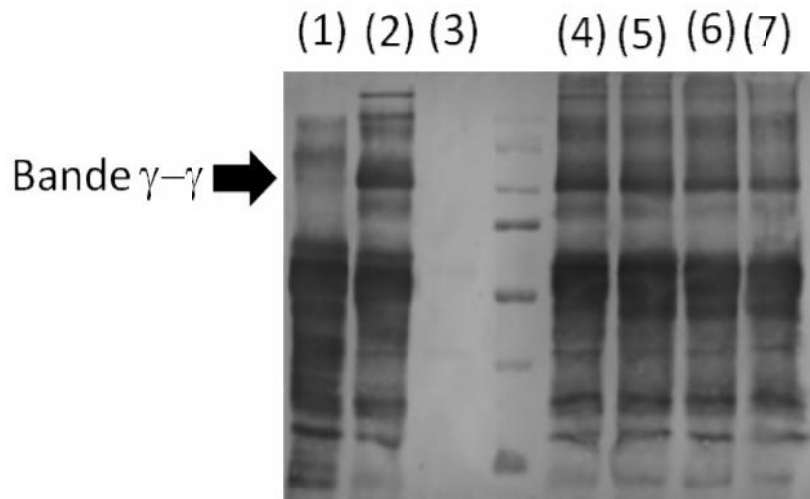


Figure 80 : Membrane de nitrocellulose après révélation au kit ALP color de solution de dégradation chimique du fibrinogène (1), gel de fibrine 0,5 % (w/v) (2), réseau simple RS BSAm(10%) (3), RIP BSAm/Fb (7) et de RIPs contenant les coréseaux PVAmcoBSAm à des proportions massiques (PVAm/BSAm) de 7/3, 5/5 et 3/7 respectivement (4), (5), (6)

L'absence de signal sur les pistes du réseau simple BSAm(10%) et la présence de la bande  $\gamma$ - $\gamma$  sur la piste du réseau de Fb permet de discriminer la Fb du Fg. La bande  $\gamma$ - $\gamma$  est détectée sur tous les surnageants extraits des RIPs. Ainsi, la réticulation de la BSAm, en présence ou non de PVAm, n'empêche pas la formation du réseau de fibrine.

### II]2)1. Formation du RIP

Des mesures de rhéologie *in situ* ont été réalisées sur les différents RIPs et réseaux simples correspondants. A partir de ces mesures, nous avons relevé les temps de gel et les modules de stockage après 60 min d'exposition aux U.V (Tableau 45).

Type du réseau synthétique	Réseaux simples		RIP	
	Temps de gel (min)	G' (Pa)	Temps de gel (min)	G' (Pa)
BSAm (10%)	15	220 ± 31	15	868 ± 423
PVAm(5%)coBSAm(5%)	3	830 ± 230	3	640 ± 19
PVAm (5%)	5	183± 49	6	334 ± 114
PVAm (10%)	2	3160 ± 933	3	3243 ± 421
Fb (0,5%)	3	83± 28		

Tableau 45 : tableau récapitulatif des modules élastiques en RS et RIP en fonction du polymère utilisé



Dans le cas des RIPs de BSAm/Fb, le temps de gélification est de 15 min et le module augmente toujours après les 60 min d'exposition aux U.V. Le point de gel du réseau de BSAm n'est donc pas modifié par la formation du réseau de Fb. Pour le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, le temps de gel est d'environ 3 min et le module  $G'$  est stable peu après 30 min d'exposition aux U.V. Le module élastique des RIP évolue de la même façon que ceux des réseaux simples aux mêmes proportions de PVAm et de BSAm. La présence de Fb n'a donc, là non plus, aucun impact sur la gélification du matériau alors que les RIPs PVAm(5%)/Fb et PVAm(10%)/Fb voient leur temps de gélification augmenter d'une minute par rapport au réseau simple correspondant.

Le module  $G'$  du matériau RIP BSAm(10%)/Fb est de 868 Pa soit un module 4 fois supérieur à celui du réseau simple BSAm(10%). Cette augmentation importante permet d'obtenir un matériau autosupporté contenant un réseau de fibrine à seulement 0,5% (w/v). Ses propriétés mécaniques sont suffisantes, même si elles sont inférieures à celles observées avec le réseau PVAm(10%). Cette différence dans les propriétés mécaniques est vraisemblablement due à la présence des zones cristallines du PVAm.

Le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb présente un module  $G'$  plus faible que le RS PVAm(5%)coBSAm(5%) avec 640 Pa au lieu de 830 Pa. C'est le seul RIP ayant un module de conservation légèrement inférieur à celui du réseau partenaire correspondant. Cela peut être dû à la différence d'interaction entre la BSAm et la Fb par rapport au PVAm ce qui induit peut être des inhomogénéités dans le réseau. Une autre hypothèse serait que la présence du réseau de Fb induirait une plus mauvaise réticulation du réseau PVAmcoBSAm ce qui engendrerait cette baisse des propriétés mécaniques. Cependant, le matériau obtenu possède tout de même un module de conservation deux fois supérieur à celui du RIP PVAm(5%)/Fb, est autosupporté et facilement manipulable.

## **II]2). Fraction soluble du réseau de fibrine en RIP**

Le réseau de Fb se forme parallèlement à la réticulation du réseau de BSAm ou des co-réseaux de PVAmcoBSAm au sein de RIP quelles que soient les proportions utilisées en PVAm et en BSAm. Pour évaluer la qualité de la réticulation des différents réseaux, des mesures d'extractibles ont été réalisées sur les RIP BSAm/Fb et PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb (Tableau 46). Ces derniers ont été extraits pendant 48h au Soxhlet avec de l'eau afin de quantifier la fraction de PVAm et BSAm qui n'a pas réagi (fraction synthétique). Parallèlement, des RIPs sont plongés dans du tampon de synthèse. Les surnageants sont ensuite quantifiés par un test Elisa (fraction de fibrine).

<b>Fraction soluble</b>	<b>Gel de Fb (0,5%)</b>	<b>RIP BSAm(10%)/Fb</b>	<b>RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb</b>
<b>Synthétique</b>	/	16 ± 5 %	16 ± 1 %
<b>Protéique</b>	0,03 ± 0,03 %	0,32 ± 0,03 %	0,47 ± 0,03 %

**Tableau 46 : Fractions solubles protéique et synthétique contenues dans le gel de fibrine, et les RIPs PVA(5%)coBSAm(5%)/Fb et BSAm(10%)/Fb**

La mesure par Elisa montre une fraction extractible du réseau de Fb inférieure à 1% par rapport à la masse totale de fibrine introduite pour l'ensemble des matériaux. En présence du réseau BSA(10%) et du coréseau PVAm(5%)coBSA(5%), la thrombine conserve donc son activité enzymatique sur le Fg pour former correctement un réseau de Fb.

Les extractibles du réseau synthétique sont évalués à 16% dans les deux RIPs après prise en compte des sels. L'introduction de BSA dans le réseau PVAm ne modifie pas de façon significative les fractions solubles (Tableau 37), les deux polymères sont donc bien copolymérisés.

Pour conclure, l'introduction de BSA dans le réseau PVAm n'empêche pas de synthétiser des matériaux autosupportés comportant un réseau de Fb à la concentration physiologique. Ces matériaux présentent des modules de stockage 10 à 8 et fois supérieurs à celui du gel de Fb.

### ***III]2)3. Répartition du réseau de fibrine dans le RIP***

La répartition de la Fb dans les matériaux a été étudiée. Dans les expériences réalisées précédemment pour les RIPs à base PVAm (Figure 51), la répartition du réseau de Fb, au sein de matériaux déjà formés, a été visualisée microscopiquement par marquage de la Fb avec de l'Alexa 488 via un greffage avec des fonctions isocyanate. Or dans les RIPs contenant de la BSA, cette technique n'était pas envisageable car la présence de cette protéine modifiée empêche un marquage spécifique du réseau de Fb. Afin d'obtenir une reconnaissance spécifique de la Fb et de la BSA, le marquage des deux réseaux par immunohistochimie, a été privilégiée (matériel et méthodes, IV]1)10). La répartition de ces sondes fluorescentes peut être observée au microscope confocal. Le réseau de Fb et la BSA des RIPs BSA(10%)/Fb et PVAm(5%)coBSA(5%)/Fb est donc marqué selon ce protocole.

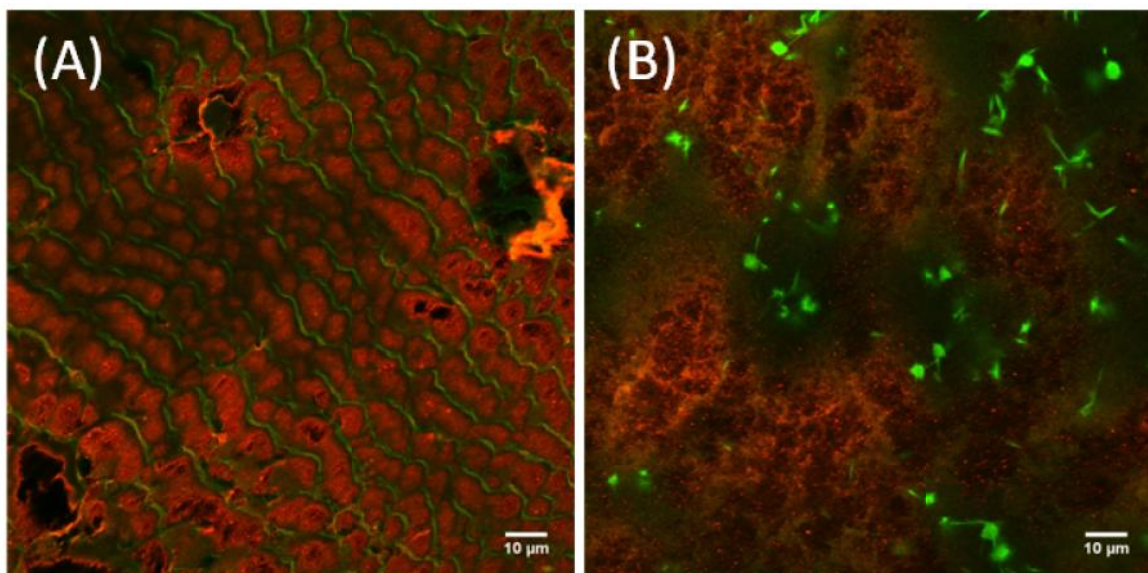


Figure 81 : Observation en microscopie confocale de la répartition de la BSA(rouge) et de la Fb (vert) dans le RIP BSA(10%)/Fb (A) et RIP PVAm(5%)coBSA(5%)/Fb (B). - Objectif x63

Le marquage du RIP BSAm(10%)/Fb aux anticorps révèle de petites structures dispersées de BSAm d'environ 5  $\mu\text{m}$  de diamètre, mais pas de présence de fibrille. Cependant, le marquage est visible sur l'ensemble du matériau. Etant donné que d'une part les extractibles du réseau de Fb dans ce matériau sont faibles et que l'analyse par électrophorèse révèle la présence de la bande  $\gamma$ - $\gamma$ , le réseau de Fb est bien formé. Cependant, même si la répartition de la Fb est homogène sur l'ensemble du matériau, ce réseau semble adopté une structure inhabituelle avec un maillage très lâche autour des domaines de BSAm.

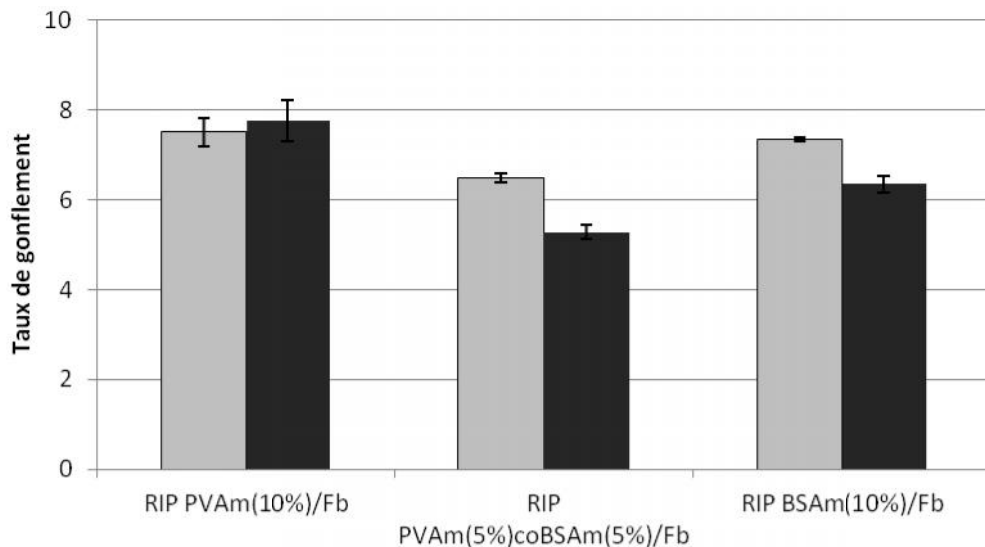
Pour le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, le marquage aux anticorps révèle la présence homogène du réseau de fibrine. De plus, il présente des petites structures de 5 $\mu\text{m}$  et plus déjà observées pour le RIP BSAm/Fb. Cependant de petites fibres sont aussi visibles dans le matériau. Leur diamètre d'environ  $938 \pm 100$  nm est comparable à ce qui a été obtenu pour les RIP PVAm(10%)/Fb. Par contre leur densité et leur répartition sont équivalentes à celles obtenues avec le RIP PVAm(5%)/Fb. Les observations réalisées sur le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb montrent que la présence de la BSAm permet la formation du réseau de Fb selon une répartition similaire à celle d'un matériau ne comportant que 5% (w/v) de PVAm, mais avec un diamètre de fibre supérieur. De plus les structures décrites sont réparties de manière homogène dans la profondeur du matériau.

Il n'a pas été possible dans ces matériaux de mettre en évidence une continuité du réseau de Fb. En effet, les réseaux RS BSAm(10%) ou RS PVAm(5%)coBSAm(5%) sont trop denses pour que le marquage aux anticorps soit suffisant pour vérifier la continuité du réseau de Fb. Afin de réaliser un marquage plus en profondeur de la Fb, il faudrait, introduire du fibrinogène marqué avec un fluorophore type Alexa 633 via des succinimides avant de l'incorporer aux RIPs. Ce type d'expérience permettrait d'obtenir un marquage homogène en profondeur, mais les vérifications préalables ont été jugées trop longues dans le cadre de notre étude.

#### ***II]2)4. Réversibilité à la déshydratation des RIPs***

La capacité des matériaux à base du réticulant hydrolysable BSAm à se réhydrater après un séchage a été étudiée. Ceux-ci ont été soumis au même protocole de séchage/hydratation que celui décrit pour le PVAm (chapitre II, V]3)).

Les taux de gonflements ( $S_r$ ) sont évalués selon la relation précédemment décrite (Chapitre matériel et méthodes, IV]1)9). Les résultats obtenus ont été rassemblés sur la figure suivante :



**Figure 82 :** Taux de gonflement post synthèse (SrpostS, gris) et après un cycle de séchage (Sr1, noir) pour les RIPs PVAm(10%)/Fb, RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb.

Le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb a un taux de gonflement inférieur à celui RIP PVAm(10%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb. Il reste toutefois important permettant au matériau de conserver son statut d'hydrogel. La réversibilité lors de la réhydratation n'est pas totale lorsque la BSAm remplace une partie ou la totalité du PVAm. Cette réversibilité est toutefois supérieure à 80% ce qui rend leur stockage à l'état sec possible.

### ***II]2)5. Cinétique de déshydratation des matériaux***

Comme cela a été souligné lors de la synthèse bibliographique, un pansement doit jouer un rôle de barrière et faciliter la cicatrisation. La possibilité de maintenir une atmosphère humide sur la plaie est l'un des facteurs clef permettant d'accélérer la reconstruction d'un tissu cutané. Afin de déterminer la capacité des matériaux à maintenir l'humidité, leur déshydratation a été enregistrée à 37°C. Pour cela, les RIP PVAm(10%)/Fb, RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb ont été plongés en sortie de synthèse dans leur tampon de synthèse pendant 24h. Ils ont été ensuite placés sur la nacelle de la TGA et ont été soumis à une température constante de 37°C et un flux d'argon sec à un débit de 5 mL/min. La perte d'eau est reportée en fonction du temps sur la Figure 83.

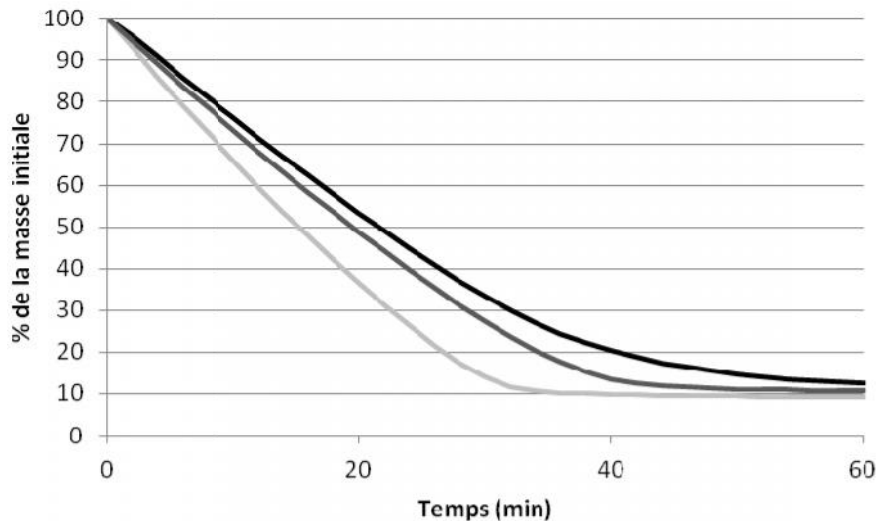


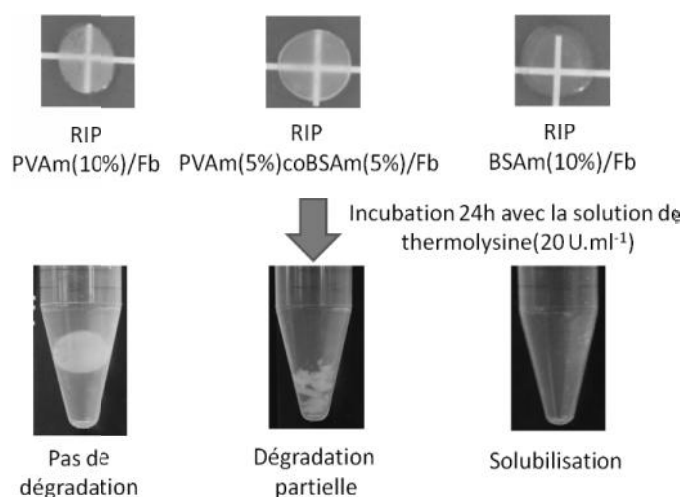
Figure 83 : Perte de masse en fonction du temps des RIP PVAm(10%)/Fb ■, RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb ■ et RIP BSAm(10%)/Fb ■ sous un flux d'argon sec à 5ml/min. T=37°C.

La déshydratation des matériaux dépend de leur composition. En effet, le RIP BSAm(10%)/Fb montre une perte de masse plus rapide ( 3%/min) que celle du RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb ( 2,5%/min), elle-même plus rapide que celle du RIP PVAm(10%)/Fb ( 2,3%/min). Ainsi, dans les conditions utilisées, le PVAm limite la déshydratation d'autant plus qu'il est en proportion élevée dans le matériau.

Pour conclure, les matériaux à base de PVAm ont montré une capacité plus importante à conserver l'humidité que les matériaux uniquement composé de BSAm ce qui est intéressant pour conserver une atmosphère humide au niveau de la plaie et donc de permettre une cicatrisation plus rapide. Des tests *in vivo* seront bien sûr nécessaires pour confirmer de cette hypothèse.

### **IIJ2)6. Dégradation enzymatique des RIPs**

Finalement, nous avons vérifié que l'introduction de la BSAm dans le réseau de PVAm permet bien de dégrader les RIP avec une enzyme. Pour cela, les RIPs PVAm(10%)/Fb, RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb ont été plongés immédiatement après synthèse dans une solution de thermolysine à 20 U.mL à 37°C. L'état des matériaux est constaté après 24 h (Figure 84). Pour comparaison, les réseaux simples correspondants, PVAm(10%), PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb et BSAm(10%) ont subi le même traitement.



**Figure 84 : Dégradation enzymatique des RIP PVAm(10%)/Fb, RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb**

Logiquement, aucune dégradation n'est visible pour le RIP PVAm(10%)/Fb. Le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb se désagrège, mais ne disparaît pas complètement, sa dégradation est donc partielle. Par contre, le RIP BSAm(10%)/Fb se solubilise totalement (solution limpide), sa dégradation est donc totale. Le même comportement est observé lorsque les réseaux partenaires seuls sont immergés dans la thermolysine : le PVAm(10%) n'est pas modifié, le coréseau PVAm(5%)coBSAm(5%) se dégrade partiellement et le BSAm(10%) est totalement dégradé.

Comme nous le souhaitons, l'introduction de BSAm dans le réseau PVAm permet bien de dégrader ce dernier par une enzyme.

### **III] Etude de la cytotoxicité des matériaux**

Il est nécessaire de connaître l'impact de l'introduction de la BSAm dans les matériaux sur des cultures cellulaires de fibroblastes BJ. Pour cela, la même stratégie que celle préalablement mise en œuvre sur les matériaux à base de PVAm a été utilisée. Une densité cellulaire de 50 000 cellule/cm<sup>2</sup> (densité de confluence) est mise en contact avec le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb ainsi que le réseau simple BSAm(10%) pour contrôle. Après une incubation de 24h à 3 semaines, un test métabolique (Alamar Blue®) a été réalisé et les cellules sont imagées par microscopie confocale pour déterminer leur morphologie (croissance ou non des fibroblastes) et la densité cellulaire sur les matériaux. Pour finir, la proportion de cellules mortes a été évaluée (Live and Dead) pour conclure sur la biocompatibilité des matériaux.

#### **III]1) Approche en deux dimensions**

##### **III]1)1. Suivi métabolique**

Le test métabolique (Figure 85) a été réalisé dans les mêmes conditions que sur les RIPs contenant uniquement du PVAm (Chapitre 2, V]4)3). Des mesures sont réalisées à 24 et 72h, 1, 2 et 3 semaines.

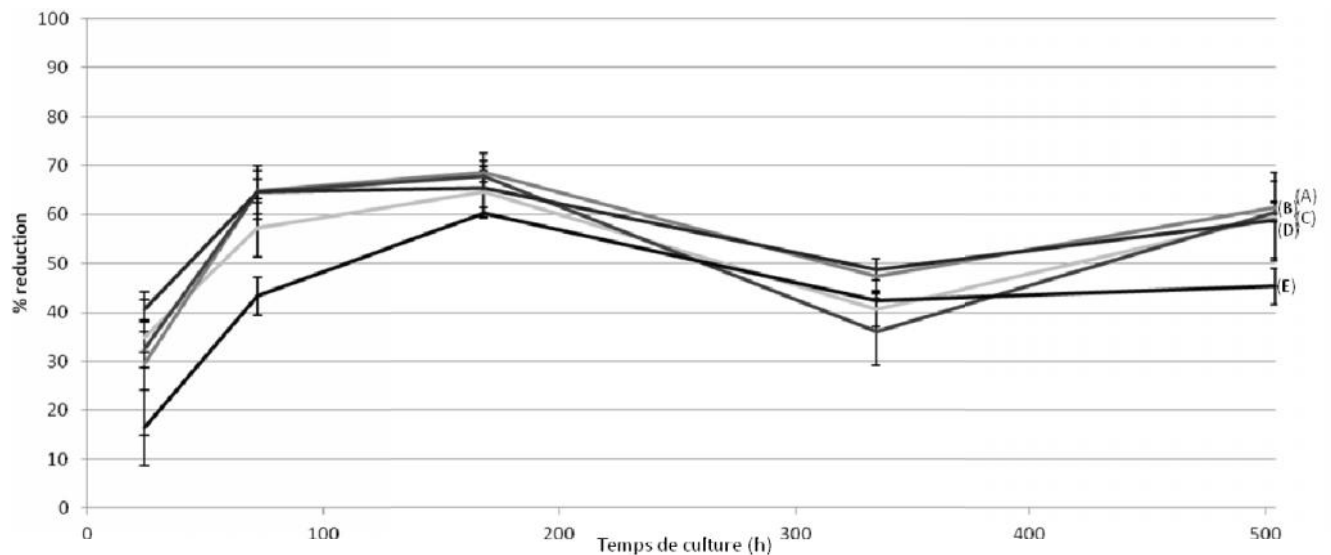


Figure 85 : Réduction de l'Alamar Blue après 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de culture sur le RS BSAm(10%) (A), le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%/Fb) (B), le RIP PVAm(3%)coBSAm(7%/Fb) (C), le RIP BSAm(10%/Fb) (D) et le polystyrène de culture cellulaire (E)

Quel que soit le matériau, l'activité mitochondriale augmente entre 24 et 175h. Le taux de réduction par les mitochondries décroît légèrement à la seconde semaine pour retrouver sa valeur précédente à la troisième. Par rapport au polystyrène traité pour la culture cellulaire (Figure 85-courbe E) aucune modification majeure du métabolisme n'est visible en présence des matériaux synthétisés et l'activité mitochondriale est comparable à celle obtenue sur les matériaux à base de PVAm (Figure 59), l'évolution des métabolismes est donc transposable. Ainsi, l'introduction de 5, 7 et 10% de la BSAm dans les RIPs n'engendre pas de toxicité.

### III]1)2. Morphologie cellulaire

La morphologie cellulaire traduit l'état cellulaire à la surface de ces mêmes matériaux. Les noyaux des cellules ont été colorés avec le DAPI (bleu) et le cytosquelette avec la phalloïdine Alexa 532 (vert). La morphologie cellulaire a été étudiée après 24h, 1 semaine et 3 semaines de culture (Figure 86).

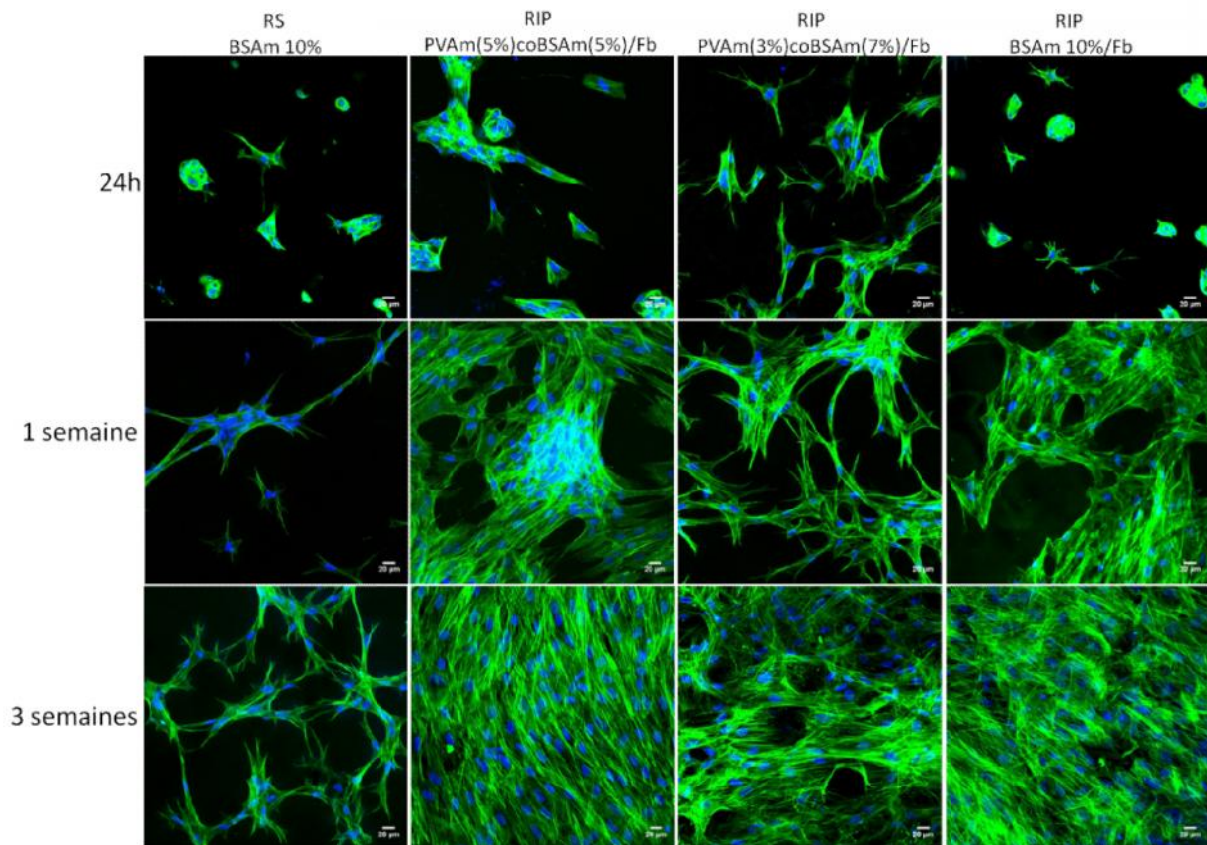


Figure 86 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de morphologies cellulaires de fibroblastes BJ cultivés pendant 24h, 1 semaine et 3 semaines à la surface de RS BSA(10%), RIP PVAm(5%)coBSA(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSA(7%)/Fb et RIP BSA(10%)/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et le cytosquelette est en vert (phalloïdine Alexa 532)

Quel que soit le matériau, les morphologies cellulaires évoluent au cours du temps. Après 24h de culture sur les réseaux simples BSA(10%) et RIP BSA(10%)/Fb, les cellules sont rondes ou avec une morphologie étoilée. Sur le réseau simple BSA(10%), après 1 et 3 semaines de culture, toutes les cellules sont allongées avec peu d'étalement et de nombreux pseudopodes. Le cytosquelette est organisé avec de nombreuses fibres de tension. Ainsi, les cellules adhèrent avec difficulté à la surface du réseau simple BSA(10%) sur lequel elles n'acquièrent pas leur morphologie habituelle de fibroblaste. Dans le même temps, les cellules sont beaucoup plus étalées sur le RIP BSA(10%)/Fb, et présentent également une morphologie étoilée. Le cytosquelette est bien visible avec de grosses fibres de tension et une augmentation importante de la population cellulaire est observée au cours des 3 semaines de culture. L'introduction de fibrine (RIP BSA(10%)/Fb) permet aux fibroblastes de s'étaler, d'augmenter leur surface cellulaire et de proliférer jusqu'au recouvrement du matériau.

Sur les RIPs contenant du PVAm et de la BSA, quelles que soient les proportions, des cellules sont très étalées dès 24h de culture. Après 1 et 3 semaines, la morphologie cellulaire est déjà polarisée et adopte la forme fusiforme typique des fibroblastes. Les fibres du cytosquelette sont également bien visibles. Les populations cellulaires sont presque confluentes dès la première semaine de culture et l'intégralité du matériau est recouvert de manière homogène par un tapis cellulaire après 2 semaines de culture.

Il est difficile de conclure sur la cause de ces différences phénotypiques. Il est connu que les propriétés mécaniques du matériau peuvent engendrer des différences phénotypiques, mais il est peu probable que ce soit le cas ici au vu des valeurs de module de stockage proches entre les deux



matériaux (Figure 78). Il est possible que cette différence soit due à l'organisation, la répartition et la taille des fibres du réseau de fibrine différente entre les deux matériaux (Figure 81) ce qui a pu modifier la répartition des récepteurs d'adhésion comme les intégrines et ainsi influencer le phénotype cellulaire.

Il est intéressant de noter que bien que le BSA soit dégradé par les protéases, aucune pénétration des cellules dans les matériaux n'a pu être observée. En effet, aux temps courts (72h), des pseudopodes, d'autant plus nombreux que la proportion de BSA est importante, s'enfoncent dans les matériaux. Cependant, dès que les cellules entre en contact les unes avec les autres (après 1 semaine de culture), il n'est plus possible d'observer ces pseudopodes.

### III]1)3. Densité nucléaire

Les matériaux ne semblant pas présenter de toxicité, les cellules à la surface du matériau ont été quantifiées à partir des images confocales. Les noyaux cellulaires ont été colorés au DAPI. La concentration cellulaire par  $\text{cm}^2$  à la surface des matériaux sur les différents matériaux sont reportés à différents temps de culture (Figure 87).

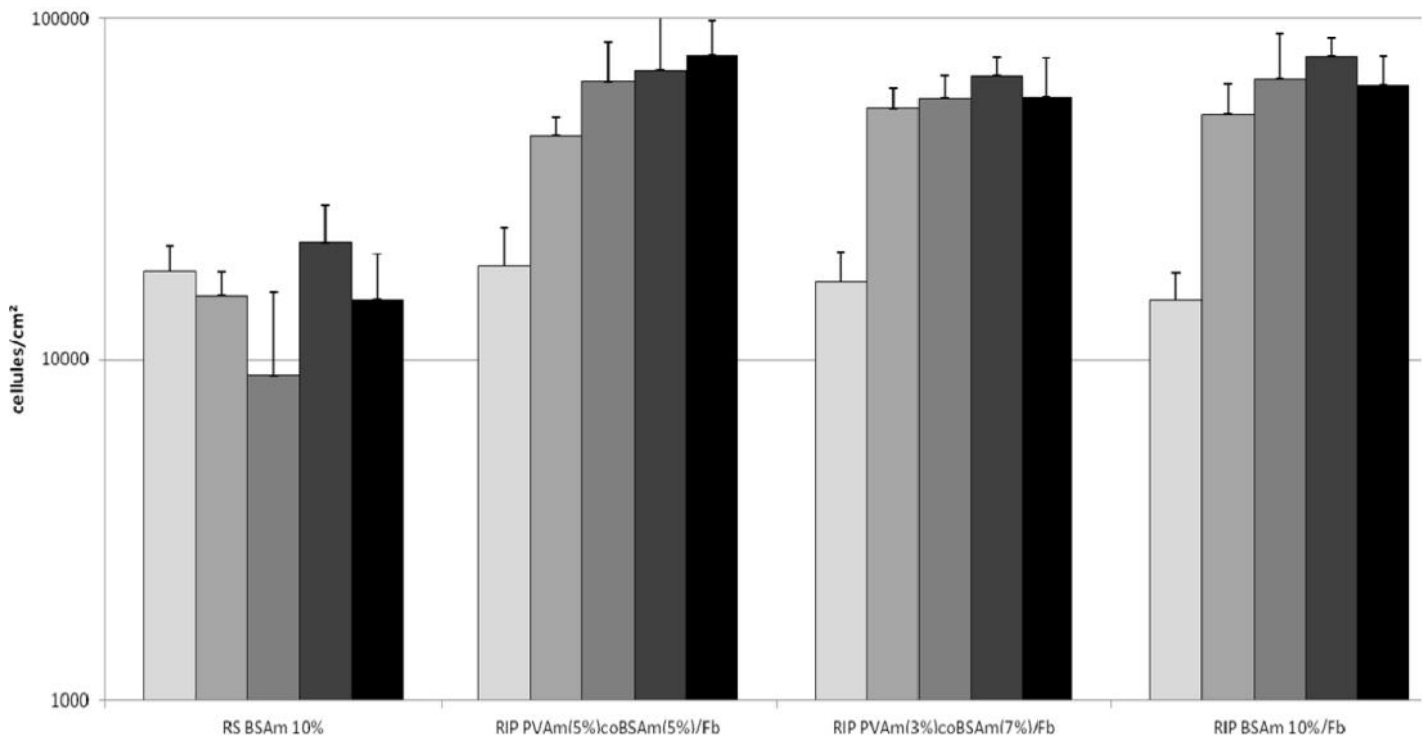


Figure 87 : Densité cellulaire à la surface des matériaux RS BSAm(10%), RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb à 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de culture.

Sur le réseau simple BSAm(10%), la population est constante à environ 15000 cellules/ $\text{cm}^2$  durant les 3 semaines de culture. Ainsi, contrairement au réseau simple PVAm(10%) (Figure 87), la présence de fibrine n'est pas nécessaire au maintien de la population cellulaire sur ce matériau. De plus, il est surprenant que les fibroblastes parviennent à s'y maintenir puisque, habituellement, la BSA est utilisée en tant que contrôle négatif pour l'adhésion cellulaire [232]. Cependant, les fibroblastes sécrètent de nombreuses protéines d'adhérence, dont la fibronectine, et la BSA est connue pour avoir des interactions avec ce type de protéine [233]. Il est donc possible que l'adhésion des fibroblastes sur le réseau simple BSAm(10%) soit due à son interaction avec ces protéines sécrétées.

Sur les RIPs, quel que soit le réseau partenaire de la fibrine, la population cellulaire est multipliée par environ 3 (de 15000 cellules/cm<sup>2</sup> à 50000 cellules/cm<sup>2</sup>) dès les 3 premiers jours de culture. Cette augmentation se poursuit plus lentement ensuite et se stabilise à environ 70000 - 80000 cellules/cm<sup>2</sup>. Ainsi, l'ajout de fibrine provoque une importante croissance cellulaire à la surface de ces matériaux puisqu'en seulement 3 jours, la densité de confluence (50000 cellules/cm<sup>2</sup>) est atteinte. La fibrine a donc un effet très important sur l'adhérence, l'étalement et la prolifération cellulaire sur les réseaux à base de BSAm. Il est intéressant de noter que cette réponse cellulaire est spécifique à ce type de matériaux car sur les RIPs à base uniquement de PVAm ou de POE et à concentration égale de Fb, la présence de Fb a un effet plus modéré. En présence de BSAm, le PVAm dans les RIPs ne semble pas avoir d'impact sur la croissance cellulaire. La répartition du réseau de fibrine n'étant pas différente entre ces deux types de matériaux (Figure 51 et Figure 81), la différence de croissance cellulaire peut être liée à la dégradabilité du matériau. En effet, le réseau de PVAm du RIP PVAm(5%)/Fb n'est pas dégradé par l'action d'enzymes présentes lors de la culture. Par contre, l'introduction de la BSAm dans le matériau, permet de conférer une dégradabilité par des protéases aux RIPs formés avec un co-réseau ou un réseau de BSAm. Or il a été reporté qu'un réseau de POE porteur de peptide RGD à une meilleure prolifération à sa surface s'il est copolymérisé avec des peptides sensibles aux metalloprotéinases (MMP) [162]. Il est alors possible que l'utilisation de la BSAm ait le même impact que les peptides sensibles aux MMP.

#### III]1)4. Taux de viabilité

La survivabilité cellulaire a été évaluée (kit LIVE/DEAD®) sur les matériaux à 24h, 1 et 3 semaines de culture (Figure 88). Les résultats obtenus précédemment sur le réseau simple PVAm(10%) sont représentés à titre de comparatif.

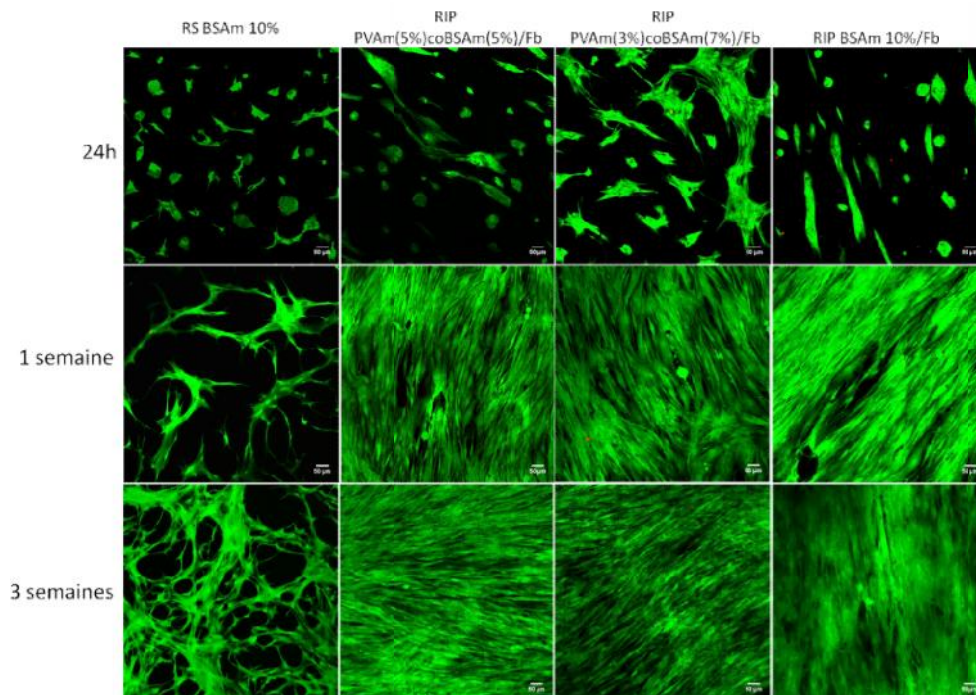


Figure 88 : Observation en microscopie confocale (objectif x10) de la survivabilité de fibroblastes BJ cultivés pendant 24h, 1 et 3 semaines à la surface de réseau simple BSAm(10%), RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm/Fb. La coloration obtenue par le kit Live and Dead colore les cellules vivante en verte et colore le noyau des cellules mortes en rouge.

La répartition cellulaire à 24h est homogène sur l'ensemble des matériaux. De plus, la très grande majorité des cellules sont vivantes sur l'ensemble du matériau. Il est important de constater que les cellules rondes ne présentent pas de mortalité par rapport aux cellules étalées.

Sur les RS BSA<sub>m</sub>(10%), il est à noter l'absence d'agrégats cellulaires comportant de forte mortalité comme cela avait pu être observé pour le RS PVA<sub>m</sub>(10%) (Figure 62). De plus la répartition cellulaire reste homogène au cours du temps et il n'y a pas apparition de surmortalité en absence de fibrine par rapport aux RIPs. Afin de mieux comparer les survivabilité, un traitement informatique via imageJ a été opéré. Les résultats sont visibles dans la Figure 89. Les résultats précédemment exposés du RS PVA<sub>m</sub>(10%) ont également été représentés à titre de comparatif.

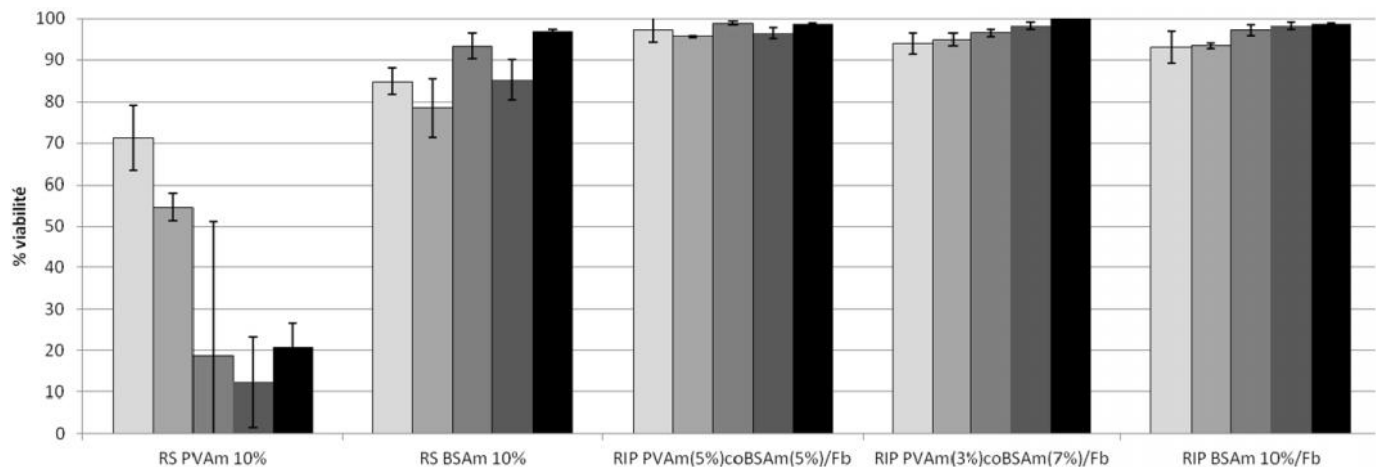


Figure 89 : Viabilité cellulaire sur les réseaux simples PVA<sub>m</sub>(10%) et BSA<sub>m</sub>(10%) et les RIP PVA<sub>m</sub>(5%)coBSA<sub>m</sub>(5%)/Fb, RIP PVA<sub>m</sub>(3%)coBSA<sub>m</sub>(7%)/Fb et RIP BSA<sub>m</sub>/Fb à 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de temps de culture.

La viabilité des fibroblastes à la surface du réseau simple BSA<sub>m</sub>(10%) est de 85% à 24h et augmente jusqu'à environ 95% après 3 semaines de culture. Ce taux n'est que de 70% à 24h et chute à environ 20% après 3 semaines de culture sur le réseau simple PVA<sub>m</sub>(10%). Cette information tend à confirmer que l'adhésion cellulaire est possible sur le réseau de BSA<sub>m</sub>. Les cellules montrent une survivabilité très élevée (> 95%) dès 24h qui augmente même après 3 semaines de culture pour atteindre 100% sur les RIPs et cela, quelle que soit la proportion de BSA<sub>m</sub> dans le réseau partenaire.

### III]1)5. Protéines matricielles

La fibronectine et l'acide hyaluronique étant les premières molécules synthétisées et excrétées par les fibroblastes lors de leur arrivée des fibroblastes sur le site de la plaie, elles ont tout d'abord été recherchées. Les macromolécules ont été colorées par immunohistochimie dans les mêmes conditions. Les matériaux ont été ensuite imagés sur une profondeur de 26 μm, à différents temps (Figure 90).

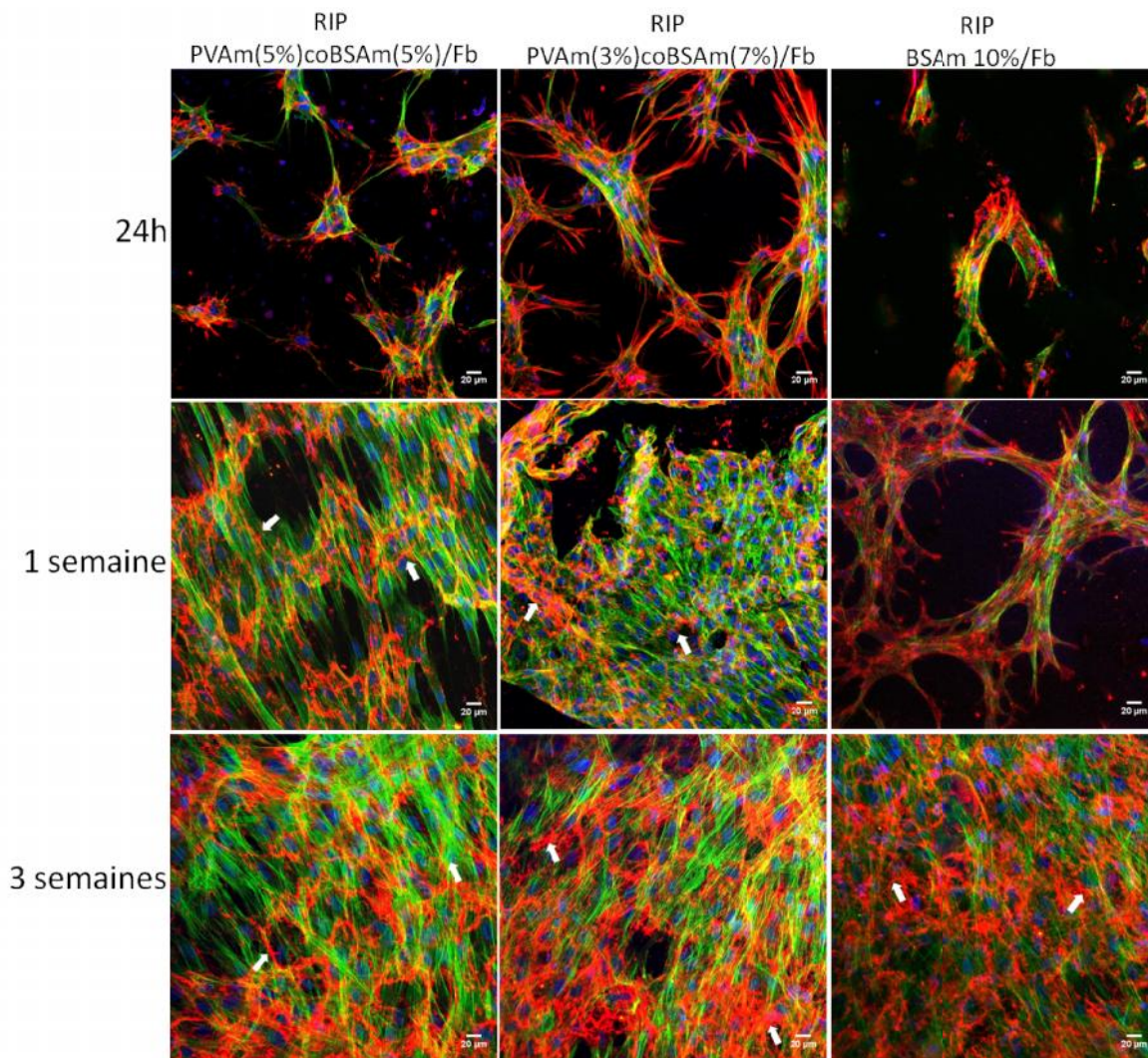
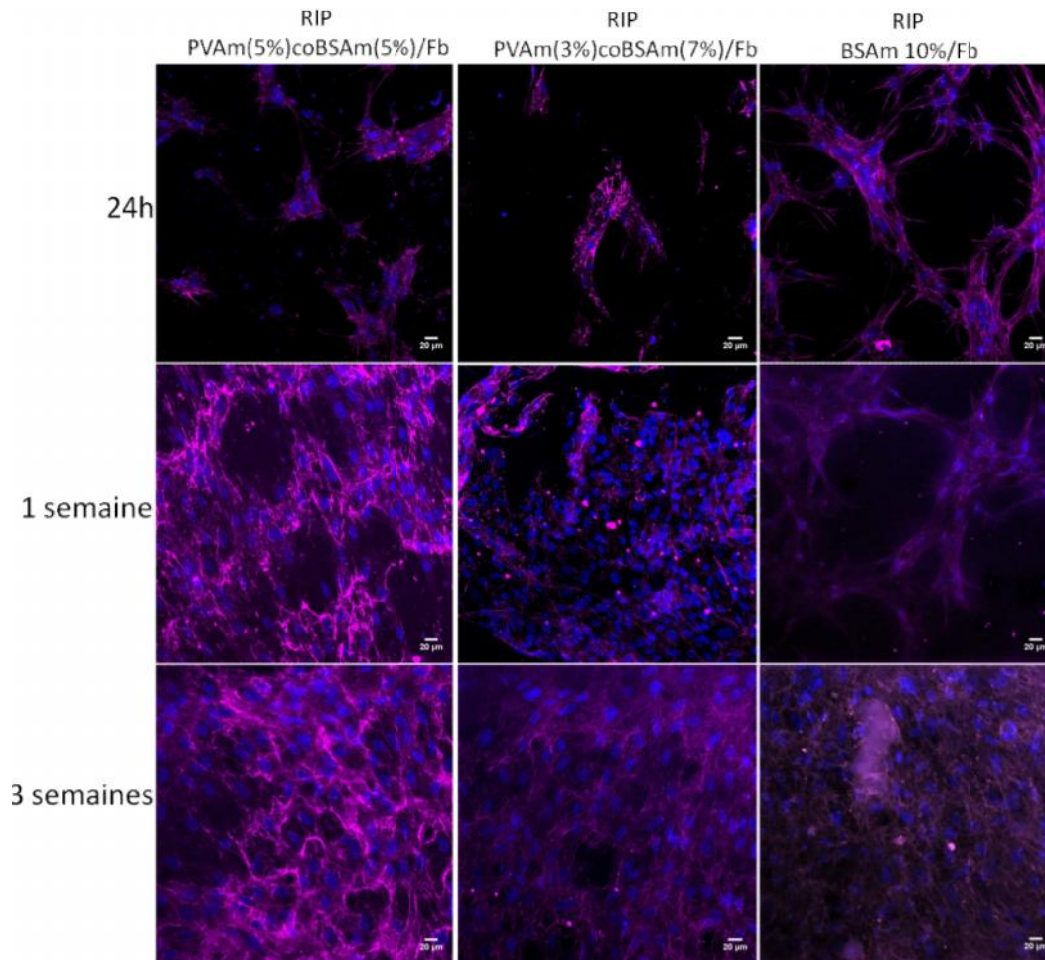


Figure 90 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de la fibronectine à 24h, 1 et 3 semaines à la surface de RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI), le cytosquelette des fibroblastes est en vert (phalloïdine Alexa 532) et la fibronectine est rouge (anticorp secondaire Alexa 633).

La fibronectine est de plus en plus présente au cours du temps et cette augmentation est similaire pour l'ensemble des matériaux et cela dès 24h de culture. Après une semaine, la fibronectine apparaît structurée en forme de fibre (fig. Fn flèche), ces fibres étant plus nombreuses après 3 semaines. Les fibroblastes sécrètent donc de la fibronectine durant leur développement sur les matériaux. La présence de fibre de fibronectine témoigne d'une structuration matricielle par les cellules de cette matrice néosynthétisée.

Une deuxième macromolécule primordiale de la matrice extracellulaire excrétée par les fibroblastes durant les phases de cicatrisation a été étudiée : l'acide hyaluronique. Cette macromolécule est détectée par immunomarquage et observée en microscopie confocale en fonction du temps de culture sur les différents matériaux (Figure 91).



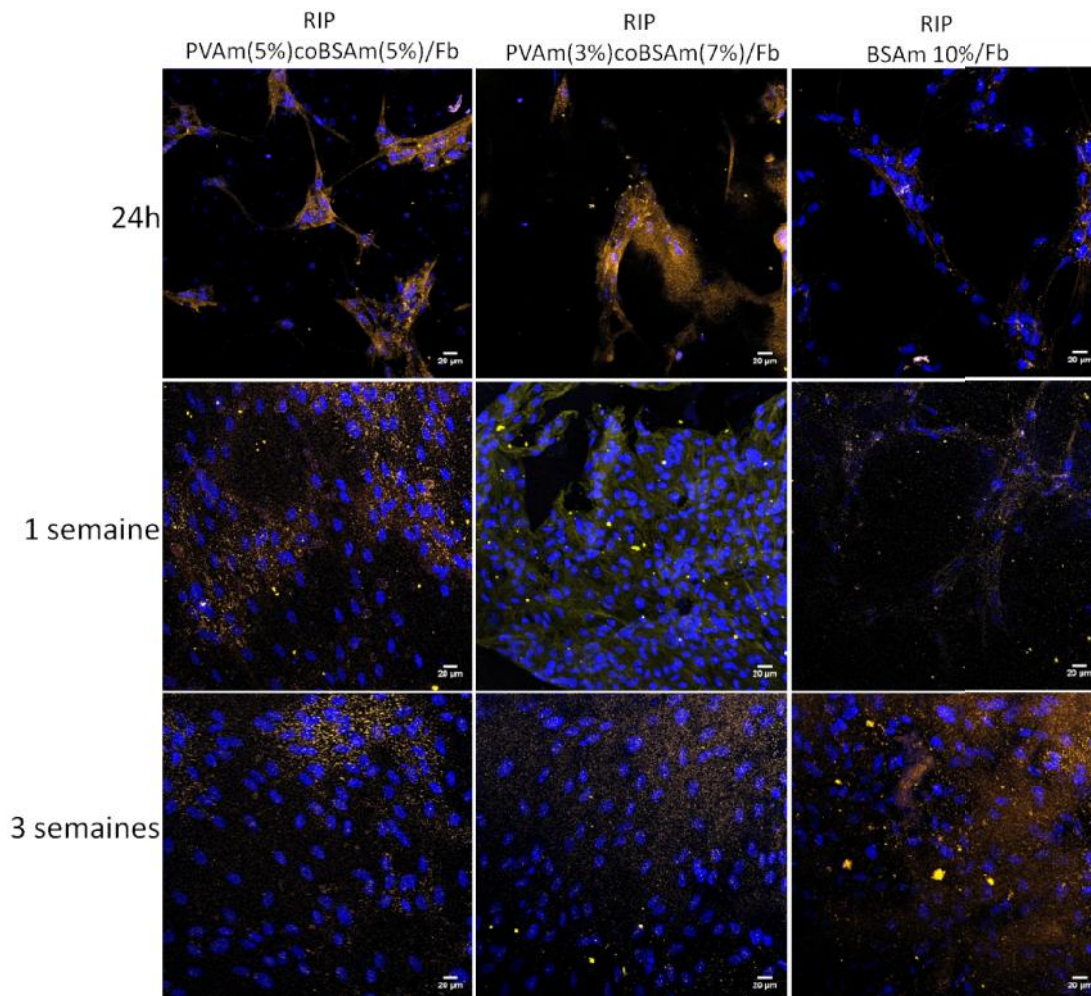
**Figure 91 :** Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de l'acide hyaluronique à 24h, 1 et 3 semaines à la surface des RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSA 10%/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et l'acide hyaluronique est en magenta (anticorps secondaire Alexa 568).

Comme pour la fibronectine, l'acide hyaluronique évolue de façon similaire sur tous les matériaux étudiés.

Dès 24h, l'acide hyaluronique est détecté à la surface et dans le cytoplasme de la cellule. Après 3 semaines de culture, sa présence s'est accrue de manière importante. En comparant les marquages de la fibronectine et de l'acide hyaluronique, une grande colocalisation est observable ce qui est cohérent sachant que l'acide hyaluronique et la fibronectine ont une affinité l'un pour l'autre.

Ainsi, en plus de la fibronectine, les fibroblastes sécrètent également de l'acide hyaluronique lors de leur développement sur les matériaux. Cette macromolécule est connue pour conserver une bonne hydratation des tissus [234].

Ainsi, les fibroblastes se développant à la surface des matériaux, sont capables de sécréter les premières macromolécules habituellement produites par cette lignée cellulaire. Le suivi du collagène de type I est aussi particulièrement intéressant. En effet, cette protéine est le constituant principal de la matrice extracellulaire du derme et sa synthèse et son excrétion sont primordiales pour la formation d'un tissu sain. Toutefois, sa sécrétion par les fibroblastes est plus tardive lors du processus de cicatrisation que celles de la fibronectine et de l'acide hyaluronique. Afin de vérifier sa présence, le collagène de type I présent à la surface des matériaux a été immunomarcqué (Figure 92).



**Figure 92 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition du collagène de type I à 24h, 1 et 3 semaines à la surface des RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et le collagène de type I est orange (anticorps secondaire Alexa 488)**

Quel que soit le matériau étudié, après 24h de culture, le collagène de type I est détecté sur les contours des cellules. Il est possible qu'il soit issu des sécrétions antérieures des cellules durant leurs amplifications. Toutefois, sa présence augmente de façon significative durant les 3 semaines de culture. Cette augmentation montre que la population cellulaire présente sur les matériaux est capable de le sécréter. Il semble également que cette sécrétion soit plus importante sur les RIPs PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb que sur les autres RIPs. Cependant, la quantification précise des protéines sécrétées selon les matériaux nécessiterait des expériences complémentaires.

En conclusion, les RIPs formés avec la BSAm seule ou avec différentes proportions de PVAm 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 permettant de qualifier ces différents matériaux de biocompatibles. Enfin, les cellules présentes sur les matériaux sécrètent les macromolécules clef de la matrice extracellulaire du derme humain et sont même capables de les structurer en forme de fibre comme cela a pu être observé pour la fibronectine.

Parmi les matériaux synthétisés, le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb rassemble l'ensemble des propriétés recherchées pour la réalisation d'un pansement, à savoir, une très bonne réhydratation pour un stockage aisé à sec, une dégradation enzymatique par des protéases, le maintien d'une atmosphère humide pour la plaie et le développement cellulaire à sa surface ainsi que la sécrétion

d'une matrice extracellulaire. Ces matériaux RIPs synthétisés pourront vraisemblablement à terme, participer à la reformation d'un tissu sain à la place de la plaie.

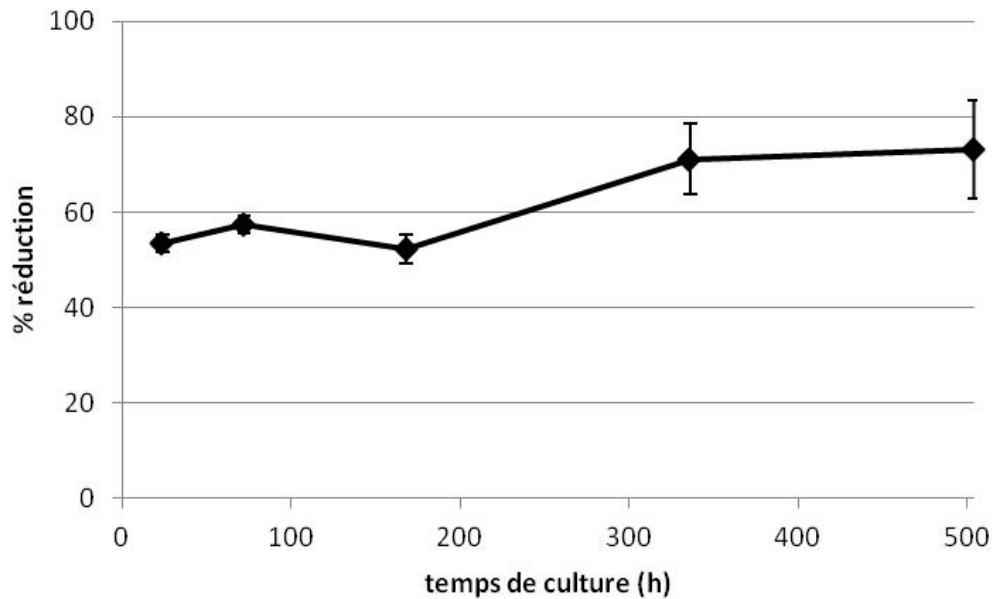
Cependant, durant ces expériences, nous n'avons pas pu observer la pénétration cellulaire dans les matériaux vraisemblablement du fait de l'absence de chemoattractant à l'intérieur de celui-ci et de la forte densité d'ensemencement engendrant rapidement les inhibitions de contact dues à la confluence cellulaire. Or, le développement de matériaux ayant une réparation cellulaire homogène en 3 dimensions est un point intéressant à développer car cela pourrait, dans un premier temps, conduire, à des pansements cellularisés voire de produire des substituts de peau. Afin d'obtenir une répartition homogène des cellules en 3 dimensions, la technique la plus efficace consiste à encapsuler une population viable de fibroblaste dans le matériau ce qui a été étudié avec le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb. De même que pour l'approche en deux dimensions la faculté de cette population à se multiplier et à produire de la matrice extracellulaire a été évaluée.

### **III]2) Encapsulation**

Afin d'encapsuler des fibroblastes dans un RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, les précurseurs du réseau de fibrine (fibrinogène et thrombine) et ceux du réseau synthétique (PVAm, BSAm et Irgacure 2959) ont été mélangés, puis la solution a été ensuite ajoutée à une suspension cellulaire concentrée. La solution obtenue a été placée dans un moule puis exposée aux U.V pendant 1h à 37°C pour réaliser la synthèse du RIP. Le matériau est ensuite plongé dans un milieu de culture à 37h pendant 3 h avant de renouveler le milieu pour éliminer les traces de tampon de synthèse. Les mesures ont été réalisés sur des matériaux de 140 mm<sup>3</sup> comportant 1000000 cellules chacun (soit 7000 cellules/mm<sup>3</sup>). Au vu de l'importante concentration cellulaire le milieu de culture est changé tous les 3 jours.

#### **III]2)1. Suivi métabolique**

Afin de comparer les résultats de l'ensemencement en deux dimensions à ceux obtenus par encapsulation, le test métabolique a été réalisé dans les mêmes conditions (24 et 72h, 1 , 2 et 3 semaines) (Figure 93).



**Figure 93 : Réduction de l'Alamar Blue en fonction du temps de culture des fibroblastes encapsulés dans les RIPs PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb.**

Dès 24h de culture, le pourcentage de réduction de l'Alamar Blue est élevé (53%), constant pendant une semaine (52%), puis augmente après 2 semaines (73%) pour se stabiliser de nouveau après 3 semaines de culture.

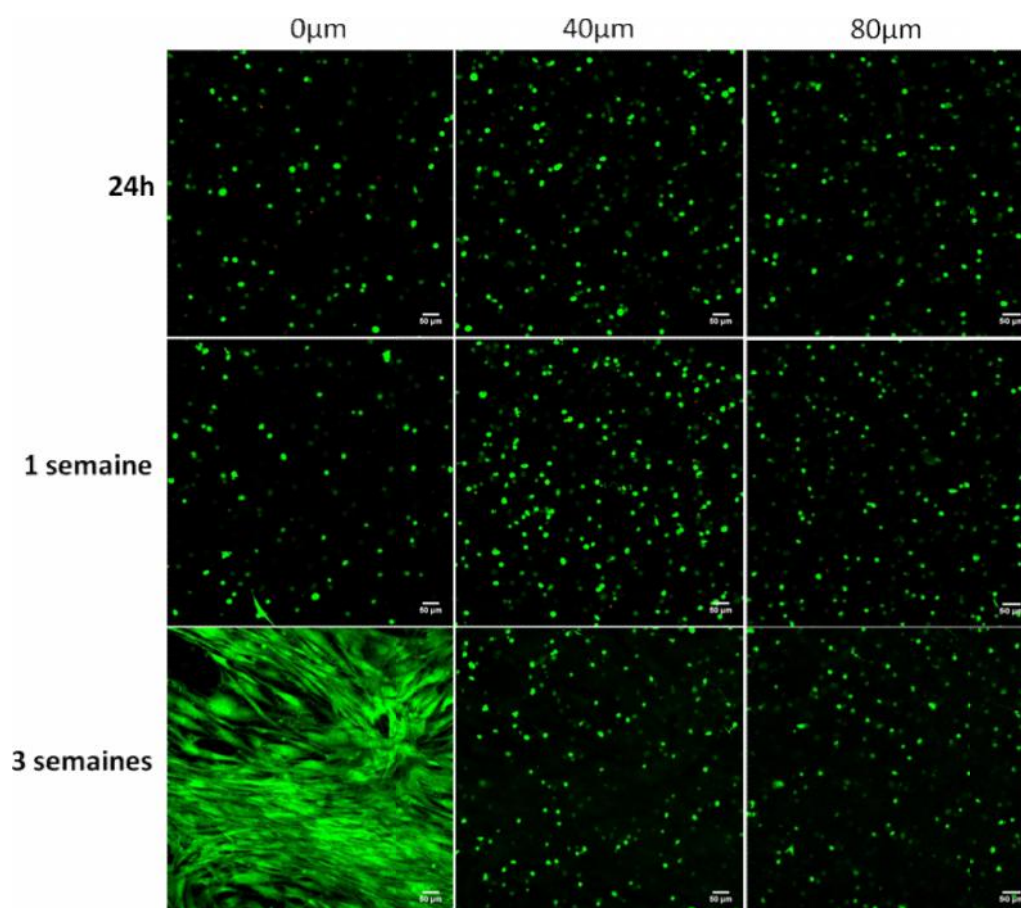
Le temps de latence observé entre 24h et 1 semaine de culture peut être dû à la mobilisation des récepteurs membranaires et la modification de la signalisation interne aux cellules entre un substrat 2D et un substrat 3D [235]. L'encapsulation s'accompagne d'un changement de métabolisme de la cellule qui peut demander du temps. L'augmentation de l'activité métabolique entre 2 et 3 semaines de culture pourrait être associée à une croissance cellulaire et/ou une sécrétion de macromolécules matricielles par les fibroblastes.

### ***III]2). Taux de viabilité***

De manière conventionnelle, le temps d'exposition pour la photopolymérisation de matériaux lors d'encapsulation est fixé à 10 min [236] pour lequel la puissance de la source U.V et la présence ou non d'un couvercle n'est pas prise en compte [237]. Or, la synthèse du RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb nécessite une exposition d'une heure (Figure 78) avec une source U.V de faible puissance (1,16 mW/cm<sup>2</sup>) à travers un couvercle en verre de 1 mm d'épaisseur. Il est donc nécessaire de vérifier, à l'aide du kit LIVE/DEAD®, si l'exposition aux rayonnements U.V dans ces conditions n'engendre pas une forte mortalité des cellules encapsulées.

Après une incubation de 45 min avec le kit, les cellules sont imagées à l'aide d'un microscope confocal sur une profondeur de 80µm (Figure 94).





**Figure 94 : Observation en microscopie confocale (objectif x10) de la vivabilité de fibroblastes BJ encapsulés après 24h, 1 et 3 semaines dans un RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb. La coloration obtenue par le kit LIVE/DEAD® colore les cellules vivantes en vert et le noyau des cellules mortes en rouge**

Aux temps courts, la répartition cellulaire et la viabilité de la population cellulaire sont homogènes en épaisseur sur l'ensemble du matériau. L'exposition d'1h aux U.V ne provoque donc pas de surmortalité des cellules à la surface du matériau. Après 1 et 3 semaines de culture, la population cellulaire est au moins maintenue et la répartition reste homogène. De plus, les cellules présentes initialement à la surface du matériau se sont fortement multipliées et ont recouvert le matériau. Cette répartition, d'une part, et l'absence de surmortalité à la surface du matériau d'autre part, confirme qu'il n'y a pas d'impact de l'exposition aux U.V sur la population cellulaire. Il serait cependant intéressant de confirmer ce point à l'aide de tests spécifiques à la génotoxicité, comme le « comet assay ».

Sur les 3 semaines de culture, la mort cellulaire est faible et homogène dans le matériau et cela même à 80μm. Le fait que la localisation en profondeur des cellules n'engendre pas de surmortalité, suggère que la circulation des nutriments et de l'oxygène se déroule parfaitement et qu'il n'y a pas de phénomène d'hypoxie cellulaire dans ces matériaux.

A partir de ces images, la viabilité cellulaire dans les matériaux a été évaluée en retraitant les signaux avec le logiciel imageJ (plugin «Object counter3D »).

Sur les 3 semaines de culture, la viabilité moyenne reste égale ou supérieure à 95%. Ce taux très élevé confirme que l'encapsulation des cellules est possible dans cette matrice et non toxique.

Grâce à ce traitement informatique, il a été également possible de réaliser un dénombrement de la population cellulaire dans la profondeur du matériau. L'évolution de la population cellulaire sur les 80 premiers microns du matériau est présentée sur la Figure 95

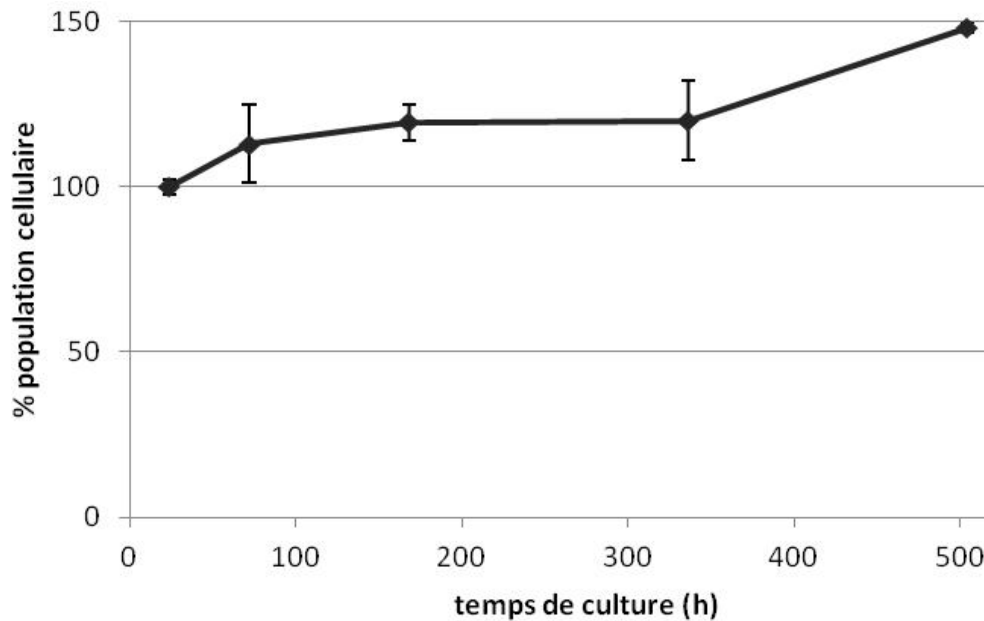


Figure 95 : Population cellulaire encapsulée à l'intérieur du RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb après 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de culture

Le dénombrement des cellules montre une augmentation globale de la population cellulaire avec le temps de culture. En effet, après 3 semaines, la population cellulaire est à 150% de sa valeur initiale, soit une augmentation de 7000 à environ 10000 cellules/mm<sup>3</sup>. Ainsi, même si les cellules sont encapsulées dans une matrice dense comportant du PVAm, elles sont capables de proliférer à l'intérieur du matériau. Cependant, l'utilisation d'un marqueur spécifique de la division cellulaire (Ki67) permettrait de visualiser directement les cellules en phases prolifératives à l'intérieur des matrices.

### ***III]2)3. Morphologie cellulaire***

Afin de connaître l'impact de l'encapsulation sur la morphologie cellulaire, celle-ci a été étudiée par le marquage du noyau au DAPI et le cytosquelette à la phalloïdine Alexa 532. Les morphologies ont été imagées sur 26 µm d'épaisseur et à différents temps (Figure 96).

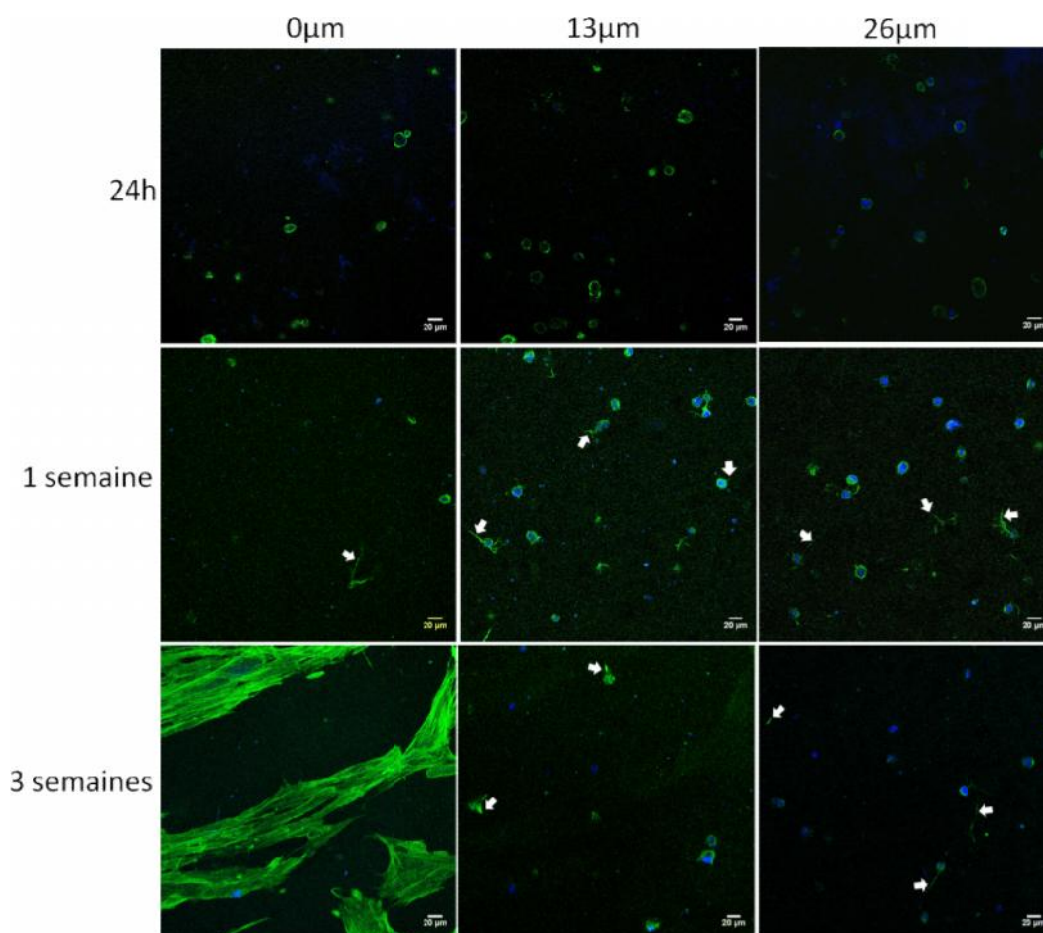


Figure 96 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la morphologie cellulaire de fibroblastes BJ encapsulés dans le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb cultivé pendant 24h, 1 et 3 semaines. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et le cytosquelette est en vert (phalloïdine Alexa 532) et sont imagés sur une profondeur de 26  $\mu\text{m}$

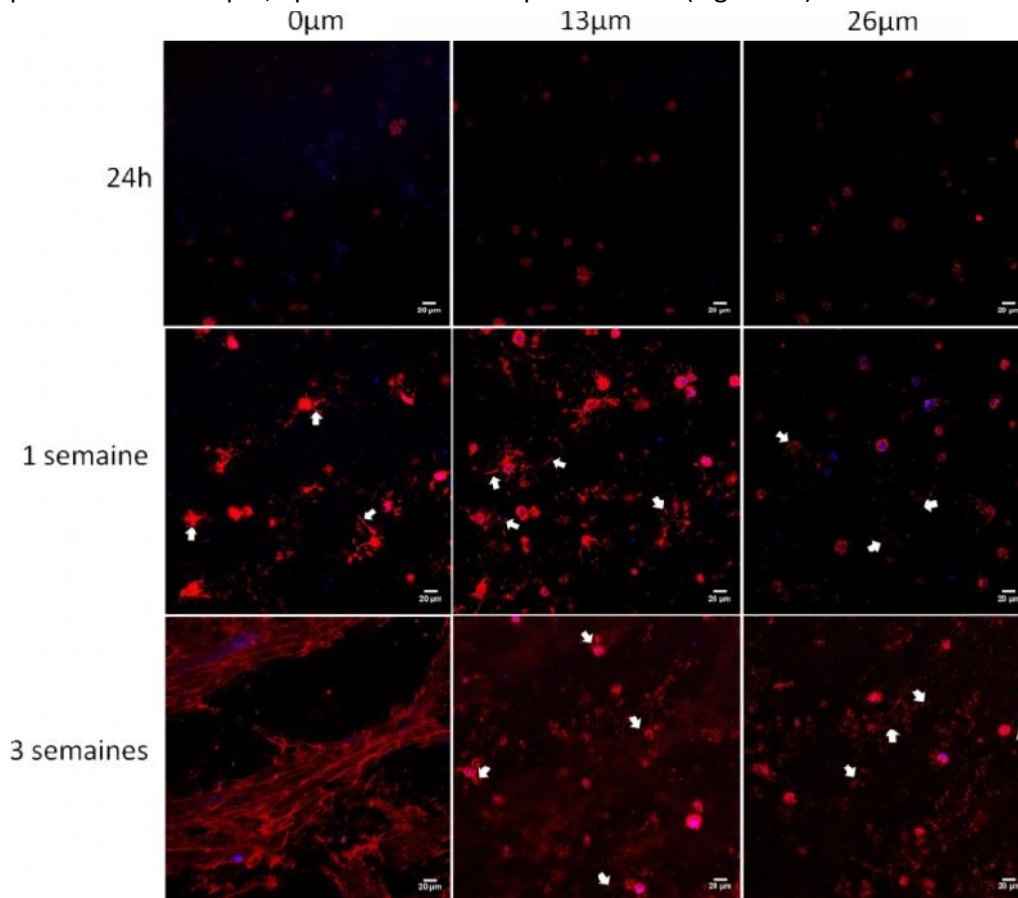
A temps court (24h) les cellules sont rondes quelle que soit la profondeur où elles se trouvent. Après 1 semaine de culture, toutes les cellules présentent un étalement (ovale ou allongé). Certaines cellules montrent également de nombreux pseudopodes très allongés (Figure 96, flèches). A 3 semaines, ces cellules avec de nombreux pseudopodes sont conservées en profondeur. Parallèlement, les cellules à la surface du matériau se sont allongées et présentent un profil type de fibroblastes, c'est-à-dire fusiforme.

Comme le laissait supposer les résultats du test métabolique, la population cellulaire met un temps plus long pour s'adapter aux conditions de culture puisque l'étalement est différé par rapport aux cultures cellulaires 2D. Une fois adaptés, les fibroblastes s'étalent dans le matériau. En fonction de la profondeur, les morphologies sont différentes : soit la forme typique fusiforme à la surface du matériau, soit avec de nombreux pseudopodes lorsqu'elles sont en profondeur. Ces différences phénotypes peuvent amener à une différence de comportement cellulaire [219]. Afin de vérifier cela, la présence des macromolécules matricielles (fibronectine, l'acide hyaluronique et le collagène de type I) a été étudiée en fonction de la profondeur dans le matériau.

#### **III]2)4. Protéines matricielles**

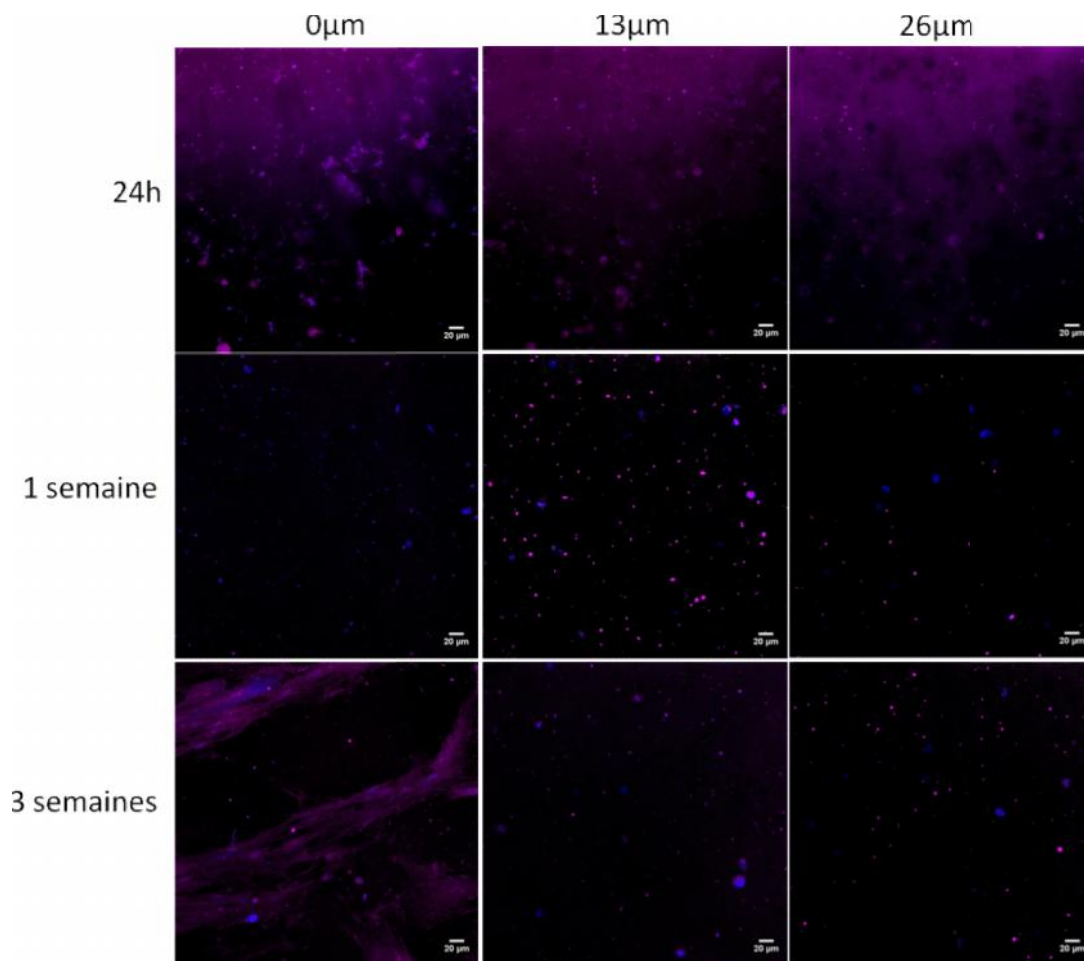
La fibronectine et l'acide hyaluronique étant excrétées lors de l'arrivée des fibroblastes sur le site de la plaie, elles ont tout d'abord été étudiées. Afin de comparer les résultats de la culture en

deux dimensions à ceux de l'encapsulation, les macromolécules ont été colorées par immunohistochimie dans les mêmes conditions. Les matériaux ont été ensuite imagés sur une profondeur de 26  $\mu\text{m}$ , après différents temps de culture (Figure 97).



**Figure 97 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de la fibronectine dans le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb pendant 24h, 1 et 3 semaines. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et la fibronectine est en rouge (anticorps secondaire Alexa 633) et sont imagés sur des profondeurs de 0, 13 et 26  $\mu\text{m}$**

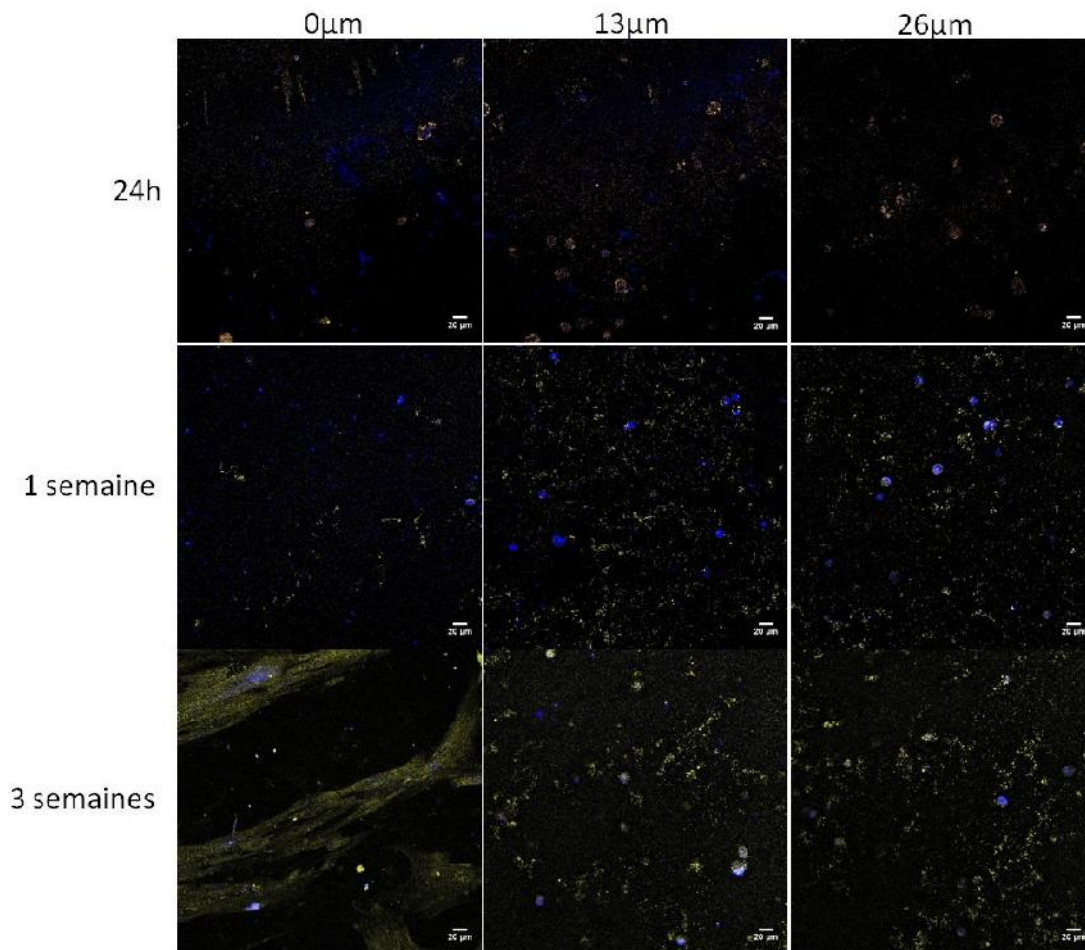
Comme pour la culture en 2D, la fibronectine est présente dès 24h de culture. Entre 1 et 3 semaines de culture, une augmentation significative de la présence de fibronectine est visible sur toute la profondeur du matériau. Une différence dans sa structuration est visible à 3 semaines en fonction de la profondeur étudiée. En effet, en surface, elle adopte une forme fibrillaire typique d'une fibronectine ayant été remodelée et intégrée à la matrice (Figure 90). En profondeur, la fibronectine est localisée soit autour des cellules (24h), soit sous forme de paillettes (1 et 3 semaines). Or ces paillettes correspondent en forme et en taille (Figure 97, Flèche) à ce qui a été observé lors du marquage immunologique de la fibrine dans ces matrices (Figure 81). La fibrine et la fibronectine étant connues pour leur affinité mutuelle [<sup>238</sup>], il est possible que la fibronectine excrétée se soit liée au réseau de fibrine d'où ce marquage analogue en forme à celui du réseau de fibrine. Cette hypothèse suggèrerait que le réseau de fibrine dans le RIP conserve son rôle physiologique de matrice provisoire pour la matrice extracellulaire nouvellement formée. L'acide hyaluronique a été étudié de la même manière (Figure 98).



**Figure 98 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de l'acide hyaluronique dans le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb pendant 24h, 1 et 3 semaines. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et l'acide hyaluronique est en magenta (anticorps secondaire Alexa 568) et sont imagés sur des profondeurs de 0, 13 et 26 µm**

L'acide hyaluronique peut être détecté sur les cultures de fibroblastes encapsulés dans le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb dès 24h. Cependant, après 1 et 3 semaines de culture, son signal disparaît pratiquement dans le matériau, mais pas à sa surface. Ces résultats suggèrent que l'environnement des cellules dans le matériau modifie leur sécrétion d'acide hyaluronique. En effet, seules les cellules étalées, et donc à la surface du matériau, excrètent encore cette macromolécule après 3 semaines.

Enfin l'excrétion de la protéine majoritaire de la matrice extracellulaire du derme, le collagène de type I a été étudiée. Le marquage et l'observation ont été réalisés dans les mêmes conditions que pour les autres macromolécules (Figure 99).



**Figure 99 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition du collagène de type I dans le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb pendant 24h, 1 et 3 semaines. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et le collagène de type I en jaune (anticorps secondaire Alexa 488) et sont imagés sur des profondeurs de 0, 13 et 26  $\mu\text{m}$**

Comme pour les précédentes macromolécules, la présence de collagène est détectée dès 24h de culture dans le RIP et augmente de manière significative après 1 et 3 semaines de culture. Enfin, il semble que sa présence soit supérieure dans la profondeur du matériau qu'à sa surface. Ces données confirment que les fibroblastes conservent leur habilité à sécréter le collagène lorsqu'ils sont encapsulés dans une matrice RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb. De plus, il semble que, comme pour l'acide hyaluronique, la profondeur et donc l'environnement de la cellule modifie la sécrétion de collagène. En effet, les cellules semblent excréter plus de collagène dans le matériau qu'à sa surface.

Ces différents tests ont permis de montrer que les fibroblastes peuvent être encapsulés dans un RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb sans qu'une surmortalité cellulaire soit observée et de plus, ils continuent à se diviser, y compris en profondeur.

Enfin, l'adaptation métabolique de la population cellulaire à un substrat 3D nécessite un délai d'au moins une semaine. Leur capacité d'excrétion des macromolécules de la matrice extracellulaire spécifique au derme est conservée mais elle dépend de l'environnement de la cellule dans le matériau. En effet, elles semblent excréter plus de protéines à la surface du gel que les cellules en profondeur. Il est difficile de déterminer si les cellules présentes en profondeur du matériau sécrètent moins de protéines que celles présentes à la surface. Afin de déterminer cela, il faudrait quantifier la sécrétion de protéines et la rapporter au nombre de cellules. La technique envisagée est

de réaliser une Q-PCR pour déterminer l'expression des protéines matricielles (Collagène et fibronectine).

L'ensemble de ces résultats, suggère, qu'à terme, il pourrait être possible de produire des pansements cellularisés par encapsulation de fibroblastes dans une matrice RIP PVAm (5%)coBSAm (5%). Ce type de matériaux, serait à même de promouvoir la cicatrisation et la sécrétion de macromolécules de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, l'acide hyaluronique et le collagène.

#### **IV] Conclusion**

Dans ce chapitre, nous avons montré qu'il est possible de former de manière simple, des réticulants hydrolysables par des actions enzymatiques. Ces derniers peuvent être utilisés pour synthétiser réseau après polymérisation radicalaire. Celui-ci peut ensuite être introduit dans un RIP avec un réseau physiologique de fibrine.

Les (co)réseaux PVAm/BSAm et RIP autosupportés peuvent être dégradés enzymatiquement et leur comportement aux cycles de séchage réhydratation montrent qu'ils peuvent être stockés facilement avant leur utilisation. De plus, les RIP formés à partir de co-réseaux PVAm/BSAm présentent une capacité à conserver l'humidité et leur biocompatibilité en font des candidats intéressants pour la reconstruction cutanée.

Parmi les matériaux synthétisés, le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb rassemble l'ensemble des propriétés recherchées pour la réalisation d'un pansement, à savoir, une très bonne réhydratation pour un stockage aisé à sec, une dégradation enzymatique par des protéases, le maintien d'une atmosphère humide pour la plaie et le développement cellulaire à sa surface ainsi que la sécrétion d'une matrice extracellulaire. Ces matériaux RIPs synthétisés pourront vraisemblablement à terme, aider à la reformation d'un tissu sain à la place de la plaie.

Pour finir, la possibilité d'encapsuler des cellules vivantes en leur sein et de les faire proliférer en fait un matériau capable d'être utilisé en tant que substitut cutané cellularisé.

# **CONCLUSION**



A la fin de sa thèse, Edéfia Akpalo avait démontré qu'il était possible de renforcer mécaniquement un réseau de fibrine à concentration physiologique en l'associant dans une architecture de réseaux interpénétrés de polymères (RIP) avec un réseau de polyoxyde d'éthylène (POE). Cette synthèse *in situ* impliquait une réaction enzymatique ce qui était tout à fait original. Les matériaux RIP POE/Fb obtenus étaient autosupportés ce qui était le but recherché. Cependant, la fraction soluble élevée, contenue dans ces matériaux, indiquait que tous les précurseurs utilisés dans la formulation n'étaient pas greffés aux différents réseaux. Une optimisation de la synthèse était donc nécessaire. Il fallait également réaliser des tests de toxicité pour étudier les relations entre les cellules et ces matériaux qui ne répondaient pas totalement au cahier des charges imposé pour une application en tant que pansement. En effet, ils ne se réhydrataient pas de façon réversible après un séchage et ils n'étaient pas biodégradables par des protéases. Plusieurs propriétés de cette première série de matériaux devaient donc être améliorées.

Les objectifs de ma thèse ont donc été, dans un premier temps, d'optimiser la synthèse des matériaux associant POE et fibrine (RIP POE/Fb). La suite de mes travaux consistait à étudier différentes stratégies pour conférer à ce matériau de nouvelles propriétés pour qu'il réponde aux exigences d'un biomatériau plus adapté à une utilisation comme pansement voire comme support pour la régénération cutanée.

Au cours de la première partie de mes travaux, plusieurs améliorations ont été réalisées sur la synthèse des RIPs POE/Fb, notamment la mise au point d'un protocole de synthèse optimisé et d'un nouveau moule adapté à la photopolymérisation permettant la réalisation de surfaces plus importantes variant 1,5 à 19 cm<sup>2</sup> avec différentes formes prédéfinies. Le domaine de compositions, donc de propriétés, a été élargi. Ainsi, les RIP POE/Fb peuvent être synthétisés avec différentes concentrations de POE variant de 5 à 10% (w/v) et de fibrine (de 0,05 à 2,5% w/v). Les fractions solubles contenues dans ces RIPs ont été diminuées d'environ un facteur 4 pour le réseau synthétique et par 20 pour le réseau protéique. Ils présentent des modules de stockage à l'état hydraté, en moyenne 40 à 120 fois supérieurs à ceux du réseau de fibrine à concentration physiologique. Pour une utilisation en tant que pansement, le stockage du matériau doit être considéré dès sa conception. Nous avons principalement envisagé un stockage à sec puis une réhydratation au moment de l'utilisation. Les RIPs présentent une meilleure réversibilité lors de la réhydratation que le réseau de fibrine seule (70% au lieu de 20%). De plus, contrairement au réseau de fibrine, les RIPs sont manipulables à l'état sec. Enfin, ces matériaux sont non cytotoxiques. En effet, des cellules d'ovaire de hamster chinois (CHO) adhèrent, s'étalent et prolifèrent à leur surface. Ces proliférations cellulaires sont d'autant plus importantes que la concentration en fibrine est élevée. Nous retrouvons donc bien les propriétés recherchées de chacun des partenaires, à savoir les propriétés mécaniques du réseau POE et biologiques de la fibrine. Toutefois, ces RIPs voient leur application en tant que pansement limitée par leur capacité de réhydratation, jugée trop faible. L'amélioration de cette propriété a été le cœur de la deuxième partie de mes travaux.

Afin d'améliorer la réhydratation, le réseau de POE a été remplacé par un réseau d'alcool polyvinylique toujours associé à un réseau de fibrine à concentration physiologique. Cette nouvelle série de RIPs (RIP PVAm/Fb) sont également des hydrogels autosupportés avec des modules de stockage 80 fois supérieurs à celui du gel de fibrine à concentration physiologique. Nous avons vérifié que ce dernier est homogène sur l'ensemble des RIPs. A l'état sec, ces matériaux sont également facilement manipulables. Cependant, contrairement au RIP à base de POE, ces nouveaux RIPs

PVAm/Fb montrent une réversibilité totale à la réhydratation. Il est donc possible de les synthétiser, les stocker à l'état sec et les réhydrater à leur taux de gonflement post synthèse avant utilisation. Ils sont également non cytotoxiques. En effet, les tests de biocompatibilité avec une lignée de fibroblastes humains (FB-BJ) ont mis en évidence que les cellules du derme adhèrent et s'étalent à leur surface. Ces biomatériaux, issus d'un concept innovant, possèdent à ce stade les propriétés nécessaires à un pansement. En effet, le cahier des charges exigent de bonnes propriétés mécaniques (hydrogel autosupporté), la non cytotoxicité, des capacités à conserver l'humidité de la plaie et à absorber les exsudats (taux de gonflement élevé). De plus, de par la présence homogène du réseau de fibrine, ces pansements ont une bioactivité spécifique à la réparation tissulaire ce qui était le but recherché.

La possibilité de conférer de nouvelles propriétés complémentaires au matériau a ensuite été envisagée. Nous avons choisi de rendre le matériau dégradé par des protéases. En effet, ce facteur est connu pour améliorer la qualité de la cicatrisation ce qui a justifié la suite des travaux.

La stratégie que nous avons adoptée pour donner une biodégradabilité au réseau PVAm a été de le copolymériser avec des sections hydrolysables, de nature protéique, utilisées comme réticulant. Ces réticulants hydrolysables ont été synthétisés à partir de sérum albumine bovine (protéine sanguine circulante et abondante) entière, partiellement ou totalement hydrolysée par des protéases. Ces réticulants ensuite fonctionnalisés avec des groupements méthacrylate, ont été copolymérisés avec le PVAm. Le réticulant issu de la protéine entière (BSAm) a conféré la meilleure dégradabilité au réseau de PVAm. En effet, à partir d'une proportion de 50% massique, les coréseaux PVAmcoBSAm deviennent partiellement dégradables ce qui n'est pas le cas pour les autres réticulants. Ces coréseaux PVAmcoBSAm ont été associés avec un réseau de fibrine dans des RIP (RIP PVAmcoBSAm/Fb) dans lesquels la répartition de la fibrine reste homogène. Ce nouveau RIP, dégradé par des protéases, conserve les propriétés du réseau PVAm. En effet, son module de stockage, à l'état humide, est 21 fois supérieur à celui du gel de fibrine à concentration physiologique, sa réhydratation est élevée (80%) et il maintient son hydratation. De plus, la dégradabilité a permis d'augmenter de manière très significative la bioactivité des matériaux. En effet, la surface de ces matériaux peut être complètement recouverte par des fibroblastes en une semaine environ, ce qui n'était pas le cas des RIP PVAm/Fb. De plus, les cellules à la surface du matériau sécrètent les biomacromolécules de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène de type I, acide hyaluronique) et sont capables de les structurer (fibronectine structurée en fibres). Ces propriétés en font un excellent support de culture. Elles pourraient, en effet, permettre d'augmenter de manière importante la vitesse de cicatrisation d'une plaie. Ce matériau innovant pourrait donc fournir aux cellules de la peau une matrice provisoire pour leur déplacement et la formation de tissu sain.

Il est communément admis que lorsque des cellules sont déjà présentes dans un matériau, la bioactivité qui en résulte, accélère sensiblement la vitesse et la qualité de cicatrisation. Ainsi, des FB-BJ ont été encapsulés dans des RIPs PVAmcoBSAm/Fb. La densité cellulaire optimale a été déterminée à une concentration de 7000 cellules/mm<sup>3</sup>. Des tests de viabilité ont démontré que l'exposition aux UV, nécessaire à la synthèse des matériaux, n'avait pas d'effet toxique sur la population cellulaire (viabilité supérieure à 95%). De plus, ce taux de viabilité se maintient durant au moins 3 semaines indiquant l'absence d'hypoxie. Durant ces 3 semaines de culture, la population cellulaire a augmenté jusqu'à 150% de la population cellulaire initiale et la présence de

biomacromolécules de la matrice extracellulaire (fibronectine, collagène de type I et acide hyaluronique) augmente. Pour finir, des différences de sécrétion de biomacromolécules ont pu être observées jusqu'à au moins 26  $\mu\text{m}$  dans la profondeur du matériau. Ces matériaux cellularisés présentent alors les caractéristiques nécessaires pour devenir un pansement ou un support de culture pour la régénération cutanée. La capacité possibilité d'encapsuler des cellules à l'intérieur en fait de ce matériau un substitut cutané cellularisé potentiel.

Pour la suite de ces travaux, plusieurs points pourraient être étudiés. Tout d'abord, la méthode de stockage et de transport des matériaux cellularisés doit être prise en compte. Des expériences préliminaires ont démontré qu'ils pouvaient être congelés à  $-80^{\circ}\text{C}$  et être ensuite remis en culture tout en conservant une viabilité élevée (environ 95%) 24h après leur décongélation. Il est donc potentiellement possible de produire ces substituts cutanés et de les stocker et de les transporter congelés. Ensuite, l'utilisation de protéines humaines lors de la synthèse du matériau devra être étudiée. La différence entre les sérums albumine bovine et humaine (HSA) étant très faible, il ne devrait pas y avoir de problème technique majeur pour synthétiser des RIPs à base de coréseau PVAm-HSA associé avec un réseau de fibrine humaine. Si cette synthèse est possible, l'utilisation de plasma sanguin pourrait être envisagée à la place de la fibrine humaine. L'utilisation de plasma et de HSA fonctionnalisée permettrait ainsi de produire des supports de culture pour la régénération cutanée d'origine totalement humaine. En utilisant des cellules du patient (cellules souches ou différenciées) et son propre sérum, la technologie mise au point permettrait de produire des substituts cutanés autologues. Or ce type de matériaux n'est, à l'heure actuelle, possible que par des autogreffes, pratique limitée et souvent douloureuse.

Compte tenu de leurs importantes potentialités dans le domaine de la régénération cutanée, les travaux ici présentés seront poursuivis dès janvier 2013. Dans un premier temps, un stage de Master 2 recherche (financement de la Fondation de l'UCP) tentera de produire des RIPs directement à base de plasma sanguin. Les équipes de recherche impliquées dans ce travail de thèse visent, à plus long terme, l'objectif de former un substitut cutané autologue, autosupporté et biodégradable, produit inexistant actuellement sur le marché des biomatériaux.

# REFERENCES

- <sup>1</sup> B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, J. E. Lemons "BIOMATERIALS SCIENCE : An Introduction to Materials in Medicine, 2nd Edition ". Elsevier, 2004
- <sup>2</sup> D. F. Williams. "On the mechanisms of biocompatibility ." *Biomaterials* 29 ; 2941–2953, 2008.
- <sup>3</sup> E. Rabkin and F. J. Schoen. " Cardiovascular tissue engineering. " *Cardiovasc. Pathol.* 11 ; 305, 2002.
- <sup>4</sup> D.F. Williams "Definition in biomaterials". Amsterdam : Elsevier ; 1987
- <sup>5</sup> D. F. Williams. " On the nature of biomaterials ". *Biomaterials* 30, 5897-5909, 2009
- <sup>6</sup> Z. Lu, C. Moraes, G. Ye, C. A. Simmons, Y. Sun. "Single cell deposition and patterning with a robotic system. ". *Plos one*, October 21, 2010
- <sup>7</sup> P.J. Kitson, M.H. Rosnes, V. Sans, V. Dragone, L. Cronin. " Configurable 3D-Printed millifluidic and microfluidic 'lab on a chip' reactionware devices. " *Lab Chip.* 12(18) ; 3267-71, 2012.
- <sup>8</sup> DIRECTIVE 93/42/CEE DU CONSEIL du 14 juin 1993 relative aux dispositifs médicaux
- <sup>9</sup> P. Renoud, B. Toury, S. Benayou, G. Attik, B. Grosogoea. "Functionalization of Titanium with Chitosan via Silanation: Evaluation of Biological and Mechanical Performances." *PLoS One*7(7):39367, 2012.
- <sup>10</sup> D. Kowalczyk, G. Ginalska, T. Piersiak, M. Miazga-Karska. "Prevention of biofilm formation on urinary catheters: Comparison of the sparfloxacin-treated long-term antimicrobial catheters with silver-coated ones." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* doi: 10.1002/jbm.b.32755, 2012 .
- <sup>11</sup> L. G. Ovington. " Advances in wound dressings " *Clinics in Dermatology* 25, 33–38, 2007.
- <sup>12</sup> Z.M. Binsalamah, A. Paul, S. Prakash, D. Shum-Tim. " Nanomedicine in cardiovascular therapy: recent advancements. " *Expert Rev Cardiovasc Ther*10(6);805-15, 2012
- <sup>13</sup> M. Morave, D. Mantovani. " Biodegradable metals for cardiovascular stent application: interests and new opportunities. " *Int J Mol Sci.* 12(7):4250-70, 2011.
- <sup>14</sup> D.K. Chatterjee, A.J. Rufaihah, Y. Zhang. "Upconversion fluorescence imaging of cells and small animals using lanthanide doped nanocrystals." *Biomaterials* 29(7) ; 937–43, 2008.
- <sup>15</sup> Z-S Wu, F Zheng, G-L Shen, R-Q Yu. "A hairpin aptamer-based electrochemical biosensing platform for the sensitive detection of proteins." *Biomaterials*;30(15):2950–5, 2009.
- <sup>16</sup> A.S. Hoffman. "The origins and evolution of "controlled" drug delivery systems." *J Control Release* 132(3):153–63, 2008.
- <sup>17</sup> O.M. Rashid, M. Nagahashi, K. Takabe. "Management of massive soft tissue defects: The use of INTEGRA® artificial skin after necrotizing soft tissue infection of the chest." *J Thorac Dis*;4(3):331-5, 2012.
- <sup>18</sup> A. Gautier, B. Carpentier, M. Dufresne, Q. Vu Dinh, P. Paullier, C. Legallais. "Impact of alginate type and bead diameter on mass transfers and the metabolic activities of encapsulated C3A cells in bioartificial liver applications." *Eur Cell Mater*, 21:94-106, 2011.
- <sup>19</sup> Y. Nishiyama, M. Nakamura, C. Henmi, K. Yamaguchi, S. Mochizuki, H. Nakagawa, K. Takiura. "Development of a three-dimensional bioprinter: construction of cell supporting structures using hydrogel and state-of-the-art inkjet technology." *J Biomech Eng.* 131(3):035001, 2009.
- <sup>20</sup> M. Habib, K. Shapira-Schweitzer, O. Caspi, A. Gepstein, G. Arbel, D. Aronson, D. Seliktar, L. Gepstein "A combined cell therapy and in-situ tissue-engineering approach for myocardial repair." *Biomaterials* 30 ; 7514-23, 2011.
- <sup>21</sup> B. L. Seal, T. C. Otero, A. Panitch. "Polymeric biomaterials for tissue and organ regeneration". *Materials science and engineering R* 34 147-230, 2001
- <sup>22</sup> « Les dermes artificiels. » *Le moniteur hospitalier* n°240, novembre 2011
- <sup>23</sup> S. E. Mutsaers, J. E. Bishop, G. McGruther, G. J. Laurent. "Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis". *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 29 (1) ; 5-17, 1997.
- <sup>24</sup> R. Tisserand, A; Avis, J. Bensouilah, Philippa Buck "Aromadermatology: Aromatherapy in the Treatment and Care of Common Skin Conditions". Radcliffe, First edition.
- <sup>25</sup> P. R. Wheater, B. Young, J. W. Heath. "Histologie fonctionnelle". Elsevier, 4<sup>ème</sup> édition
- <sup>26</sup> A. Stevens, J. Lowe. "Histologie humaine. " Deboeck, second édition
- <sup>27</sup> M. N. Menke, N. B. Menke, C. H. Boardman, R. F. Diegelmann. "Biologic therapeutic and molecular profiling to optimize wound healing." *Gynecologic oncology* 111, S87-S91, 2008.
- <sup>28</sup> P. Beldon. "Basic science of wound healing." Elsevier, 2010
- <sup>29</sup> R. Papini "Management of burn injuries of various depths." *ABC of burns*, 2006

- <sup>30</sup> R. V. Shevchenko, S. L. James and S. E. James. "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction." *Journal of the royal society Interface* 7 229-258, 2010
- <sup>31</sup> R. A. Stanton and D. Billmire "Skin resurfacing for the burned patient." *Clin. Plast. Surg.* 29 29-51, 2002
- <sup>32</sup> J. T. Shores, A. Gabriel, S. Guota. "Skin Substitutes and Alternatives: A Review." *adv skin wound care* 20:493-508; 509-10, 2007.
- <sup>33</sup> B. P. Chan, K. W. Leong. "Scaffold in tissue engineering: general approaches and tissue-specific consideration." *Eur Spine J*, 2008.
- <sup>34</sup> N. A. Peppas. "Hydrogels in Medicine and Pharmacy." CRC Press, 1987.
- <sup>35</sup> A. S. Hickey and N. A. Peppas. "Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline poly(vinyl alcohol) membranes." *J. Membr. Sci.* 107: 229-237, 1995.
- <sup>36</sup> P. B. Malafaya, G. A. Silva, R. L. Reis. "Natural-origin polymers as carriers and scaffolds for biomolecules and cell delivery in tissue engineering applications." *Advanced drug delivery review* 59 207-233, 2007.
- <sup>37</sup> M. Vert. "Polymeric biomaterials : Strategies of the past vs. strategies of the future." *Progress in polymer science* 32, 755-761, 2007
- <sup>38</sup> R. Fazel. "Biomedical Engineering - Frontiers and Challenges." Intech, 2011
- <sup>39</sup> B. A. C. Harley, H.-D. Kim, M. H. Zaman, I. V. Yannas, D. A. Lauffenburger, L. J. Gibson. "Microarchitecture of Three-Dimensional Scaffolds Influences Cell Migration Behavior via Junction Interactions." *Biophys J* 95(8): 4013-4024, 2008.
- <sup>40</sup> J.R. McMillan, M. Akiyama, M. Tanaka, S. Yamamoto, M. Goto, R. Abe, D. Sawamura, V. Shimomura, H. Shimizu. "Small-diameter porous poly (epsilon-caprolactone) films enhance adhesion and growth of human cultured epidermal keratinocyte and dermal fibroblast cells." *Tissue Eng.* 13(4) ; 789-98, 2007.
- <sup>41</sup> T. Sun, D. Norton, A.J. Ryan, S. MacNeil, J.W. Haycock. "Investigation of fibroblast and keratinocyte cell-scaffold interactions using a novel 3D cell culture system." *J Mater Sci Mater Med* 18(2) ; 321-8, 2007.
- <sup>42</sup> M.T Ende, D Hariharan, N.A Peppas. " Factors influencing drug and protein transport and release from ionic hydrogels". *Reactive Polymer* 25 ; 2-3; 127-137, 1995.
- <sup>43</sup> J. K. Tessmar, A. M. Göpferich. "Matrices and scaffold for protein delivery in tissue engineering". *Advanced drug delivery review* 59, 274-291, 2007
- <sup>44</sup> M. W. Tibitt, K. S. Anseth. "Hydrogels as extracellular Matrice mimics for 3D culture." *Biotechnology and bioengineering* 103(4); 655-63., 2009.
- <sup>45</sup> M. Kim, Y.-J.g Kim, K. Gwon, and G. Tae. "Modulation of Cell Adhesion of Heparin-Based Hydrogel by Efficient Physisorption of Adhesive Proteins." *Macromolecular Research* 20, (3) 271-276, 2012.
- <sup>46</sup> Purna Sai K., Mary Babu. "Collagen based dressings — a review." *Burns* 26, 54-62, 2000.
- <sup>47</sup> D. Voet, J. G. Voet. « Biochimie. » Deboeck, 2<sup>ème</sup> édition, 2005
- <sup>48</sup> M. G. Cascone, N. Barbani, C. Cristallini, P. Giusti, G. Ciardelli, L. Lazzeri. Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides. *J. Biomater. Sci* 12, 267-281, 2001.
- <sup>49</sup> J. Venugopal, S. Ramakrishna. "Applications of polymer nanofibers in biomedicine and biotechnology." *Appl. Biochem. Biotechnol.* 125, 147-157, 2005.
- <sup>50</sup> M. M. Stevens, H. F. Qanadilo, R. Langer, V. P. Shastri. " A rapid-curing alginate gel system: utility in periosteum-derived cartilage tissue engineering." *Biomaterials* 25, 887-894, 2005.
- <sup>51</sup> K. I. Draget, G. Skjak-Braek, O. Smidsrod. " Alginate based new materials." *Int. J. Biol. Macromol.* 21, 47-55, 2002.
- <sup>52</sup> K. I. Draget. "Polysaccharides and polyamides in the food industry, properties, production and patents." Wiley-VCH, 2005
- <sup>53</sup> M. George, T. E. Abraham. "Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs : alginate and chitosan-a review." *J. Control. Release* 114, 1-4, 2006.
- <sup>54</sup> B. Kulseng, G. Skjåk-Bræk, L. Ryan, A. Andersson, A. King, A. Faxvaag and T. Espevik. "Transplantation of alginate microcapsules. Generation of antibodies against alginates and encapsulated Porcine islet-like cell clusters." *Transplantation* 67, 978-984, 1999.
- <sup>55</sup> M. A. Fonder, A. R. Kohli and A. J. Mamelak. "Treating the chronic wound: A practical approach to the care of nonhealing wounds and wound care dressing." *American academy of dermatology*; 185-206, 2008
- <sup>56</sup> N.C. Hunt, A.M. Smith, U. Gbureck, R.M. Shelton, L.M. Grover. " Encapsulation of fibroblasts causes accelerated alginate hydrogel degradation." *Acta Biomaterialia* 6, 3649-3656, 2010.
- <sup>57</sup> Hunt NC, Shelton RM, Grover LM. " An Alginate Hydrogel Matrix for the Localised Delivery of a Fibroblast/Keratinocyte Co-Culture. *Biotechnology Journal.* 4 (5), 730-737, 2009
- <sup>58</sup> A.N. de Belder. " Dextran . "Amersham bioscience, 2003

- <sup>59</sup> M. Naessens, A. Cerdobbel, W. Soetaert, E. J. Vandamme. "Leuconostoc dextransucrase and dextran : production, properties and applications." *J. Chem. Technol.* 80, 845-860, 2005.
- <sup>60</sup> L. Ferreira, A. Rafael, M. Lamghari, M. A. Barbosa, M. H. Gil, A. M. S. Cabrita, J. S. Dordick." Biocompatibility of chemoenzymatically derived dextran-acrylate hydrogels. "Wiley Periodicals, 2004.
- <sup>61</sup> M. G. Cascone, N. Barbani, C. Cristallini, P. Giusti, G. Ciardelli, L. Lazzeri. "Bioartificial polymeric materials based on polysaccharides". *J. Biomater. Sci* 12 267-281, 2001.
- <sup>62</sup> J. F. Mano, G. A. Silva, H. S. Azevedo, P. B. Malafaya, R. A. Sousa, S. S. Silva, L. F. Boesel, J. M. Oliveira, T. C. Santos, A. P. Marques, N. M. Neves, R. L. Reis. "Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends." *J. R. Soc. Interface* 4, 999-1030, 2007.
- <sup>63</sup> E. Khor, L. Y. Lim. "Implantable applications of chitin and chitosan." *Biomaterials* 24, 2339-2349, 2003.
- <sup>64</sup> Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, S. V. Madihally. "In Vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering". *Biomaterials* 26, 7616, 2005.
- <sup>65</sup> K. Y. Lee and D. J. Mooney. "Hydrogels for Tissue Engineering." *Chemicals Reviews* 101 (7), 1869-79, 2001
- <sup>66</sup> Y. Okamoto, R. Yano, K. Miyatake, I. Tomohiro, Y. Shigemasa, S. Minami. "Effect of chitin and chitosan on blood coagulation." *Carbohydr. Polym.*, 53 337-342, 2003.
- <sup>67</sup> Y.-C. Chung, C.-Y. Chen. "Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan." *Bioresource Technology* 99 2806-2814, 2008.
- <sup>68</sup> M.P. Ribeiro, A. Espiga, D. Silva, P. Baptista, J. Henriques, C. Ferreira. "Development of a new chitosan hydrogel for wound dressing". *Wound Repair Regen* 17, 817-24, 2009.
- <sup>69</sup> D.W. Lee, H. Lim, H.N. Chong, W.S. Shim. "Advances in chitosan material and its hybrid derivatives: a review." *Open Biomater J* 1:10-20, 2009.
- <sup>70</sup> Y.W. Cho, Y.N. Cho, S.H. Chung, G. Yoo, S.W. Ko. "Water-soluble chitin as a wound healing accelerator." *Biomaterials* 20, 2139-45, 1999.
- <sup>71</sup> H. Ueno, H. Yamada, I. Tanaka, N. Kaba, M. Matsuura, M. Okumura, T. Kadosawa, T. Fujinaga. "Accelerating effects of chitosan for healing at early phase of experimental open wound in dogs." *Biomaterials* 20, 1407-14, 1999.
- <sup>72</sup> M. Ishihara, K. Nakanishi, K. Ono, M. Sato, M. Kikuchi, Y. Saito, H. Yura, T. Matsui, H. Hattori, M. Uenoyama, A. Kurita. "Photocrosslinkable chitosan as a dressing for wound occlusion and accelerator in healing process." *Biomaterials* 23:833-40, 2002.
- <sup>73</sup> X-G Chen, Z. Wang, W-S Liu, H-J Park. "The effect of carboxymethyl-chitosan on proliferation and collagen secretion of normal and keloid skin fibroblasts." *Biomaterials* 23:4609-14, 2002.
- <sup>74</sup> F.L. Mi, S.S. Shyu, Y.B. Wu, S.T. Lee, J.Y. Shyong, R.N. Ro Huang. "Fabrication and characterization of a sponge-like asymmetric chitosan membrane as a wound dressing." *Biomaterials* 22:165-73, 2001.
- <sup>75</sup> Y-C Wang, S-H Kao, H-J Hsieh." A Chemical Surface Modification of Chitosan by Glycoconjugates To Enhance the Cell-Biomaterial Interaction *Biomacromolecule*, 4 (2), 224-231, 2003.
- <sup>76</sup> Y. Huang, S. Onyeri, M. Siewe, A. Moshfeghian, S. V. Madihally. "In vitro characterization of chitosan-gelatin scaffolds for tissue engineering." *Biomaterials Volume 26 Issue 36* 7616-7627, 2005.
- <sup>77</sup> T. Majima, T. Funakosi, N. Iwasaki, S.T. Yamane, K Harada, S Nonaka, A. Minami, S. Nishimura." Alginate and chitosan polyion complex hybrid fibers for scaffolds in ligament and tendon tissue engineering". *J Orthop Sci.*, 302-7, 2005.
- <sup>78</sup> R. A.A. Muzzarelli." Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone". *Carbohydrate Polymers* 76, 167-182, 2009.
- <sup>79</sup> T. C. Laurent, U. B. G. Laurent, J. R. E. Fraser. " Fonction of hyaluronan ". *Ann Rheum Dis* 54 429-432, 1995.
- <sup>80</sup> J. Necas, L. Bartosikova, P. Brauner, J. Kolar. "Hyaluronic acid (hyaluronan): a review." *Veterinarni Medicina*, 53 (8), 397-411, 2008.
- <sup>81</sup> M. Isemura, Z. Yosizawa, T. Koide, T. Ono. "Interaction of fibronectin and its proteolytic fragments with hyaluronic acid." *J Biochem* 91(2):731-4, 1982.
- <sup>82</sup> P.H. Weigel, S.J. Frost, R.D. LeBoeuf, C.T. McGary. "The specific interaction between fibrin(ogen) and hyaluronan: possible consequences in haemostasis, inflammation and wound healing." *Ciba Found Symp* 143:248-61, 1989.
- <sup>83</sup> R.D. Price, M.G. Berry, H. A. Navsaria." Hyaluronic acid: the scientific and clinical evidence" *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* 60, 1110-1119, 2007.

- <sup>84</sup> C. E. Schanté, G. Zuber, C. Herlin, T. F. Vandamme. "Chemical modifications of hyaluronic acid for the synthesis of derivatives for a broad range of biomedical applications." *Carbohydrate Polymers* 85, 469–489, 2011.
- <sup>85</sup> D. Campoccia, P. Doherty, M. Radice, P. Brun, G. Abatangelo, D.F. Williams. "Semisynthetic resorbable materials from hyaluronan esterification." *Biomaterials* 19 (23), 2101-27, 1998.
- <sup>86</sup> S. Ouasti, R. Donno, F. Cellesi, M.J. Sherratt, G. Terenghi, N. Tirelli. "Network connectivity, mechanical properties and cell adhesion for hyaluronic acid/PEG hydrogels." *Biomaterials*. 32(27) ,6456-70, 2011.
- <sup>87</sup> B. Lewin, L. Cassimeris, V. R. Lingappa, G. Plopper. "Cells ". Jones & Bartlett Learning, 2006.
- <sup>88</sup> J. C. Rodriguez-Cabello, J. Reguera, A. Girotti, M. Alonso, A. M. Testera. "Developing functionality in elastin like polymer by increasing their molecular complexity : the power of the genetic engineering approach." *Prog. Polym. Sci.* 30, 1119-1145, 2005.
- <sup>89</sup> Y. Chunlin, P. J. Hillas, J. A. Buez, M. Nokelainen, J. Balan, J. Tang, R. Spiro, J. W. Polarek. "The application of recombinant human collagen in tissue engineering". *Biodrugs* 18, 103-119, 2004.
- <sup>90</sup> E. Engvall, E. Ruoslahti. "Binding of soluble form of fibroblast surface protein, fibronectin, to collagen." *Int J Cancer*. 20(1), 1-5, 1977.
- <sup>91</sup> M. Ishikawa-Sakurai, M. Hayashi. "Two collagen-binding domains of vitronectin." *Cell Struct Funct.* (4):253-9, 1993.
- <sup>92</sup> C. Egles, J. A. Garlick, Y. Shamis. "Three-Dimensional Human Tissue Models of Wounded Skin." *Methods Mol Biol* 585, 345–359, 2010.
- <sup>93</sup> A. K. Lynn, I. V. Yannas, W. Bonfield. "Antigenicity and immunogenicity of collagen." *J. Biomed. Mater. Res.*, 71B, 343–354, 2004.
- <sup>94</sup> S. Huang, X. Fu. Naturally derived materials-based cell and drug delivery systems in skin regeneration." *Journal of Controlled Release* 142, 149–159, 2010.
- <sup>95</sup> I. Rault, V. Frei, D. Herbage, N. Abdul-Malak, A. Huc." Evaluation of different chemical methods for cross-linking collagen gel, films and sponges." *Journal of Materials Science: Materials in Medicine* 7 (4), 215-221, 1996.
- <sup>96</sup> B. Chevally, N. Abdul-Malak, D. Herbage. "Mouse fibroblasts in long-term culture within collagen three-dimensional scaffolds: Influence of crosslinking with diphenylphosphorylazide on matrix reorganization, growth, and biosynthetic and proteolytic activities." *Journal of Biomedical Materials Research* 49 (4), 448–459, 2000.
- <sup>97</sup> L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen. " Biodegradability and cell-mediated contraction of porous collagen scaffolds: The effect of lysine as a novel crosslinking bridge. " *Journal of Biomedical Materials Research PartA* 71A (2), 334–342, 2004.
- <sup>98</sup> C. Mu, K. Zhang, W. Lin, D. Li. "Ring-opening polymerization of genipin and its long-range crosslinking effect on collagen hydrogel." *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, doi: 10.1002/jbm.a.34338, 2012.
- <sup>99</sup> D. Y.S. Chau, R. J. Collighan, E. A. M. Verderio, V. L. Addy, Martin Griffin. "The cellular response to transglutaminase-cross-linked collagen." *Biomaterials Volume 26 Issue 33 Pages 6518–6529*, 2005.
- <sup>100</sup> C. Helarya, I. Bataille, A. Abe, C. Illoul, A. Anglo, L. Louedec, D. Letourneur, A. Meddahi-Pellé, M. M. Giraud-Guille. "Concentrated collagen hydrogels as dermal substitutes." *Biomaterials* 31 (3), 481–490, 2010.
- <sup>101</sup> B. Shekhar Jha, C. E. Ayres, J. R. Bowman, T. A. Telemeco, S. A. Sell, G. L. Bowlin, and D. G. Simpson. "Electrospun Collagen: A Tissue Engineering Scaffold with Unique Functional Properties in a Wide Variety of Applications." *Journal of Nanomaterials* 2011, Article ID 348268, 2011
- <sup>102</sup> J.N. Kearney "Clinical evaluation of skin substitutes" *Burns* 27:545–551, 2001.
- <sup>103</sup> A. R. Fitton, P. Drew, W.A. Dickson."The use of a bilaminar artificial skin substitute (Integra™) in acute resurfacing of burns: an early experience." *British Journal of Plastic Surgery* 54, 208–212, 2001.
- <sup>104</sup> U. Schönfelder, M. Abel, C. Wiegand, D. Klemm, P. Elsner, U-C Hipler. "Influence of selected wound dressings on PMN elastase in chronic wound fluid and their antioxidative potential in vitro." *Biomaterials* 26, 6664–6673, 2005.
- <sup>105</sup> R Sanjay, M Mancy, S Brijesh. "The Efficacy of Collagen Membrane as a Biodegradable Wound Dressing Material for Surgical Defects of Oral Mucosa: A Prospective Study." *Journal of oral and maxillofacial surgery: official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons* 67, 1600–1606, 2009.
- <sup>106</sup> M.P. Curran, G.L. Plosker "Bilayered Bioengineered Skin Substitute (Apligraf®): A Review of its Use in the Treatment of Venous Leg Ulcers and Diabetic Foot Ulcers." *BioDrugs* 16, 439–455, 2002.
- <sup>107</sup> J Still, P Glat, P Silverstein, J Griswold, D Mozingo. "The use of a collagen sponge/living cell composite material to treat donor sites in burn patients". *Burns* 29, 837–841, 2003.

- <sup>108</sup> A. Vasconcelos, A. Cavaco-Paulo. "Wound dressings for a proteolytic-rich environment." *Appl Microbiol Biotechnol* 90, 445 – 460, 2011.
- <sup>109</sup> R. A. F. Clark, L. D. Nielsen, M. P. Welch, J. M. McPherson. "Collagen matrices attenuate the collagen-synthetic response of cultured fibroblasts to TGF- $\beta$ " *Journal of cell science* 108, 1251-61, 1995.
- <sup>110</sup> Y. Tabata, Y. Ikada. "Protein release from gelatin matrices." *Advanced Drug Delivery Reviews* 287–301, 1998.
- <sup>111</sup> S. Young, M Wong, Y. Tabata, A.G. Mikos. "Gelatin as a delivery vehicle for the controlled release of bioactive molecules". *J. Control. Release* 109, 256-274, 2005.
- <sup>112</sup> C. N. Grover, R. E. Cameron, S. M. Best. Investigating the morphological, mechanical and degradation properties of scaffolds comprising collagen, gelatin and elastin for use in soft tissue engineering. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials Volume 10*, 62–74, 2012.
- <sup>113</sup> M-K Yeh, Y-G Liang, K-M Cheng, N-T Dai, C-C Liu, J-J Young. "A novel cell support membrane for skin tissue engineering: Gelatin film cross-linked with 2-chloro-1-methylpyridinium iodide." *Polymer* 52, 996-1003, 2011.
- <sup>114</sup> A. Bigia, G. Cojazzib, S. Panzavolta, N. Roveria, K. Rubinia. "Stabilization of gelatin films by crosslinking with genipin." *Biomaterials* 23 (24), 4827–4832, 2002.
- <sup>115</sup> A. Ito, A Mase, Y. Takizawa, M. Shinkai, H. Honda, K-I. Hata, M. Ueda and T. Kobayashi. "Transglutaminase-Mediated Gelatin Matrices Incorporating Cell Adhesion Factors as a Biomaterial for Tissue Engineering." *Journal of bioscience and bioengineering* 95 (2), 196-199, 2003.
- <sup>116</sup> C. M. Elvin, T. Vuocolo, A. G. Brownlee, L. Sando, M. G. Huson, N. E. Liyou, P. R. Stockwell, R. E. Lyons, M. Kim, G. A. Edwards, G. Johnson, G. A. McFarland, J. A.M. Ramshaw, J. A. Werkmeister." A highly elastic tissue sealant based on photopolymerised gelatin." *Biomaterials* 31, 8323-8331, 2010.
- <sup>117</sup> S. Sakai, K. Hirose, K. Taguchi, Y. Ogushi, K. Kawakami. "An injectable, in situ enzymatically gellable, gelatin derivative for drug delivery and tissue engineering." *Biomaterials* 30, 3371–3377, 2009.
- <sup>118</sup> S. Keten and M. J. Buehler. "Nanostructure and molecular mechanics of spider dragline silk protein assemblies." *J R Soc Interface* 67(53), 1709–1721, . 2010.
- <sup>119</sup> J. W. Kuhbier, C. Allmeling, K. Reimers, A. Hillmer, C. Kasper, B. Menger, G. Brandes, M. Guggenheim, P. M. Vogt. "Interactions between Spider Silk and Cells – NIH/3T3 Fibroblasts Seeded on Miniature Weaving Frames." *PlosOne*, 2010.
- <sup>120</sup> A. Schneider, X.Y. Wang, D.L. Kaplan, J.A. Garlick, C. Egles. "Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing." *Acta Biomater*, 5(7), 2570–2578, 2009.
- <sup>121</sup> Y. Wang, D. D. Rudym, A. Walsh, L. Abrahamsen, H-J. Kim, H. S. Kim, C. Kirker-Head, D. L. Kaplan. "In vivo degradation of three-dimensional silk fibroin scaffolds." *Biomaterials* 29, 3415 – 3428, 2008.
- <sup>122</sup> C. Vepari, D. L. Kaplan. "Silk as a biomaterial." *Prog. Polym. Sci.* 32 991–1007, 2007.
- <sup>123</sup> S. Hofmann, C. T. Wong Po Foo, F. Rossetti, M. Textor, G. Vunjak-Novakovic, D.L. Kaplan, H. P. Merkle, L. Meinel. "Silk fibroin as an organic polymer for controlled drug delivery." *J Control Release* 111, 219 – 227, 2006.
- <sup>124</sup> G.L. Bidwell, I. Fokt, W. Priebe, D. Raucher. "Development of elastin-like polypeptide for thermally targeted delivery of doxorubicin." *Biochemical Pharmacology* 73, 620 – 631, 2007.
- <sup>125</sup> K. Tsubouchi. "Wound dressing material containing silk fibroin and sericin as main component and method for preparing the same." *United States Patent 6175053*, 2001.
- <sup>126</sup> J.P. Medevitt, D.J. Tyrrell. "Removal of targeted proteases with proteinaceous wound dressings." *United States Patent 0156437 A1*, 2002.
- <sup>127</sup> A. Schneider, X.Y. Wang, D.L. Kaplan, J.A. Garlick, C. Egles. "Biofunctionalized electrospun silk mats as a topical bioactive dressing for accelerated wound healing." *Acta Biomaterialia* 5, 2570 – 2578, 2009.
- <sup>128</sup> A. Vasconcelos, G. Freddi, A. Cavaco-Paulo. "Biodegradable materials based on silk fibroin and keratin." *Biomacromolecules* 9, 1299 – 1305, 2008.
- <sup>129</sup> A. S. Wolberg. "Thrombin generation and fibrin clot structure." *Blood Reviews* 21, 131–142, 2007.
- <sup>130</sup> P. A. Janmey, J. P. Winer and J. W. Weisel. Fibrin gels and their clinical and bioengineering applications. *J. R. Soc. Interface* 6, 1–10, 2009.
- <sup>131</sup> J. W. Weisel. "Fibrinogen and Fibrin." *Advances in Protein Chemistry* 70, 247–299, 2005.
- <sup>132</sup> S. Herrick, O. Blanc-Brude, A. Gray, G. Laurent. "Molecules in focus Fibrinogen." *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 31 741–746, 1999.
- <sup>133</sup> M. W. Mosesson, K. R. Siebenlist, D. A. Meh. "The structures and biological features of fibrinogen and fibrin." *Annals of the new yorks academy of science* 936, 11-30, 2001.
- <sup>134</sup> T. J. Podor, S. Campbell, P. Chindemi, D. M. Foulon, D. H. Farrell, P. D. Walton, J. I. Weitz and C. B. Peterson. "Incorporation of vitronectin into fibrin clots: evidence for a binding interaction between vitronectin and  $\alpha$ / $\gamma$ ' fibrinogen." *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology* 277(9), 7520-7528, 2002.



- <sup>135</sup> F. Jilek, H. Hörmann. "Affinity of fibrinogen and fibrin to collagen type III and denatured collagen type I demonstrated at low temperature." *Thrombosis Research* Volume 21, 265-72, 1981.
- <sup>136</sup> F. M. Shaikh, A. Callaghan, E. G. Kavanagh, P. E. Burke, P. A. Grace, T.M. McGloughlin. "Fibrin: A Natural Biodegradable Scaffold in Vascular Tissue Engineering." *Cells Tissus Organs* 084, 2008
- <sup>137</sup> V. Ronfard, H. Broly, V. Mitchell, J. P. Galizia, D. Hochart, E. Chambon, P. Pellerin and J. J. Huart. "Use of human keratinocytes cultured on fibrin glue in the treatment of burn wounds." *Burns* 17 (3) 181-184, 1991.
- <sup>138</sup> A Meana., J. Iglesias, M. Del Rio, F. Larcher, B. Madrigal, M. F. Fresno, C. Martin, F. San Roman, and F. Tevar "Large surface of cultured human epithelium obtained on a dermal matrix based on live fibroblast-containing fibrin gel" *Burns* 24 (7) 621-630, 1998.
- <sup>139</sup> T. Aper, A. Schmidt, M. Duchrow, H.P. Bruch. "Autologous blood vessels engineered from peripheral blood sample." *Eur J Vasc Endovasc Surg* 33:33 – 39, 2007.
- <sup>140</sup> J.P. Collet, H. Shuman, R.E. Ledger, S. Lee, J.W. Weisel. "The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot." *Proc Natl Acad Sci USA* 102:9133–7, 2005;.
- <sup>141</sup> S. A. Sell, P. S. Wolfe, K. Garg J. M. McCool, Isaac A. Rodriguez and Gary L. Bowlin. "The Use of Natural Polymers in Tissue Engineering: A Focus on Electrospun Extracellular Matrix Analogues." *Polymers* 2(4), 522-553, 2010.
- <sup>142</sup> E. Briganti, D. Spiller, C. Mirtelli, S. Kull, C. Counoupas, P. Losi, S. Senesi, R. Di Stefano, G.Soldani. "A composite fibrin-based scaffold for controlled delivery of bioactive pro-angiogenic growth factors." *Journal of Controlled Release* 142(1), 14-21, 2009.
- <sup>143</sup> S. E. Stabenfeldt, M. Gourley, L. Krishnan, J. B. Hoying, T. H. Barker. "Engineering fibrin polymers through engagement of alternative polymerization mechanisms." *Biomaterials* 33, 535-544, 2012.
- <sup>144</sup> K. M. Lorentz, S. Kontos, P. Frey, J. A. Hubbell. "Engineered aprotinin for improved stability of fibrin biomaterials." *Biomaterials* 32, 430-438, 2011.
- <sup>145</sup> E. Akpalo, V. Larreta-Garde. « Increase of fibrin gel elasticity by enzyme : a kinetical approach." *Acta biomaterialia* 6, 396-402, 2010
- <sup>146</sup> I. Mironi-Harpaz, D. Yingquan Wang, S. Venkatraman, D. Seliktar. "Photopolymerization of cell-encapsulating hydrogels: Crosslinking efficiency versus cytotoxicity." *Acta Biomaterialia* Volume 8 Issue 5 Pages 1838–1848, 2012.
- <sup>147</sup> W Ho, B Tawil, J.C. Dunn, B.M. Wu. "The behavior of human mesenchymal stem cells in 3D fibrin clots: dependence on fibrinogen concentration and clot structure." *Tissue Eng* 12(6), 1587-95, 2006.
- <sup>148</sup> W John C. Middleton, A. J. Tipton. "Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices" *Biomaterials* 21, 2335-2346, 2000.
- <sup>149</sup> L. S. Nair, C. T. Laurencin. « Biodegradable polymer as biomaterials." *Progress in polymer science* 32, 762-798, 2007.
- <sup>150</sup> P. A. Gunatillake and R. Adhikari. "Biodegradable synthetic polymers for tissue engineering." *European Cells and Materials* 5, 1-16, 2003.
- <sup>151</sup> J.C Middleton., A.J. Tipton. "Synthetic biodegradable polymers as medical devices." *Med. Plastics Biomater* 3, 30, 1998
- <sup>152</sup> P. Zahedi, I Rezaeian, S.-O. Ranaei-Siadat, S.H. Jafari, P. Supaphol. "A review on wound dressings with emphasis on electrospun nanofibrous polymeric bandages." *Polymers advanced technologies* 21(2), 77-95, 2009.
- <sup>153</sup> K. L. Kim, D. K. Han, K. Park, S.-H. Song, J. Y. Kim, J.-M. Kim, H. Y. Ki, S. W. Yie, C.-R. Roh, E.-S. Jeon, D.-K. Kim, W. Suh. "Enhanced dermal wound neovascularization by targeted delivery of endothelial progenitor cells using an RGD-g-PLLA scaffold." *Biomaterials* 30 (22), 3742–3748, 2009.
- <sup>154</sup> L. G. Griffith. "Polymeric biomaterials." *Acta biomaterialia* 48, 263-277, 2000.
- <sup>155</sup> C.R. Reed, L. Han, A. Andraday, M. Caballero, M.C. Jack, J.B. Collins, S.C. Saba, E.G. Lobo, B.A. Cairns, J.A. van Aalst. "Composite tissue engineering on polycaprolactone nanofiber scaffolds." *Ann Plast Surg*. 62(5):505-12, 2009.
- <sup>156</sup> M P Lutolf, J A Hubbell. "Synthetic biomaterials as instructive extracellular microenvironments for morphogenesis in tissue engineering" *Nature biotechnology* 23 (1), 47-55, 2005.
- <sup>157</sup> B. V. Slaughter, S. S. Khurshid, O. Z. Fisher, A. Khademhosseini and N. A. Peppas. "hydrogels in regenerative medicine." *Adv. Mater.* 21, 3307-3329, 2009.
- <sup>158</sup> B Dvoránková, K Jr Smetana, R Königová, H Singerová, J Vacík, M Jelínková, Z Kapounková, M Zahradník. "Cultivation and grafting of human keratinocytes on a poly(hydroxyethyl methacrylate) support to the wound bed: a clinical study." *Biomaterials*. 19(1-3), 141-6, 1998.

- <sup>159</sup> M Cabodi, V.L. Cross, Z Qu, K.L. Havenstrite, S. Schwartz, A.D. Stroock. "An active wound dressing for controlled convective mass transfer with the wound bed." *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 82(1), 210-22, 2007.
- <sup>160</sup> E. Tziampazis, J. Kohn, P. V. Moghe. "PEG-variant biomaterials as selectively adhesive protein templates: model surfaces for controlled cell adhesion and migration" *Biomaterials* 21, 511-520, 2000.
- <sup>161</sup> I Banerjee, R.C. Pangule, R.S. Kane. "Antifouling coatings: recent developments in the design of surfaces that prevent fouling by proteins, bacteria, and marine organisms." *Adv Mater.*, 23(6), 690-718, 2011.
- <sup>162</sup> K. Bott, Z. Upton, K. Schrobback, M. Ehrbar, J. A. Hubbell, M. P. Lutolf, S. C. Rizzi. "The effect of matrix characteristics on fibroblast proliferation in 3D gels." *Biomaterials* 31, 8454-8464, 2010.
- <sup>163</sup> C. M. Hassan, N. A. Peppas. "Structure and application of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by Freezing/thawing Methods." *Advances in polymer Science* 153, 37-65, 2000
- <sup>164</sup> C. R. Nuttelman, S.M. Henry, K. S. Anseth. "Synthesis and characterization of photocrosslinkable, degradable poly(vinyl alcohol)-based tissue engineering scaffolds." *Biomaterials* 23, 3617-3626, 2002.
- <sup>165</sup> R. H. Schmedlen, K. S. Masters, J. L. West. "Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering." *Biomaterials* 23, 4325-4332, 2002.
- <sup>166</sup> L. H. Sperling, *Interpenetrating Polymer Networks*. In: Sperling LH, Klemperer D, Utracki LA, editors. *Advances in chemistry series*, 239 (1994) 3-38
- <sup>167</sup> A.D. Jenkins, P. Kratochvíl, R.F.T. Stepto, U.W. Suter, "Glossary of basic terms in polymer science" *Pure Appl. Chem.* 68, 2305, 1996.
- <sup>168</sup> M. Varkey, J. Ding, E. E. Tredget. "Differential collagen-glycosaminoglycan matrix remodeling by superficial and deep dermal fibroblasts: potential therapeutic targets for hypertrophic scar." *Biomaterials* 30, 7581-91, 2011.
- <sup>169</sup> S. Suri, C. E. Schmidt. "Photopatterned collagen-hyaluronic acid interpenetrating polymer network hydrogels." *Acta Biomaterialia* 5 (7), 2385-2397, 2009.
- <sup>170</sup> A. Vasconcelosa, A. C. Gomesb, A. Cavaco-Pauloa. « Novel silk fibroin/elastin wound dressings." *Acta Biomaterialia* 8 (8), 3049-3060, 2012.
- <sup>171</sup> W. Xiao, J. He, J. W. Nichol, L. Wang, C. B. Hutson, B. Wang, Y. Du, H. Fan and A Khademhosseini. "Synthesis and characterization of photocrosslinkable gelatin and silk fibroin interpenetrating polymer network hydrogels." *Acta Biomater.* 7(6): 2384-2393, 2011.
- <sup>172</sup> L. Ma, C. Gao, Z. Mao, J. Zhou, J. Shen, X. Hu." Collagen/chitosan porous scaffolds with improved biostability for skin tissue engineering." *Biomaterials* 24, 4833-4841, 2003.
- <sup>173</sup> F. Lee, M. Kurisawa. "Formation and Stability of Interpenetrating Polymer Network Hydrogels Consist of Fibrin and Hyaluronic Acid for Tissue Engineering." *Acta Biomaterialia*, dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.036, 2012.
- <sup>174</sup> T. Shalumon, K.H. Anulekha, K.P. Chennazhi, H. Tamura, S.V. Nair, R. Jayakumar. "Fabrication of chitosan/poly(caprolactone) nanofibrous scaffold for bone and skin tissue engineering." *International Journal of Biological Macromolecules* 48, 571-576, 2011.
- <sup>175</sup> N.-T. Dai, M.R. Williamson, N. Khammo, E.F. Adams, A.G.A. "Coombes. Composite cell support membranes based on collagen and polycaprolactone for tissue engineering of skin." *Biomaterials* 25 4263-4271, 2004.
- <sup>176</sup> T. Siritienthonga, J. Ratanavarapornb, P. Aramwit. "Development of ethyl alcohol-precipitated silk sericin/polyvinyl alcohol scaffolds for accelerated healing of full-thickness wounds." *International Journal of Pharmaceutics*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijpharm.2012.09.043>, 2012.
- <sup>177</sup> Y. H. Bae, K. M. Huh, Y. Kim, K.-H. Park. "Biodegradable amphiphilic multiblock copolymers and their implications for biomedical applications." *Journal of Controlled Release* 64 (1-3), 3-13, 2000.
- <sup>178</sup> R. V. Shevchenko, S ; L. James S. E. James. "A review of tissue-engineered skin bioconstructs available for skin reconstruction." *J. R. Soc. Interface* 7, 229-258, 2010.
- <sup>179</sup> F. Brayea, A. Hautier, C. Bouez, O. Damour. « Les substituts cutanés reconstruits en laboratoire : application au traitement des brûlés. » *Pathologie Biologie* 53, 613-617, 2005.
- <sup>180</sup> A. D. Metcalfe and M. W. J. Ferguson. "Tissue engineering of replacement skin: the crossroads of biomaterials, wound healing, embryonic development, stem cells and regeneration." *J. R. Soc. Interface* 4, 413-437, 2007.
- <sup>181</sup> N. Scuderi, T. Anniboletti, B. Carlesimo and M. Giuseppina Onesti. "Clinical Application of Autologous Three-cellular Cultured Skin Substitutes Based on Esterified Hyaluronic Acid Scaffold: Our Experience" *in vivo* 23, 991-1004, 2009.

- <sup>182</sup> L. J. Currie, J. R. Sharpe, R. Martin. "The Use of Fibrin Glue in Skin Grafts and Tissue-Engineered Skin Replacements: A Review." *plastic and reconstructive surgery* 108(6),1713-26 , 2001.
- <sup>183</sup> X. Feng, R.A. Clark, D. Galanakis, M. G. Tonnesen. "Fibrin and collagen differentially regulate human dermal microvascular endothelial cell integrins: stabilization of  $\alpha v/\beta 3$  mRNA by fibrin." *J Invest Dermatol.* 113(6), 913-9, 1999.
- <sup>184</sup> B. Vailhé, X. Ronot, P. Tracqui, Y. Usson, L. Tranqui. "In vitro angiogenesis is modulated by the mechanical properties of fibrin gels and is related to  $\alpha v/\beta 3$  integrin localization." *In Vitro Cell Dev Biol Anim.* 33(10), 763-73, 1997.
- <sup>185</sup> J.P. Collet, Shuman H, R.E. Ledger, S Lee, J.W. Weisel. "The elasticity of an individual fibrin fiber in a clot". *Proc Nat Acad Sci USA*; 102:9133–7, 2005.
- <sup>186</sup> C. G. Williams, A. N. Malik, T. K. Kim, P. N. Manson, J. H. Elisseeff. "Variable cytocompatibility of six cell lines with photoinitiators used for polymerizing hydrogels and cell encapsulation" *Biomaterials* 26 1211–1218, 2005.
- <sup>187</sup> G. Petersen, L.M. Torell, S. Panero, B. Scrosti, C.J. da Silva, M. Smith. "Ionic interaction interaction in  $MCF_3SO_3$ -polyether complexes containing mono-, di- and tri-valent cation." *Solid State Ionics* 60, 55-60, 1993.
- <sup>188</sup> A.J. Engler, S. Sen, H.L. Sweeney, D.E. Disher. "Matrix elasticity directs stem cell lineage specification." *Cell* 126, 677-89, 2006.
- <sup>189</sup> T.V. Anilkumar, Jaseer Muhamed, Anumol Jose, Arun Jyothi, P.V. Mohanan, Lissy K. Krishnan. "Advantages of hyaluronic acid as a component of fibrin sheet for care of acute wound" *Biologicals* 39:81-8, 2011.
- <sup>190</sup> F. Zhang, C. He, L. Cao, W. Feng, H. Wang, X. Mo, J. Wang. "Fabrication of gelatin–hyaluronic acid hybrid scaffolds with tunable porous structures for soft tissue engineering". *International Journal of Biological Macromolecules* ; 48(3):474-81, 2011.
- <sup>191</sup> J. S. Mao, H. F. Liu, Y. J. Yin, K. D. Yao. "The properties of chitosan–gelatin membranes and scaffolds modified with hyaluronic acid by different methods". *Biomaterials* 9:1621-9, 2003.
- <sup>192</sup> Kwok, Y. Alan; G. Greg. D. H. Q. Solomon "Synthetic hydrogels 3. Solvent effects on poly(2-hydroxyethyl methacrylate) networks". *Polymer* 45: 4017–4027, 2004.
- <sup>193</sup> M. Kobayashi, and H. S. Hyu. "Development and Evaluation of Polyvinyl Alcohol-Hydrogels as an Artificial Articular Cartilage for Orthopedic Implants". *Materials* 3 2753-2771, 2010.
- <sup>194</sup> H. Kobayashi . "PVA-HAp nano composites for artificial cornea". *Advances in Science and Technology Vol* 53, 2006.
- <sup>195</sup> N.E. Vrana, K. Matsumura, S.H. Hyon, L.M. Geever, J.E. Kennedy, J.G. Lyons, C.L. Higginbotham, P.A. Cahill, G.B. McGuinness. "Cell encapsulation and cryostorage in PVA-gelatin cryogels: incorporation of carboxylated  $\epsilon$ -poly-L-lysine as cryoprotectant." *J Tissue Eng Regen Med* 4:280-90, 2012.
- <sup>196</sup> Meirigeng Qi, Yuanjun Gu, Naoaki Sakata, Dohoon Kim, Yasumasa Shirouzu, Chizuru Yamamoto, Akihito Hiura, Shoichiro Sumi, Kazutomo Inoue. "PVA hydrogel sheet macroencapsulation for the bioartificial pancreas" *Biomaterials* 27:5885-92, 2004.
- <sup>197</sup> D. A. Barrett, M. S. Hartshorne, M. A. Hussain, P. N. Shaw, and M. C. Davies. "Resistance to Nonspecific Protein Adsorption by Poly(vinyl alcohol) Thin Films Adsorbed to a Poly(styrene) Support Matrix Studied Using Surface Plasmon Resonance". *Anal. Chem.* 73,5232 – 5239, 2001.
- <sup>198</sup> C.C. DeMerlis, D.R. Schoneker. "Review of the oral toxicity of polyvinyl alcohol (PVA)". *Food and Chemical Toxicology* 41 319–326, 2003.
- <sup>199</sup> F.S Moolman, M Meunier, P.W. Labuschagne, P.A. Truter. "Compatibility of polyvinyl alcohol and poly(methyl vinyl ether-co-maleic acid) blends estimated by molecular dynamics." *Polymer* vol. 46(16) pp 6192-6200, 2005.
- <sup>200</sup> M. Fontanille, Y. Gnamou « Chimie et physico-chimie des polymères » Edition Dunod (2010)
- <sup>201</sup> S.R. Stauffer, N.A. Peppas. "Poly(vinyl alcohol) hydrogels prepared by freezing-thawing cycling processing." *Polym.* 33:3932–3936, 1992.
- <sup>202</sup> F. Urushizaki, H Yamagushi, K Nakamura, S Numajiri, K Sugibayashi, Y Morimoto. "Swelling and mechanical properties of poly(vinyl alcohol) hydrogels." *International Journal of Pharmaceutics* ; 58:135–42, 1990.
- <sup>203</sup> A.S. Hickey, N.A. Peppas. "Mesh size and diffusive characteristics of semicrystalline poly (vinyl alcohol) membranes prepared by freezing/thawing techniques." *Journal of Membrane Science* 1995;107:229–37.
- <sup>204</sup> N.A. Peppas, J.E. Scott. "Controlled release from poly (vinyl alcohol) gels prepared by freezing-thawing processes." *Journal of Controlled Release* 18:95–100, 1992.

- <sup>205</sup> A.M. Araujo, M.T. Neves Jr, W.M. Azevedo, G.G. Oliveira, D.L. Ferreira Jr, R.A.L. Coelho, E.A.P. Figueiredo and L.B. Carvalho Jr. "Polyvinyl alcohol-glutaraldehyde network as a support for protein immobilization" *Biotechnology Techniques* Vol 11 No 2 pp. 67–70, 1997.
- <sup>206</sup> O. Robert, M.A. Beauchamp, M. B. G. St. Clair, T. R. Fennel, D. O. Clarke, K. T. Morgan, and F. W. Kari. "A Critical Review of the Toxicology of Glutaraldehyde". *Critical Reviews in Toxicology* 22 3,4: 143-174, 1992.
- <sup>207</sup> R. H. Schmedlen, S. Kristyn, J. L. West. "Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering". *Biomaterials* 23 4325–4332, 2002.
- <sup>208</sup> P. Martens, K.S. Anseth "Characterization of hydrogels formed from acrylate modified poly(vinyl alcohol) macromers" *Polymer* 41 7715–7722, 2000.
- <sup>209</sup> S. J. Bryant, K. A. Davis-Arehart, N. Luo, R. K. Shoemaker, J. A. Arthur and K. S. Anseth "Synthesis and Characterization of Photopolymerized Multifunctional Hydrogels: Water-Soluble Poly(Vinyl Alcohol) and Chondroitin Sulfate Macromers for Chondrocyte Encapsulation" *Macromolecules* 37 6726-6733, 2004.
- <sup>210</sup> I. Levental, P. C. George and P. A. Janmey. "Soft biological materials and their impact on cell function". *Soft Matter* 3 299-306, 2007.
- <sup>211</sup> C. M. Hassan, N. A. Peppas. "Structure and application of poly(vinyl alcohol) hydrogels produced by conventional crosslinking or by freezing/thawing methods." *Advances in polymer science* vol.153, 2000
- <sup>212</sup> E. A. Ryan, L. F. Mockros, J. W. Weisel and L. Lorand. "Structural Origins of Fibrin Clot Rheology". *Biophysical Journal* Vol 77 2813–2826, 1999.
- <sup>213</sup> S. E. Stabenfeldt, M. Gourley, L. Krishnan, J. Hoying, T. H. Barker. "Engineering fibrin polymers through engagement of alternative polymerization mechanisms" *Biomaterials* 33 535-544, 2012.
- <sup>214</sup> B. Hinz "Formation and Function of the Myofibroblast during Tissue Repair" *Journal of Investigative Dermatology* 127 526–537, 2007.
- <sup>215</sup> M Isemura, Z Yosizawa, T Koide, T Ono. "Interaction of fibronectin and its proteolytic fragments with hyaluronic acid." *J Biochem.* 91 2 :731-4, 1982.
- <sup>216</sup> S. N. Emir and J. L. West. "Synthetic Materials in the Study of Cell Response to Substrate Rigidity." *Annals of Biomedical Engineering* Vol. 38 pp. 2–20, 2010.
- <sup>217</sup> L. Bačáková, E. Filová, F. Rypáček, V. Svorčík, V. Starý. "Cell Adhesion on Artificial Materials for Tissue Engineering." *Physiol. Res.* 53 (Suppl. 1): S35-S45, 2004.
- <sup>218</sup> C. R. Nuttelman, D. J. Mortisen, S. M. Henry, K. S. Anseth. "Attachment of fibronectin to poly(vinyl alcohol) hydrogels promotes NIH3T3 cell adhesion, proliferation, and migration." *J Biomed Mater* 57: 217–223, 2001.
- <sup>219</sup> C. S. Chen, M. Mrksich, S. Huang, G. M. Whitesides, D. E. Ingber. "Geometric Control of Cell Life and Death." *Science* 30 :Vol. 276 no. 5317 pp. 1425-1428, 1997.
- <sup>220</sup> I. Vroman and L. Tighzert "Biodegradable Polymers" *Materials* 2 307-344, 2009.
- <sup>221</sup> G. Grogan. "Emergent mechanistic diversity of enzyme-catalysed  $\beta$ -diketone cleavage." *Biochem. J.* 388 721–730, 2005.
- <sup>222</sup> Y. Kawagoshi, Y. Mitihiro, M. Fujita and S. Hashimoto. "Production and recovery of an enzyme from *Pseudomonas vesicularis* var. *povalolyticus* PH that degrades polyvinyl alcohol" *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 13 (1), 63-67, 1997.
- <sup>223</sup> L. S. Nair, C. T. Laurencin Y. Kawagoshi, Y. Mitihiro, M. Fujita and S. Hashimoto. "Biodegradable polymers as biomaterials." *Progress in polymer science* Vol 32 Issues 8–9 p 762–798, 2007.
- <sup>224</sup> T.B. Eronina, N.B. Livanova, N.A. Chebotareva, B.I. Kurganov, S. Ltlo, OJ Graves. "Deimination of glycogen phosphorylase b by peptidylarginine a deiminase, Influence on the kinetical characteristics and dimer-tetramer transition." *Biochimie*, 78(4), 253-8, 1996.
- <sup>225</sup> L. Patthy, E. L. Smith. « Reversible modification of arginine residues. Application to sequence studies by restriction of tryptic hydrolysis to lysine residues. » *The journal of biological chemistry* 25;250(2):557-64, 1975.
- <sup>226</sup> Y. Gotoh, M. Tsukada, N. Minoura. "Chemical modification of the arginyl residue in silk fibroin : Reaction of 1,2-cyclohexanedione in aqueous alkaline medium." *International Journal of Biological Macromolecules* 9(1), 41-4, 1996.
- <sup>227</sup> K. Takahashi. "The Reaction of Phenylglyoxal with Arginine Residues in Proteins". *The Journal of Biological Chemistry* 243(23), 6171-9, 1968.
- <sup>228</sup> M. Foster, J.H. Harrison. "Selective chemical modification of arginine residues in mitochondrial malate dehydrogenase". *Biochemical and Biophysical research communication* 58(1), 263-7, 1974.
- <sup>229</sup> D. Figeys. « Industrials proteomics : application for biotechnology and pharmaceuticals. » John Wiley and Sons, 2005.

- <sup>230</sup> J. Torbet. « Fibrin Assembly in Human Plasma and Fibrinogen/Albumin Mixtures ». *Biochemistry* 25, 5309-5314, 1986.
- <sup>231</sup> C.H.Nair and D.P.Dhall. « Studies on fibrin network structure: the effect of some plasma proteins. » *thrombosis research* 61 315-325, 1991.
- <sup>232</sup> Y. Chen, D. J. Abraham, X. Shi-wen, J. D. Pearson, C. M. Black, K. M. Lyons and A. Leask. « CCN2 (Connective Tissue Growth Factor) Promotes Fibroblast Adhesion to Fibronectin ». *Mol Biol Cell* 15(12), 5635–5646, 2004.
- <sup>233</sup> M. Pegueroles, J. A. Planell, C. Aparicio, C. Tonda-Turo, F.-J. Gil. « Adsorption of Fibronectin, Fibrinogen, and Albumin on TiO: Time-Resolved Kinetics, Structural Changes, and Competition Study. » *Biointerphases* 7, 48, 2012.
- <sup>234</sup> J. Whelan. « The Biology of Hyaluronan. » CIBA Foundation Symposium, 2008.
- <sup>235</sup> K. M. Hakkinen, J. S. Harunaga, A. D. Doyle and K. M. Yamada. "Direct Comparisons of the Morphology, Migration, Cell Adhesions, and Actin Cytoskeleton of Fibroblasts in Four Different Three-Dimensional Extracellular Matrices." *TISSUE ENGINEERING: Part A* 17(5 and 6), 2011
- <sup>236</sup> K. Shapira-Schweitzer, M. Habib, L. Gepstein, D. Seliktar. « A photopolymerizable hydrogel for 3-D culture of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and rat neonatal cardiac cells. » *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46, 213–224, 2009.
- <sup>237</sup> K. Shapira-Schweitzer, M. Habib, L. Gepstein, D. Seliktar. "A photopolymerizable hydrogel for 3-D culture of human embryonic stem cell-derived cardiomyocytes and rat neonatal cardiac cells." *Journal of Molecular and Cellular Cardiology* 46, 213–224, 2009.
- <sup>238</sup> R. O. Hynes and K. M. Yamada. « Fibronectins: Multifunctional Modular Glycoproteins. » *JCB* 95(2 Pt 1), 369-77, 1982.

# LISTE DES FIGURES ET TABLEAUX

## I] FIGURE :

Figure 1 : Evolution des biomatériaux de 1950 à nos jours [].....	6
Figure 2 : représentation schématique des paramètres d'un biomatériau utilisé en ingénierie tissulaire [].....	8
Figure 3 : Représentation schématique des différentes couches de la peau humaine [].....	9
Figure 4 : récapitulatif de la gestion des plaies en fonction de leur gravité .....	12
Figure 5 : Classification des substituts cutanés [ <sup>30</sup> ].....	13
Figure 6 : (A) Récolte, (B) extension [1] et (C) application d'autogreffe de peau humaine [29].....	13
Figure 7 : Classification des hydrogels selon R. Fazel [] .....	16
Figure 8 : Exemple de structure de l'alginate [] .....	18
Figure 9 : Structure du dextran .....	19
Figure 10 : structure du chitosan [] .....	20
Figure 11 : structure de l'acide hyaluronique [62]. .....	21
Figure 12 : Formation des fibres de collagène de type I. [ <sup>1</sup> ] .....	23
Figure 13 : méthode de préparation de la gélatine à partir du collagène [].....	25
Figure 14: structure des fibres de soie [].....	26
Figure 15 : représentation schématique de la structure du fibrinogène.[ <sup>129</sup> ].....	27
Figure 16 : représentation schématique de la formation du réseau de fibrine physiologique [ <sup>129</sup> ]. ....	27
Figure 17 : Structures chimiques du PLA et du PGA []. .....	31
Figure 18 : Structure chimique du PCL [149].....	32
Figure 19 : structure chimique du PHEMA [].....	32
Figure 20 : structure chimique du POE [ <sup>157</sup> ]. .....	33
Figure 21 : structure chimique du PVA [ <sup>157</sup> ]. .....	34
Figure 22 : Formation du réseau de fibrine sous l'action de la thrombine sur le fibrinogène.....	65
Figure 23 : Evolution de l'activité métabolique (réduction d'une solution d'Alamar Blue <sup>®</sup> 10% (v/v) pendant 3h) en fonction du temps de culture de CHO déposés à la surface des matériaux RS Fb(2,5%) (■), polystyrène traité pour la culture cellulaire (●) et lamelles de verres (▲) .....	67
Figure 24 : Observation en microscopie à épifluorescence (objectif x20) de CHO à la surface de RS Fb(2,5%) après 24h (A) et 96h (B) de culture ainsi qu' à la surface de lamelle de verre aux mêmes temps respectivement (C) et (D). Le noyau apparait en bleu (coloration au Dapi) et le cytosquelette en vert (coloration à la phalloïdine couplée FITC).....	68
Figure 25 : schémas de photoréticulation du PEGDM (A) en un réseau POE (B).....	69
Figure 26 : schéma de synthèse des matériaux RIPs à base de PEGDM et de Fg .....	70
Figure 27 : Photographies des parties du moule (A) fond où sont collés les supports de Téflon <sup>®</sup> (B) couvercle (C) système complet fermé.....	71

Figure 28 : Différentes formes et surfaces des RIPs synthétisés avec le nouveau moule. De gauche à droite : disque de 1,5cm <sup>2</sup> , rectangle d'environ 9cm <sup>2</sup> et disque de 19 cm <sup>2</sup> .....	71
Figure 29 : Photographies des différents matériaux (A1) RS POE750, (A2) RIPPOE750/Fb(0,5%), (A3) RIP POE750/Fb(1,25%), (A4) RIP POE750/Fb(2,5%), et (B2) RIP POE550/Fb(0,5%), (B3) RIP POE550/Fb(1,25%) et (B4) RIP POE550/Fb(2,5%). .....	72
Figure 30 : Valeurs de module de stockage (A) et de perte (B), des RIPs POE750/Fb ( ■ ) et POE550/Fb ( ▲ ) en fonction de la concentration en Fb. ....	76
Figure 31 : Module de stockage E' (courbes supérieures) and tanδ (courbes inférieures) de RIP secs : (A) RIP POE750/Fb et (B) RIP POE550/Fb avec différentes concentrations massiques en Fb: (□) 0,5 (○) 1,25, et (+) 2,5%. Les réseaux simples (●)PEO750 et RS PEO550 sont reportés pour comparaison. ....	78
Figure 32 : Intensité de fluorescence du test Alamar Blue après 3h d'incubation à 37°C et 5% CO <sub>2</sub> en atmosphère humide des RIPs POE550/Fb (A) et RIPs POE750/Fb (B) à des concentrations en Fb de 0.5 ( ▲ ), 1.25 ( ■ ), et 2.5 (w/v) ( ◆ ). L'activité mitochondriale des cellules présentes à la surface des matériaux est comparée à celle à la surface du contrôle (lamelle de verre) ( ● ).....	81
Figure 33 : Observation en microscopie à épifluorescence des RIPs POE550 [I] et POE750 [II] après 24h (A) et 96h (B) d'incubation avec une suspension cellulaire de 50000 cellules/cm <sup>2</sup> . Les RIPs sont préparés avec des concentrations en Fb de 0,5% (1), 1,25% (2) et 2,5% (3). ....	82
Figure 34 : Schéma de la copolymérisation entre le PEGDM et HEMA.....	86
Figure 35 : Photographies des différents co-réseaux et RIPs à base POEcoPHEMA.....	86
Figure 36 : Taux de gonflement ( ■ ) et réversibilité ( □ ) mesurés sur des RIPs POEcoPHEMA/Fb en fonction de la proportion de PHEMA dans le co-réseau.....	87
Figure 37 : Formule chimique du (A) N-méthacrylamidoacétaldehyde diméthyle acétal, (B) du glycidyl acrylate et (C) du 2-isocyanatoethyl méthacrylate .....	89
Figure 38 : Comparaison des produits obtenus selon le mode de purification: Solution de PVAm diluée à 3% et précipitation dans l'acétone (A), Solution de PVAm 20% et précipitation dans le toluène puis ajout d'acétone (B), Solution de PVAm 20% et précipitation dans l'acétone (C) et dialyse du PVAm (D).....	90
Figure 39 : Spectre RMN du proton du PVAm dans le D <sub>2</sub> O .....	91
Figure 40 : Thermogramme enregistré sur du PVA modifié (noir) ou non (gris) par DSC – vitesse de balayage : 20°C/min .....	92
Figure 41 : Photographies des réseaux simples PVAm à 10 (A), 5 (B) et 3% (m/v) (C) .....	93
Figure 42 : Suivi de la formation des réseaux simples de PVAm à différentes concentrations massiques X : 15 (A), 10 (B), 7,5 (C) et 5% (m/v) (D). La formation du gel de fibrine à 0,5 (m/v) est représentée par la courbe (E). T=37°C. Les flèches indiquent les temps de gel correspondants .....	94
Figure 43 : Module de stockage (G') après 60 min d'exposition aux U.V en fonction de la concentration en PVAm par rapport au gel de fibrine (○) .....	94
Figure 44 : Thermogrammes de la poudre de PVAm (A) et des réseaux simples PVAm (10%) (B) et (5%) (C) mesurés par DSC (20°C/min) – Second balayage - .....	96
Figure 45 : Suivi de la formation des RIP PVAm/Fb contenant 10% (A), 7,5% (B), 5% (C) de PVAm ainsi que du gel de Fb (D) par rhéologie. T=37°C. Les temps de gels correspondant sont représentés par des flèches .....	97

Figure 46 : Valeur du module de stockage après 60 min d'exposition aux U.V en fonction de la concentration de PVAm avec ( ■ ) ou sans fibrine ( ▲ ).....	98
Figure 47 : Photographies des RIPs PVAm(10%)/Fb (A et B) et RIP PVAm(5%)/Fb (C et D) en sortie de synthèse .....	99
Figure 48 : Gel d'électrophorèse SDS-PAGE des surnageants obtenus après 72h d'incubation des différents matériaux dans du tampon de dégradation chimique du gel de Fb. (1) RS Fb 0,5%, (2) Fg, (3) RS PVAm 10%, (4) RIP PVAm(10%)/Fb, (5) RIP PVAm(5%)/Fb et (6) Semi RIP PVAm(10%)/Fg. ....	101
Figure 49 : Photographies des différents matériaux RS PVAm(10%), PVAm(5%)/Fb et RIP PVAm(10%)/Fb juste après synthèse (A), après coloration au bleu de Coomassie (B) et après dégradation du réseau de Fb (C) .....	102
Figure 50 : schéma de la réaction de couplage du n-succinimidyl ester Alexa 488 sur des fonctions amine d'une protéine.....	103
Figure 51 : Observation par microscopie confocale des matériaux marqués par le n-succinimide ester Alexa 488 : gel de Fb (A), RIP PVAm(5%)/Fb (B) et RIP PVAm(10%)/Fb (C).....	104
Figure 52 : Thermogrammes des réseaux simples PVAm(10%) (B) et PVA(5%) (D) et des RIPs PVAm(10%)/Fb (A) et PVAm(5%)/Fb (C) obtenus par DSC (20°C/min de chauffe et refroidissement, second cycle).....	105
Figure 53 : Taux de gonflement des différents matériaux après synthèse et après 1 ■, 2 ■ et 3 ■ cycle de déshydratation / réhydratation. ....	107
Figure 54 : Réversibilité à la déshydratation des RS PVAm(10%) (A) et PVAm(5%) (C), des RIPs PVAm(10%)/Fb (B) et PVAm(5%)/Fb (D). ....	108
Figure 55 : (A) Taux de gonflement et (B) Réversibilité à la déshydratation du RIP PVAm(5%)-co-POE(5%)/Fb après synthèse puis 1 ■, 2 ■ et 3 ■ cycles de déshydratation/réhydratation. ....	109
Figure 56 : cinétique d'adhérence cellulaire des fibroblastes BJ sur polystyrène de culture. Observations réalisées avec un microscope inversé Leica à l'objectif X10 (et X20 encadré) à t = 15min (A), 1h (B), 2h (C), 3h (D). ....	110
Figure 57 : Observation au microscope confocal (objectif x10) d'une population cellulaire de FB-BJ à 24h (A) et 72h (B) de culture sur lamelle de verre. Le noyau a été marqué au Iodure de Propidium (bleu), le cytosquelette a été marqué à la phalloïdine couplé Alexa 532 (vert) et la Fibronectine par un anticorps primaire polyclonal et un anticorps secondaire couplé FITC (rouge) .....	111
Figure 58 : Observation par microscopie confocale (objectif x63) d'une population de fibroblaste BJ après 3 jours de culture sur surface en verre. Le noyau est bleu (DAPI) et (A) cytosquelette en vert (Phalloïdine Alexa 532), (B) fibronectine en rouge (Anticorps secondaire Alexa 633), (C) collagène de type I en jaune (Anticorps secondaire Alexa 488), (D) acide hyaluronique en magenta (anticorps secondaire Alexa 568) .....	112
Figure 59 : Evolution de la réduction de l'alarmar blue après 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de culture. Les matériaux testés sont le RS PVAm(10%) (A), le RIP PVAm(10%)/Fb (B), le RIP PVAm(5%)/Fb (C) et le polystyrène de culture cellulaire (D) ..	114
Figure 60 : Morphologie des FB-BJ à la surface des RS PVAm(10%), RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb. Les noyaux ont été colorés par le DAPI (bleu) et le cytosquelette a été marqué à l'aide de phalloïdine Alexa 532 (vert). Objectif x20. ....	115



Figure 61 : Densité cellulaire mesurée à la surface des matériaux RS PVAm(10%), RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb à 24h (■), 72h (■), 1 semaine (■), 2 semaines (■) et 3 semaines (■) de culture .....	116
Figure 62 : répartition des cellules vivantes (verte) et mortes (rouge) sur le RS PVAm(10%), RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb à 24h, 1 semaine et 3 semaines. Le marquage a été réalisé à l'aide du kit Live and Dead - Microscopie confocale - Objectif x10. ....	117
Figure 63 : viabilité cellulaire sur les RS PVAm(10%), RIP PVAm(10%)/Fb et RIP PVAm(5%)/Fb à 24h (■), 72h (■), 1 semaine (■), 2 semaines (■) et 3 semaines (■) de culture .....	118
Figure 64 : dégradation enzymatique du PVA.....	122
Figure 65 : dégradation de liaison β-dicétone .....	122
Figure 66 : Schéma de la formation et de la dégradation enzymatique du réseau de polymère partenaire du gel de fibrine.....	123
Figure 67 : Mécanisme de protection (A) et de déprotection (B) des arginines par le CHD.....	125
Figure 68 : Suivi de modification des arginines (▲) et des lysines (■) du lysozyme à des proportions de 5,6 (■), 2,8 (■) et 1,4 (■) molécules de CHD par arginine .T=40°C .....	126
Figure 69 : Suivi de modification des arginines (▲) et des lysines (■) de l'albumine de sérum bovin à des proportions de 0,5 (■), 1 (■) et 1,5 ( ) et 2 ( ) molécules de CHD par arginine. T=40°C .....	127
Figure 70 : Gel d'électrophorèse de polyacrylamide à 16,5% de la BSA (1), et d'hydrolysats de BSA (72h à 37°C) obtenus avec des proportions massiques Trypsine/BSA : 1:100 (2), 1:80 (3), 1:60 (4), 1:50 (5), 1/40 (6), 1:30 (7), 1:20 (8). Migration 1h sous 80 V. Révélation au nitrate d'argent .....	129
Figure 71 : Evolution de l'hydrolyse de la BSA à 37°C en fonction du temps : 0 (1), 24 (2), 48 (3) et 72h (4) par l'action de la trypsine à une proportion massique de 1:20. Migration 1h sous 80 V. Révélation du gel au nitrate d'argent.....	130
Figure 72 : Résumé des précurseurs hydrolysables synthétisés .....	131
Figure 73 : formule chimique du méthacrylate de N-succinimidyle ester (NHS-m) .....	132
Figure 74 : schéma de réaction entre le NHS-m et la BSA. ....	132
Figure 75 : Distribution massique des réticulants BSAm (2), BSAdm (3) et BSACHDdm (4) issus de la BSA (1) visualisés sur un gel d'électrophorèse de polyacrylamide à 16,5%. Révélation du gel au nitrate d'argent.....	133
Figure 76 : Absorbance à 420 nm d'une gamme de BSA (◆) et de BSAm (■) après un test au TNBS .....	134
Figure 77 : Comparaison des coréseaux PVAmcoBSAm et des réseaux simples PVAm(10%) et BSAm(10%), sortis de synthèse et après coloration au bleu de Coomassie et décoloration . ....	136
Figure 78 : Module de stockage en fonction du temps du (1) réseau simple PVAm (10%), (2) co-réseau PVAm(5%)coBSAm(5%), (3) co-réseau PVAm(3%)coBSAm(7%), et (4) réseau simple BSAm (10%). Les flèches représentent les temps de gel associés aux différents matériaux .....	137
Figure 79 : Gel de Fb (0,5% (w/v)) (1) et semi RIP BSA/Fb (A) et BSAm/Fb (B) contenant (2) 1.5, (3) 3, (4) 5, (5) 7.5 et (6) 10% (w/v) de BSA ou BSAm.....	140
Figure 80 : Membrane de nitrocellulose après révélation au kit ALP color de solution de dégradation chimique du fibrinogène (1), gel de fibrine 0,5 % (w/v) (2), réseau simple RS BSAm(10%) (3), RIP BSAm/Fb (7) et de RIPs contenant les coréseaux PVAmcoBSAm à des proportions massiques (PVAm/BSAm) de 7/3, 5/5 et 3/7 respectivement (4), (5), (6) .....	141

Figure 81 : Observation en microscopie confocale de la répartition de la BSAm (rouge) et de la Fb (vert) dans le RIP BSAm(10%)/Fb (A) et RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb (B). - Objectif x63 .....	143
Figure 82 : Taux de gonflement post synthèse (SrpostS, gris) et après un cycle de séchage (Sr1, noir) pour les RIPs PVAm(10%)/Fb, RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb. ....	145
Figure 83 : Perte de masse en fonction du temps des RIP PVAm(10%)/Fb , RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb sous un flux d'argon sec à 5ml/min. T=37°C. ....	146
Figure 84 : Dégradation enzymatique des RIP PVAm(10%)/Fb, RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb.....	147
Figure 85 : Réduction de l'Alamar Blue après 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de culture sur le RS BSAm(10%) (A), le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb (B), le RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb (C), le RIP BSAm(10%)/Fb (D) et le polystyrène de culture cellulaire (E).....	148
Figure 86 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de morphologies cellulaires de fibroblastes BJ cultivés pendant 24h, 1 semaine et 3 semaines à la surface de RS BSAm(10%), RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et le cytosquelette est en vert (phalloïdine Alexa 532).....	149
Figure 87 : Densité cellulaire à la surface des matériaux RS BSAm(10%), RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm(10%)/Fb à ■ 24h , 72h ■, 1 semaine ■, 2 semaines ■ et 3 semaines ■ de culture. ....	150
Figure 88 : Observation en microscopie confocale (objectif x10) de la survivabilité de fibroblastes BJ cultivés pendant 24h, 1 et 3 semaines à la surface de réseau simple BSAm(10%), RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm/Fb. La coloration obtenue par le kit Live and Dead colore les cellules vivante en verte et colore le noyau des cellules mortes en rouge. ....	151
Figure 89 : Viabilité cellulaire sur les réseaux simples PVAm(10%) et BSAm(10%) et les RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm/Fb à ■ 24h , 72h ■, 1 semaine ■, 2 semaines ■ et 3 semaines ■ de temps de culture. ....	152
Figure 90 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de la fibronectine à 24h, 1 et 3 semaines à la surface de RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI), le cytosquelette des fibroblastes est en vert (phalloïdine Alexa 532) et la fibronectine est rouge (anticorp secondaire Alexa 633). ....	153
Figure 91 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de l'acide hyaluronique à 24h, 1 et 3 semaines à la surface des RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et l'acide hyaluronique est en magenta (anticorps secondaire Alexa 568).....	154
Figure 92 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition du collagène de type I à 24h, 1 et 3 semaines à la surface des RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb, RIP PVAm(3%)coBSAm(7%)/Fb et RIP BSAm/Fb. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et le collagène de type I est orange (anticorps secondaire Alexa 488) .....	155
Figure 93 : Réduction de l'Alamar Blue en fonction du temps de culture des fibroblastes encapsulés dans les RIPs PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb. ....	157

Figure 94 : Observation en microscopie confocal (objectif x10) de la vivabilité de fibroblastes BJ encapsulés après 24h, 1 et 3 semaines dans un RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb. La coloration obtenue par le kit LIVE/DEAD® colore les cellules vivantes en vert et le noyau des cellules mortes en rouge .....	158
Figure 95 : Population cellulaire encapsulée à l'intérieur du RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb après 24h, 72h, 1 semaine, 2 semaines et 3 semaines de culture.....	159
Figure 96 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la morphologie cellulaire de fibroblastes BJ encapsulés dans le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb cultivé pendant 24h, 1 et 3 semaines. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et le cytosquelette est en vert (phalloïdine Alexa 532) et sont imagés sur une profondeur de 26 µm.....	160
Figure 97 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de la fibronectine dans le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb pendant 24h, 1 et 3 semaines. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et la fibronectine est en rouge (anticorps secondaire Alexa 633) et sont imagés sur des profondeurs de 0, 13 et 26 µm .....	161
Figure 98 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition de l'acide hyaluronique dans le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb pendant 24h, 1 et 3 semaines. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et l'acide hyaluronique est en magenta (anticorps secondaire Alexa 568) et sont imagés sur des profondeurs de 0, 13 et 26 µm.....	162
Figure 99 : Observation en microscopie confocale (objectif x20) de la répartition du collagène de type I dans le RIP PVAm(5%)coBSAm(5%)/Fb pendant 24h, 1 et 3 semaines. Les noyaux sont en bleu (DAPI) et le collagène de type I en jaune (anticorps secondaire Alexa 488) et sont imagés sur des profondeurs de 0, 13 et 26 µm.....	163

## **II] TABLEAUX :**

Tableau 1 : présentation des premiers cas d'implantations réussies dans un système vivant [5]. .....	5
Tableau 2 : Définition des domaines impliquant l'utilisation de biomatériaux .....	7
Tableau 3 : Principaux constituants de la matrice extracellulaire du derme []. .....	10
Tableau 4 : Rôle et acteurs impliqués dans les fonctions de la peau.....	10
Tableau 5 : Différents degrés de blessure en fonction de la profondeur [] .....	11
Tableau 6 : Propriétés requises du substitut cutané idéal et propriétés correspondantes du biomatériau obtenu par ingénierie tissulaire. * correspond à des propriétés liées au type de monomère [32]......	15
Tableau 7 : exemple de modification du chitosan pour des applications cutanées .....	21
Tableau 8 : tableau regroupant les pansements à base de collagène disponibles sur le marché []. ....	24
Tableau 9 : Exemples d'application de biomatériaux à base de soie en tant que pansements [108] ....	26
Tableau 10 : Tableau récapitulatif des interactions et de la bioactivité associée du réseau de fibrine []. .....	28
Tableau 11 : Comparaison entre les propriétés attendues d'un hydrogel idéal et celles fournies par l'hydrogel de fibrine [136]. .....	29
Tableau 12 : Hydrogels mixtes testés comme substitut cutané ou pansement (culture de fibroblaste à leur surface). L'origine des matériaux sont notées Nat (naturelle) ou Synth (synthétique). Les structures sont notées CoR (=coréseaux) ou RIP (réseaux interpénétrés de polymères). .....	35

Tableau 13 : Substituts cutanés de type épidermique disponibles pour l'utilisation clinique. Dans tous les cas, des keratinocytes autologues sont incorporés in vitro. Les matériaux sont Synth (synthétique), recomb (recombinant) ou allo (allogénique). .....	39
Tableau 14 : Substituts cutanés dermiques acellulaires disponibles en utilisation clinique. Les matériaux sont Synth (synthétique), xéno (xénogénique) ou allo (allogénique). .....	39
Tableau 15 : Substituts cutanés dermiques cellularisés (fibroblaste, ensemencement in vitro) disponibles en utilisation clinique. Les types cellulaires sont auto (autologue) ou allo (allogénique). Les matériaux sont Synth (synthétique), ou allo (allogénique). .....	40
Tableau 16 : Substituts cutanés dermo-épidermiques disponibles en utilisation clinique. Les types cellulaires sont Ker (keratinocyte), Fibro (fibroblaste), auto (autologue) ou allo (allogénique). Les matériaux sont Synth (synthétique), recomb (recombinant) ou allo (allogénique). .....	40
Tableau 17 : réactifs utilisés .....	45
Tableau 18 : Tampon utilisé dans l'étude.....	46
Tableau 19 : caractéristiques de protéines utilisées .....	46
Tableau 20 : récapitulatif des différents anticorps utilisés .....	47
Tableau 21 : Formulation des gels de fibrine .....	49
Tableau 22 : Formulation de RIP à base de POE .....	50
Tableau 23 : Formulation de RIP POEcoHEMA.....	51
Tableau 24 : Formulation des RIPs à base de PVAm .....	51
Tableau 25 : Formulation de matériaux à base de BSAm .....	52
Tableau 26 : Formulation des RIPs à base de PVAm et BSAm.....	52
Tableau 27 : Modèles cellulaires et milieux de culture associés.....	59
Tableau 28 : condition de mesure du test LIVE/DEAD. ....	61
Tableau 29 : Combinaison de sondes pour l'immunomarquage des cellules cultivées en présence des matériaux à base de PVAm et de BSAm .....	62
Tableau 30 Paramètres d'acquisition pour la microscopie confocale du quintuple marquages .....	62
Tableau 31 : récapitulatif des extractibles synthétiques et protéiques des différents matériaux .....	73
Tableau 32 : Fraction soluble extraite par soxhlet (48h au dichlorométhane) des RS POE750 en fonction du temps d'exposition aux U.V. ....	73
Tableau 33 : photos des différents RS POE750 en fonction de la concentration en PEGDM750. Leur caractère autosupporté (☑) ou non (☒) est évalué macroscopiquement. ....	74
Tableau 34 : Déformation à la rupture du réseau simple POE750 et des différents RIPs à différentes concentrations en Fb. Mesures réalisées en DMA à température ambiante. ....	77
Tableau 35 : Taux de gonflement après synthèse et après un cycle de séchage/réhydratation pour des réseaux simples POE et les RIPs POE750/Fb et POE550/Fb à différentes concentrations en Fb. ....	80
Tableau 36 : Taux de fraction soluble contenue dans les réseaux simples PVAm : .....	95
Tableau 37: Fractions solubles contenues dans les RIPs PVAm(10%)/Fb et PVAm(5%)/Fb après 48h d'extraction au soxhlet avec de l'eau .....	99
Tableau 38 : Fractions de fibrine ou de fibrinogène extraites des matériaux et quantifiées par méthode Elisa .....	101
Tableau 39 : Module de stockage des matériaux mesurés en rhéologie - * Figure 42 et Figure 45- ** Figure 53 .....	106

Tableau 40 : Pourcentage de résidus arginine et lysine du lysozyme modifiés après 90 min d'incubation en fonction de la proportion de CHD .....	126
Tableau 41: Pourcentage de modification des arginines et des lysines de la BSA après 90 min de réaction avec la CHD à différentes concentrations à 40°C .....	128
Tableau 42 : Rendement des réactions d'hydrolyse et fonctionnalisation pour la production de réticulants hydrolysables .....	132
Tableau 43 : Récapitulatif de la formation de matériaux en fonction du réticulant et de sa proportion. <input checked="" type="checkbox"/> : formation ou <input checked="" type="checkbox"/> non d'un matériau. ....	135
Tableau 44 : Récapitulatif des dégradations enzymatiques des matériaux en fonction de leur composition. <input checked="" type="checkbox"/> pas d'altération visible, ≈ dégradation partielle, <input checked="" type="checkbox"/> solubilisation totale du matériau.....	138
Tableau 45 : tableau récapitulatif des modules élastiques en RS et RIP en fonction du polymère utilisé .....	141
Tableau 46 : Fractions solubles protéique et synthétique contenues dans le gel de fibrine, et les RIPs PVA(5%)coBSAm(5%)/Fb et BSAm(10%)/Fb .....	142

## **Résumé :**

La peau est un organe à l'architecture complexe qui assure plusieurs rôles essentiels dont celui de barrière contre les agressions extérieures. De plus, il est capable de se régénérer grâce un processus hautement régulé: la cicatrisation. Des biomatériaux, synthétisés à partir de macromolécules d'origine naturelle et/ou synthétique, ont été développés pour servir de pansements, de support de culture cutanée ou de substitut cutané.

L'originalité de notre étude a été de mimer, non pas la matrice extracellulaire dermique, mais le réseau de fibrine, temporaire, qui apparaît lors de la cicatrisation. Au cours de travaux précédents, il a été démontré qu'il était possible de renforcer mécaniquement un réseau de fibrine, à concentration physiologique, en l'associant, dans une architecture de réseaux interpénétrés de polymères (RIP), avec un réseau de polyoxyde d'éthylène (POE). Durant mes travaux, la non toxicité de ces matériaux envers des cellules modèles a été démontrée. Puis, la composition du matériau a été optimisée pour augmenter son module de stockage jusqu'à un facteur 100 par rapport à celui du gel de fibrine. Ensuite, grâce à la synthèse d'alcool polyvinylique méthacrylate (PVAm) pour le remplacement du POE, un matériau présentant mêmes qualités, mais plus facilement stockable à l'état déshydraté et complètement réhydratable, a pu être obtenu. Nous nous sommes ensuite attachés à rendre ce nouveau matériau biodégradable. L'introduction de sérum albumine bovine méthacrylate (BSAm) copolymérisée avec le PVAm (co-réseau) dans une architecture RIP avec un réseau de fibrine a permis de synthétiser un matériau hybride présentant l'ensemble des propriétés précédemment décrites et dégradable par des enzymes. Ce matériau a été testé en contact avec des populations cellulaires fibroblastiques. Il a pu être démontré, qu'en plus d'être non cytotoxique, ce matériau pouvait être totalement colonisé par ces cellules. Pour finir, l'encapsulation de cellules à l'intérieur de cette matrice et leur prolifération ont pu être observées.

En conclusion, les matériaux synthétisés lors de ces travaux, c'est-à-dire des RIPs associant un réseau de fibrine à la concentration physiologique et un réseau de polymère synthétique, possèdent les propriétés nécessaires pour être utilisés en tant que pansements et supports de culture pour la régénération cutanée. De plus, la possibilité d'encapsuler des fibroblastes dans le RIP à base de coréseaux de PVAm et BSAm en fait un substitut cutané potentiel.

**Mots clefs :** hydrogel, réseaux interpénétrés de polymères, fibrine, POE, PVA, BSA, encapsulation cellulaire, fibroblaste, médecine régénérative, peau.

## **Abstract:**

The skin is an organ with a complex architecture that provides several key roles including barrier against external aggressions. In addition, it has the ability to regenerate itself by following a highly regulated process: the wound healing. Biomaterials, synthesized by using macromolecules from natural and/or synthetic origin, have been developed to serve as wound dressing, cell culture support or skin substitute.

The originality of our study was to not mimic the dermal extracellular matrix, but mimic the the fibrin scaffold, the temporary matrix who appears during the healing process. In previous work, it was shown that it was possible to mechanically reinforce a fibrin scaffold at physiological concentration by associating into interpenetrating polymer network (IPN) architecture with a polyethylene oxide (PEO) network. In my work, the non-toxicity of these materials was proved with model cells. Then, the material composition has been optimized to increase the storage modulus by 100 in comparison of the fibrin scaffold. Then, through the synthesis of polyvinyl alcohol methacrylate (PVAm) to replace the POE, a material with the same properties, but more easily stored in a dehydrated state (more ductile) and completely rehydratable could be obtained. We then attached to make this new biodegradable material. The use of bovin serum albumin methacrylate (BSAm) copolymerized with PVAm(conetwork) into IPN architecture with a fibrin scaffold performs to synthesize a hybrid material with all the properties described above and degradable by enzymes. This material has been tested in contact with human fibroblast. It has been demonstrated that in addition to be non-cytotoxic, this material could be completely colonized by these cells. Finally, the encapsulation of cells in the bulk of this matrix and their proliferation inside were observed.

In conclusion, the materials synthesized in this work, IPN containing a fibrin scaffold at physiological concentration and a synthetic polymer network, have sufficient properties to be used as wound dressings or cells culture support for skin regeneration. In addition, the ability to encapsulate fibroblasts in material based on conetwork of PVAm and BSAM makes it suitable for a skin substitute application.

**Key words:** hydrogel, Interpenetrating Polymer Network, fibrin, POE, PVA, BSA, entrapping, fibroblast, tissue engineering, skin.