



**HAL**  
open science

# Hydrogels injectables et éponges à base de complexe polyélectrolytes (chitosane/polymère de cyclodextrine) pour une application en ingénierie tissulaire osseuse

Carla Palomino Durand

## ► To cite this version:

Carla Palomino Durand. Hydrogels injectables et éponges à base de complexe polyélectrolytes (chitosane/polymère de cyclodextrine) pour une application en ingénierie tissulaire osseuse. Médecine humaine et pathologie. Université de Lille, 2019. Français. NNT : 2019LILUS006 . tel-02275357

**HAL Id: tel-02275357**

**<https://theses.hal.science/tel-02275357>**

Submitted on 30 Aug 2019

**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.



Université  
de Lille

## Université de Lille – Faculté de Médecine

École Doctorale Biologie - Santé

### Thèse

pour l'obtention du grade de  
Docteur de l'Université de Lille  
Sciences de la vie et de la santé

#### **HYDROGELS INJECTABLES ET EPONGES A BASE DE COMPLEXE POLYELECTROLYTES (CHITOSANE/POLYMERE DE CYCLODEXTRINE) POUR UNE APPLICATION EN INGENIERIE TISSULAIRE OSSEUSE**

Présentée et soutenue par  
**Carla PALOMINO DURAND**

**Le 30 avril 2019**

#### **Membres du Jury**

Pr. Pierre WEISS	Université de Nantes	Rapporteur
Pr. Laurent DAVID	Université Claude Bernard Lyon 1	Rapporteur
Pr. Christine JEROME	Université de Liège	Examineur/Président du jury
Pr. Bernard MARTEL	Université de Lille	Examineur
Dr. Marco LOPEZ	Université de Lille	Membre invité
Dr. Feng CHAI	Université de Lille	Directeur de thèse



*A la mémoire de ma grand-mère Humberta*

*Dedicado a mi mamá Humberta*



## REMERCIEMENTS

---

Je tiens à remercier le **FONDECYT** avec le programme Beca de Doctorado en el extranjero pour le financement de mes trois années de doctorat.

Je remercie également le **Professeur Juergen Siepmann**, Directeur de l'unité INSERM U1008 pour m'avoir accueilli au sein de son laboratoire.

Je tiens à remercier les membres du jury, **Monsieur Laurent DAVID**, Professeur de l'Université Claude Bernard de Lyon, et **Monsieur Pierre WIESS**, Professeur de l'Université de Nantes pour m'avoir fait l'honneur de juger ce travail. Je remercie également **Madame Christine JEROME**, Professeur de l'Université de Liège pour avoir examiné ce travail.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse **Dr. Feng CHAI**, Ingénieure de recherche dans l'unité INSERM U1008, pour son encadrement, sa rigueur et ses conseils scientifiques, son soutien et sa disponibilité tout au long de travail.

Je remercie également le **Dr. Nicolas BLANCHEMAIN**, maître de conférences de l'Université de Lille, pour ses conseils, ses connaissances partagées au cours de ma thèse, son amabilité et sa disponibilité, et surtout son optimisme et son aide à la correction de ce manuscrit.

Je tiens à remercier au **Monsieur Bernard MARTEL**, Professeur de l'Université de Lille, pour ses conseils scientifiques en matière des analyses physicochimiques, son soutien, sa bienveillance, sa disponibilité et pour sa contribution quant aux corrections du manuscrit.

Je souhaite remercier **Dr. Marco LOPEZ** pour son encadrement au début de cette thèse, pour ses conseils scientifiques et son expertise dans les hydrogels et dans les analyses de uCT.

Je voudrais remercier également toutes les personnes de l'UMET plus particulièrement le **Dr. Frédéric CAZAUX**, maître de conférences à l'Université de Lille, pour son aide et enseignements dans les essais rhéologiques ; ainsi que pour sa gentillesse et sa disponibilité, le **Dr. Nicolas TABARY**, maître de conférences à l'Université de Lille, pour son aide avec la lyophilisation, pour sa bonne humeur et sa disponibilité. Je remercie aussi madame **Anne-Marie BLANCHENET**, Assistante ingénieure, pour m'avoir formée au microscope électronique à balayage.

Je souhaite remercier spécialement **Mickaël MATON**, ingénieur d'études à l'INSERM U1008, pour sa gentillesse, sa bonne humeur, et son aide sur les corrections en français du manuscrit. Merci pour les bons moments passés au labo Micka !

Un grand merci à tous les amies et collègues que j'ai rencontrés pendant ces années. Merci **Alejandra** pour notre papotage en espagnol, ton écoute et pour les bons alfajores. Merci **Alice** pour tes conseils, ton soutien et pour me faire toujours rire. Merci **Dyhia** pour nos journées très productives à la BU. Merci **Syrine** pour nos longues conversations sur la thèse et sur la vie. Merci **Marion** pour ta gentillesse. Merci beaucoup les filles pour votre encouragement et les bons moments passés ensemble, vous allez me manquer ! Je remercie également **Justine, Malo, Adrien, Maxime, Mattias, Moussa**, pour leur bonne humeur et leur sympathie. Je souhaite remercier aussi **Maria Jose GARCIA FERNANDEZ**, maître de conférences à l'Université de Lille, pour sa gentillesse et sa chaleur humaine. Je tiens à remercier aussi les stagiaires **Henry** et **Marie-Claude** pour leurs contributions dans ce travail. Je souhaite remercier également à **Alexandra MACHADO** et **Monique BONNIER** pour leur sympathie et gentillesse.

Un grand merci aussi à toutes les personnes que j'ai pu rencontrer au long de ces années étudiants, stagiaires, doctorants et techniciens pour leur sympathie.

Un grand merci à toutes mes amies, **Fiona, Lauren et Fabiana** pour les bons moments partagés et pour le soutien au long de ces années. Également, je remercie énormément Fiona et Lauren pour les corrections en anglais de mon article scientifique.

Je tiens finalement à remercier à toute **ma famille** : muchas gracias a mis **padres Ana Maria y Ladislao** por cada día confiar y creer en mi, y por estar siempre conmigo a pesar de la distancia. Gracias por todas sus palabras de aliento, por la fortaleza que me dieron y me dan cada día. Sin ustedes no habría llegado hasta aquí. Agradezco igualmente a mi hermana **Ana Cecilia** por su cariño y sus palabras de ánimo cada vez que las necesitaba. Gracias a mis tíos **Carlos y Freddy**, y en especial a mis tias **Betty Olga y Norma** por acompañarme el día de mi sustentación y por apoyarme siempre en todas las decisiones que tomo. Gracias papinos **Enrique y Humberta** por todo lo que me han dado, siempre los llevaré en mi corazón.

# SOMMAIRE

REMERCIEMENTS.....	5
PRINCIPALES ABREVIATIONS.....	13
INTRODUCTION .....	17
PARTIE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE.....	21
Chapitre 1. Physiologie du tissu osseux .....	23
1. Morphologie et composition de l'os.....	23
1.1. La matrice extracellulaire.....	23
1.1.1. La matrice organique.....	23
1.1.2. La matrice minérale .....	24
1.2. Les cellules osseuses .....	24
1.3. Structures osseuses .....	25
2. Physiologie de l'os .....	27
2.1. Le remodelage osseux .....	27
2.2. Vascularisation du tissu osseux.....	28
2.3. Ostéogénèse et réparation osseuse.....	29
2.3.1. Types d'ostéogénèse.....	30
2.3.1.1. Ossification membraneuse.....	30
2.3.1.2. Ossification enchondrale .....	30
2.3.2. Phases de la réparation osseuses des fractures .....	31
3. Conclusion.....	33
Chapitre 2. Défaut osseux et stratégies de réparation osseuse .....	34
1. Greffes et substituts osseux .....	34
1.1. Les greffes osseuses.....	34
1.1.1. Les autogreffes.....	34
1.1.2. Les allogreffes .....	35
1.1.3. Les xéno-greffes.....	35
1.2. Substituts osseux.....	36
2. L'ingénierie tissulaire osseuse.....	38
2.1. L'ingénierie tissulaire <i>in vitro</i> et <i>in situ</i> .....	39
2.1.1. L'ingénierie tissulaire <i>in vitro</i> .....	39
2.1.2. L'ingénierie tissulaire <i>in situ</i> .....	40
2.2. La vascularisation dans l'ingénierie tissulaire osseuse .....	41
2.3. Composants de l'ingénierie tissulaire osseuse .....	42
2.3.1. Les scaffolds .....	42



2.3.1.1.	<i>Cahier de charges des scaffolds</i> .....	42
2.3.1.2.	<i>Biomatériaux pour scaffolds de l'ITO</i> .....	45
<b>2.3.2.</b>	<b>Les cellules</b> .....	47
<b>2.3.3.</b>	<b>Les molécules bioactives</b> .....	48
2.3.3.1.	<i>Les facteurs de croissance ostéogéniques</i> .....	49
2.3.3.2.	<i>Les facteurs de croissance angiogéniques</i> .....	51
<b>2.3.4.</b>	<b>Approches pour l'incorporation des molécules bioactives dans les scaffolds</b> .....	53
<b>3.</b>	<b>Conclusion</b> .....	58
<b>Chapitre 3.</b>	<b>Les hydrogels pour l'ingénierie tissulaire osseuse</b> .....	59
<b>1.</b>	<b>Classification des hydrogels</b> .....	59
<b>2.</b>	<b>Formes des hydrogels</b> .....	60
<b>2.1.</b>	<b>Hydrogels non-injectables</b> .....	61
<b>2.2.</b>	<b>Hydrogels injectables</b> .....	61
<b>2.2.1.</b>	<b>Hydrogels in situ et préformés</b> .....	62
<b>2.2.2.</b>	<b>Caractéristiques rhéologiques des hydrogels</b> .....	63
2.2.2.1.	<i>Notions fondamentales de rhéologie</i> .....	63
2.2.2.2.	<i>Caractérisation rhéologique des hydrogels injectables</i> .....	65
<b>2.2.3.</b>	<b>Mesure de la force d'injection d'hydrogel</b> .....	66
<b>2.3.</b>	<b>Éponges (hydrogels macroporeux)</b> .....	67
<b>2.3.1.</b>	<b>Formation d'éponges par lyophilisation</b> .....	68
<b>2.3.2.</b>	<b>Propriétés des éponges formées par lyophilisation</b> .....	68
2.3.2.1.	<i>Porosité</i> .....	68
2.3.2.2.	<i>Propriétés mécaniques</i> .....	69
<b>3.</b>	<b>Hydrogels à base de chitosane</b> .....	70
<b>3.1.</b>	<b>Le chitosane : définition, source et structure</b> .....	70
<b>3.2.</b>	<b>Propriétés chimiques et biologiques du CHT</b> .....	70
<b>3.3.</b>	<b>Influence du DD et de la masse molaire dans les propriétés du CHT</b> .....	71
<b>3.4.</b>	<b>Formation d'hydrogels à base de CHT</b> .....	73
<b>3.4.1.</b>	<b>Les hydrogels chimiques du CHT</b> .....	73
<b>3.4.2.</b>	<b>Les hydrogels physiques du CHT</b> .....	73
3.4.2.1.	<i>Réticulation via des liaisons hydrophobes</i> .....	74
3.4.2.2.	<i>Réticulation par interactions supramoléculaires</i> .....	75
3.4.2.3.	<i>Réticulation ionique</i> .....	75
3.4.2.4.	<i>Hydrogels à base de complexes polyélectrolytes</i> .....	76
<b>3.5.</b>	<b>Formation de complexes polyélectrolytes à base de CHT et de polymères de cyclodextrine anioniques</b> .....	77
<b>3.5.1.</b>	<b>Les cyclodextrines</b> .....	77

3.5.2.	<b>Les polymères de cyclodextrine</b> .....	78
3.5.3.	<b>Hydrogels injectables à base de polymères de cyclodextrines</b> .....	79
3.5.4.	<b>Le polymère de cyclodextrine réticulé par l'acide citrique</b> .....	80
3.5.5.	<b>Systèmes de CHT-PCD – Travaux antérieurs du laboratoire</b> .....	81
3.6.	<b>Applications des hydrogels de CHT pour l'ingénierie tissulaire</b> .....	82
4.	<b>Conclusion</b> .....	86
<b>Synthèse bibliographique, objectifs de la thèse et cahier de charges</b> .....		87
1.	<b>Objectifs de la thèse</b> .....	89
2.	<b>Cahier des charges</b> .....	89
<b>PARTIE 2. MATERIELS ET METHODES</b> .....		93
1.	<b>Matériels</b> .....	95
1.1.	<b>Les composants</b> .....	95
1.1.1.	Le chitosane (CHT) .....	95
1.1.2.	Les polymères de $\beta$ -cyclodextrine (PCD).....	95
1.1.3.	L'hydroxyapatite (HAp).....	96
1.2.	<b>La biomolécule : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)</b> .....	96
1.3.	<b>Les cellules</b> .....	96
1.3.1.	Les cellules pré-ostéoblastes : MC3T3-E1 .....	96
1.3.2.	Les cellules endothéliales : HUVECs.....	97
2.	<b>Méthodes</b> .....	97
2.1.	<b>Développement, optimisation et caractérisation des éponges CHT/PCDs</b> .....	97
2.1.1.	<b>Préparation des poudres de CHT et PCDs</b> .....	97
2.1.2.	<b>Formation des hydrogels CHT/PCDs</b> .....	97
2.1.3.	<b>Formation des éponges CHT/PCDs</b> .....	98
2.1.4.	<b>Stabilisation des éponges par traitement thermique</b> .....	99
2.1.5.	<b>Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)</b> .....	99
2.1.6.	<b>Étude de la propriété d'absorption d'eau des éponges</b> .....	99
2.1.6.1.	<i>Gonflement des éponges</i> .....	99
2.1.6.2.	<i>Sorption Dynamique de Vapeur (DVS)</i> .....	100
2.1.7.	<b>Dégradation des éponges</b> .....	100
2.1.7.1.	<i>Dégradation dans le PBS</i> .....	101
2.1.7.2.	<i>Dégradation dans PBS enrichi par lysozyme</i> .....	101
2.1.8.	<b>Étude de la microstructure et de la porosité de l'éponge CHT/PCDs</b> .....	101
2.1.8.1.	<i>Microscopie électronique à balayage (MEB)</i> .....	101
2.1.8.2.	<i>Microtomographie par rayons X (<math>\mu</math>CT)</i> .....	102
2.1.9.	<b>Test mécanique de compression</b> .....	102

<b>2.2. Étude des propriétés biologiques de l'éponge CHT/PCDs.....</b>	<b>102</b>
<b>2.2.1. Cytotoxicité – Méthode de contact indirect .....</b>	<b>102</b>
<b>2.2.2. Cytocompatibilité et adhésion cellulaire - Méthode de contact direct.....</b>	<b>103</b>
2.2.2.1. <i>Culture direct avec cellules pré-ostéoblastes (MC3T3-E1).....</i>	<i>104</i>
2.2.2.1.1. Observation de l'adhésion cellulaire par MEB .....	104
2.2.2.1.2. Test de viabilité cellulaire par kit LIVE/DEAD® .....	105
2.2.2.2. <i>Culture directe avec cellules endothéliales (HUVECs).....</i>	<i>105</i>
<b>2.3. Chargement des éponges avec VEGF : Évaluation de la libération du VEGF et leur bio-activité .....</b>	<b>105</b>
<b>2.3.1. Chargement des éponges CHT/PCDs avec VEGF .....</b>	<b>105</b>
<b>2.3.2. Libération du VEGF .....</b>	<b>106</b>
<b>2.3.3. Évaluation de la bio-activité du VEGF libéré.....</b>	<b>107</b>
2.3.3.1. <i>Prolifération cellulaire .....</i>	<i>107</i>
2.3.3.2. <i>Migration cellulaire.....</i>	<i>107</i>
2.3.3.2.1. Technique de blessure/cicatrisation.....	107
2.3.3.2.2. Test de migration « Transwell » .....	108
<b>2.4. Développement et optimisation des hydrogels injectables CHT/PCDi/PCDs .....</b>	<b>109</b>
<b>2.4.1. Formation des hydrogels CHT/PCDi/PCDs.....</b>	<b>109</b>
<b>2.4.2. Test du flacon retourné pour la formation des gels .....</b>	<b>109</b>
<b>2.4.3. Étude rhéologique des hydrogels CHT/PCDi/PCDs .....</b>	<b>110</b>
2.4.3.1. <i>Balayage au cours du temps .....</i>	<i>110</i>
2.4.3.2. <i>Balayage de fréquence .....</i>	<i>110</i>
2.4.3.3. <i>Balayage de taux de cisaillement.....</i>	<i>110</i>
2.4.3.4. <i>Analyse en mode déformation cyclique.....</i>	<i>111</i>
<b>2.4.4. Injectabilité.....</b>	<b>111</b>
2.4.4.1. <i>Profil de force d'injection.....</i>	<i>111</i>
2.4.4.2. <i>Intégrité structurelle dans PBS après injection .....</i>	<i>111</i>
<b>2.4.5. Cytotoxicité– Méthode de contact indirect .....</b>	<b>111</b>
<b>2.5. Étude prospective : Formation des hydrogels composites avec HAp .....</b>	<b>112</b>
<b>2.6. Analyses statistiques .....</b>	<b>112</b>
<b>PARTIE 3. RESULTATS ET DISCUSSION .....</b>	<b>113</b>
<b>Chapitre 1. Développement, optimisation et caractérisation des éponges CHT/PCDs .....</b>	<b>115</b>
<b>1. Formation et caractérisation des hydrogels CHT/PCDs .....</b>	<b>117</b>
<b>2. Formation et caractérisations physicochimiques des éponges CHT/PCDs .....</b>	<b>118</b>
<b>2.1. Stabilisation des éponges par traitement thermique.....</b>	<b>119</b>
<b>2.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....</b>	<b>120</b>
<b>2.3. Propriété d'absorption d'eau des éponges .....</b>	<b>122</b>

2.3.1.	<i>Gonflement des éponges</i> .....	122
2.3.2.	<i>Sorption Dynamique de Vapeur</i> .....	123
2.4.	<b>Dégradation des éponges</b> .....	124
2.4.1.	<i>Dégradation dans PBS</i> .....	124
2.4.2.	<i>Dégradation dans PBS enrichi par lysozyme</i> .....	125
2.5.	<b>Étude de la microstructure et la porosité</b> .....	127
2.5.1.	<i>Microscopie électronique à balayage (MEB)</i> .....	127
2.5.2.	<i>Microtomographie par rayons X (<math>\mu</math>CT)</i> .....	128
2.6.	<b>Test mécanique de compression</b> .....	129
3.	<b>Étude des propriétés biologiques de l'éponge CHT/PCDs</b> .....	132
3.1.	<b>Cytotoxicité – Méthode de contact indirect</b> .....	132
3.2.	<b>Viabilité et adhésion cellulaire – Méthode de contact direct</b> .....	132
3.2.1.	<i>Culture directe avec les cellules pré-ostéoblastes (MC3T3-E1)</i> .....	133
3.2.1.1.	<i>Observation de l'adhésion cellulaire par MEB</i> .....	133
3.2.1.2.	<i>Test de viabilité cellulaire par kit LIVE/DEAD®</i> .....	134
3.2.2.	<i>Culture directe statique avec cellules endothéliales (HUVECs)</i> .....	134
3.2.2.1.	<i>Observation de l'adhésion cellulaire par MEB</i> .....	134
3.2.2.2.	<i>Test de viabilité cellulaire par kit LIVE/DEAD®</i> .....	135
4.	<b>Chargement des éponges avec VEGF : Évaluation de la libération et leur bio-activité</b> .....	136
4.1.	<b>Libération du VEGF</b> .....	136
4.1.1.	<i>Libération dans PBS</i> .....	137
4.1.2.	<i>Libération dans milieu enrichi avec 0,5% SVF</i> .....	138
4.2.	<b>Évaluation de la bio-activité du VEGF libéré</b> .....	140
4.2.1.	<b>Prolifération cellulaire</b> .....	140
4.2.2.	<b>Migration cellulaire</b> .....	141
4.2.2.1.	<i>Technique de blessure/cicatrisation</i> .....	141
4.2.2.2.	<i>Test de migration « Transwell »</i> .....	144
5.	<b>Conclusion</b> .....	146
<b>Chapitre 2. Développement et optimisation des hydrogels injectables CHT/PCDi/PCDs</b> .....		147
1.	<b>Formation des hydrogels CHT/PCDi/PCDs</b> .....	149
2.	<b>Test du flacon retourné pour la formation des gels</b> .....	150
3.	<b>Étude rhéologique des hydrogels CHT/PCDi/PCDs</b> .....	150
4.	<b>Injectabilité</b> .....	156
4.1.	<b>Profil de force d'injection</b> .....	156
4.2.	<b>Intégrité structurelle des hydrogels dans PBS</b> .....	157
5.	<b>Cytotoxicité – Méthode de contact indirecte</b> .....	159

6. Conclusion.....	160
<b>Chapitre 3. Étude prospective pour l'élaboration d'hydrogels injectables et d'éponges composites.....</b>	<b>161</b>
1. Formation et caractérisation des hydrogels composites CHT/PCDs/PCDi/HAp.....	163
1.1. Analyse préliminaire du comportement rhéologique.....	163
1.2. Intégrité structurelle des hydrogels composites dans PBS.....	165
2. Formation et caractérisation des éponges composites CHT/PCDs/PCDi/HAp.....	166
2.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF).....	167
2.2. Microstructure par microscopie électronique à balayage (MEB).....	167
3. Conclusion.....	168
CONCLUSION GENERALE.....	171
REFERENCES BIBLIOGRAPHIES.....	177
ANNEXES.....	197
Liste de publications et de communications.....	203
RESUME.....	209
ABSTRACT.....	211

## **PRINCIPALES ABREVIATIONS**

---



Ali	Acide lactique
ASB	Albumine de sérum bovine
BMPs	Bone morphogenic proteins
CaP	Phosphates de calcium
CD	Cyclodextrine
CHT	Chitosane
CHT/PCD	Chitosane/Polymère de cyclodextrine
CSM	Cellules souches mésenchymateuses
DD	Degré de desacétylation
DVS	Sorption dynamique de vapeur
EC	Cellules endothéliales
ECM	Milieu de culture pour des cellules endothéliales
EPC	Cellules endothéliales progénitrices
FC	Facteurs de croissance
FGF	Facteurs de croissance des fibroblastes
G'	Module de stockage
G''	Module de perte
GAGs	Glycosaminoglycanes
HA	Acide hyaluronique
HAp	Hydroxyapatite
HBSS	Solution saline équilibrée de Hanks
HR	Humidité relative
HUVECs	Cellules endothéliales de la veine ombilicale humaine
IL	Interleukines
IRTF	Spectroscopie infrarouge à transformé de Fourier
IT	Ingénierie tissulaire
ITO	Ingénierie tissulaire osseuse
MEB	Microscopie électronique à balayage
MEC	Matrice extracellulaire
PBS	Solution saline tamponnée au phosphate
PCDi	Polymère de cyclodextrine insoluble
PCDs	Polymère de cyclodextrine insoluble
PCL	Polycaprolactone
PDGF	Facteurs de croissance dérivée de plaquettes
PEC	Complexe polyélectrolyte
PGA	Acide polyglycolyque
PLA	Acide polylactide



PTH	Hormone parathyroïde
RANKL	Receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand
RVE	Région viscoélastique
SVF	Sérum de veau fœtal
Tan $\delta$	Facteur de perte
TT	Traitement thermique
TNF- $\alpha$	Facteur de nécrose tumorale
VEGF	Facteur de croissance de l'endothélium vasculaire
$\beta$ -TCP	Phosphate tricalcique $\beta$
$\gamma$	Contrainte / amplitude
$\gamma^\circ$	Taux de cisaillement
$\nu$	Fréquence
$\tau$	Contrainte de cisaillement
$\omega$	Fréquence angulaire

# INTRODUCTION

---



L'os est un tissu vivant qui se renouvelle constamment. Cependant, certains défauts osseux suites à des traumatismes, des maladies (cancer, infections, etc.) ou des résections tumorales, ne peuvent guérir naturellement. Le traitement de défauts osseux reste donc un challenge. Les autogreffes, les allogreffes et une grande variété de biomatériaux sont utilisés pour la réparation de ces défauts osseux. Chaque année dans le monde, plus de 2,2 millions de procédures de greffes osseuses sont effectuées en orthopédie, neurochirurgie, chirurgie buccale et maxillo-faciale avec un coût annuel de 2,5 milliards de dollars. Les problèmes liés à la disponibilité de greffes, la morbidité du site donneur, l'immunogénicité et l'intégrité biomécanique ont limité leurs succès. Dans ce contexte, l'ingénierie tissulaire osseuse est considérée comme une alternative aux greffes conventionnelles. Le « scaffold » est un élément essentiel dans l'ingénierie tissulaire, qui favorise la colonisation par les cellules, guide leur différenciation, permet la transmission de signaux et l'innervation de nouveaux vaisseaux sanguins. De nos jours, les biomatériaux sous forme d'hydrogels injectables ou d'éponges notamment à base de chitosane sont très attrayantes pour une application en tant que « scaffolds » pour la réparation de défauts osseux.

L'objectif principal de ce projet de thèse est de développer, d'optimiser et de caractériser des matériaux destinés à servir de scaffolds pour le comblement et la régénération osseuse, sous la forme d'hydrogels injectables d'une part, et d'éponges d'autre part. Ces deux formes seront obtenues par un mélange de chitosane (CHT), polymère cationique, et de polymère de cyclodextrine (PCD), polymère anionique. Les polymères forment des complexes polyélectrolytes par interactions ioniques.

Notre groupe de recherche INSERM U1008 en collaboration avec l'équipe ISP-UMET, travaillent depuis plusieurs années sur les systèmes CHT-PCD comme revêtements multicouches, nanofibres et hydrogels. Dans ce contexte, ce travail de thèse étudiera de façon plus approfondie l'obtention des hydrogels et des éponges à base de CHT/PCD.

Ce manuscrit de thèse est divisé en trois parties :

La première partie est consacrée à l'étude bibliographique pour mettre le contexte. Dans cette partie, la biologie de l'os, ses fonctions et ses mécanismes de réparation seront développés. Ensuite, une approche sur les dispositifs utilisés pour la reconstruction osseuse sous forme de greffes et de substituts osseux sera décrite. L'ingénierie tissulaire osseuse et ses principaux composants : les scaffolds, les cellules et les molécules bioactives seront discutées en se focalisant sur la vascularisation. Enfin, le dernier chapitre a été consacré aux hydrogels utilisés comme scaffolds pour l'ingénierie tissulaire osseuse. Les propriétés, notamment rhéologiques des hydrogels seront traités. Les polymères, et plus particulièrement le chitosane seront abordés en se focalisant sur leur réticulation chimique et physique pour

former des hydrogels et des éponges. Plus particulièrement, sa capacité à former des hydrogels physiques, en particulier à partir du complexe polyélectrolyte, seront détaillées.

La deuxième partie présentera les matériels et les méthodes utilisés au cours de ce travail.

La troisième partie présentera l'ensemble des résultats obtenus argumentée par une discussion et sera divisée en trois chapitres : Le premier chapitre sera consacré au développement des éponges. La caractérisation physicochimique, la cytocompatibilité et la fonctionnalisation des éponges avec le VEGF seront décrites. L'étude de la libération et la bio-activité du VEGF seront également présents. Le deuxième chapitre sera dédié au développement et à l'optimisation des hydrogels injectables. L'analyse rhéologique, l'injectabilité et la cytocompatibilité seront étudiées. Finalement, le troisième chapitre concernera une étude prospective pour montrer la faisabilité de former des hydrogels injectables et des éponges composites en ajoutant une phase minérale, l'HAp.

Enfin, une dernière partie permettra faire une conclusion générale et de proposer des perspectives pour la suite de ce travail.

## **PARTIE 1. ETUDE BIBLIOGRAPHIQUE**

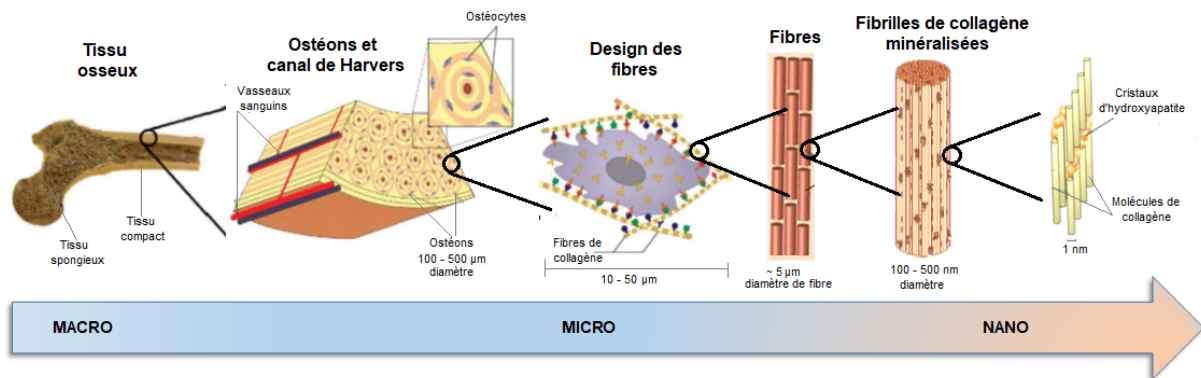
---



## Chapitre 1. Physiologie du tissu osseux

### 1. Morphologie et composition de l'os

L'os est un tissu conjonctif multi-échelle et hautement vascularisé, un composite hiérarchiquement structuré qui joue plusieurs rôles physiologiques. L'organisation du tissu osseux compte différents ordres de grandeur : de l'échelle macroscopique (organes) à l'échelle nanoscopique (matrice extracellulaire (MEC))<sup>(1-3)</sup> (Figure 1). L'os est également connu en tant que matériau « intelligent » par sa capacité de régénération sans produire de cicatrice<sup>(4)</sup>.



**Figure 1.** Structure hiérarchique de l'os de l'échelle macroscopique à l'échelle nanoscopique. Adapté de Stevens<sup>(1)</sup> et de Nair *et al.*<sup>(3)</sup>.

#### 1.1. La matrice extracellulaire

Le tissu osseux se compose principalement de fibres de collagène, de cristaux d'apatite de calcium et de phosphate qui forment de fines aiguilles à l'intérieur et entre les fibres de collagène<sup>(5)</sup>. La matrice extracellulaire osseuse est constituée d'environ 20 à 30% de matrice organique, de 5 à 10% d'eau et de 60 à 70% de matrice minérale<sup>(2,6)</sup>. Cette composition est déterminante pour les propriétés de résistance à la compression et la ténacité du tissu osseux<sup>(1,2)</sup>.

##### 1.1.1. La matrice organique

La partie organique du tissu osseux est principalement composée de protéines collagéniques (90%) et de protéines non collagéniques (10%)<sup>(2,7)</sup>. Le collagène de type I dit fibrillaire comprend 97% de protéines collagéniques, le reste est constitué de petites quantités de collagène de type III, V, X, XI et XIII<sup>(7,8)</sup>. Dans l'os mature, les fibres de collagène sont orientées en couches alternées, ce qui confère une résistance maximale à la structure (os lamellaire), et par conséquent, la ténacité<sup>(8,9)</sup> et l'élasticité<sup>(4,7)</sup> du tissu osseux.

Les protéines non collagéniques sont composées notamment des glycoprotéines, de protéoglycanes, de protéines  $\gamma$ -carboxylées (Gla) et de facteurs de croissance (FC)<sup>(1,7-9)</sup>. Ces



molécules jouent un rôle physiologique essentiel dans la régulation de l'activité des cellules osseuses et pendant le processus de minéralisation<sup>(2,6,9)</sup>.

### 1.1.2. La matrice minérale

La matrice minérale ou inorganique de l'os se compose principalement d'ions phosphate et d'ions calcium sous la forme de cristaux d'hydroxyapatite (HAp,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ )(6,7). Néanmoins, d'autres composants tels que le bicarbonate, le sodium, le potassium, le citrate, le magnésium, le carbonate, la fluorite, le zinc, le baryum et le strontium sont également présents en petites quantités<sup>(4)</sup>. Les cristaux d'HAp ont une épaisseur de 2 à 6 nm et une largeur de 30 à 50 nm, et sont considérés comme les plus petits cristaux biogéniques<sup>(2)</sup>. Ceux-ci se trouvent le long des fibres de collagène et dans la substance fondamentale (ensemble de protéines). Ainsi, la phase minérale renforce les propriétés mécaniques de l'os et le rend plus rigide<sup>(8,9)</sup>.

## 1.2. Les cellules osseuses

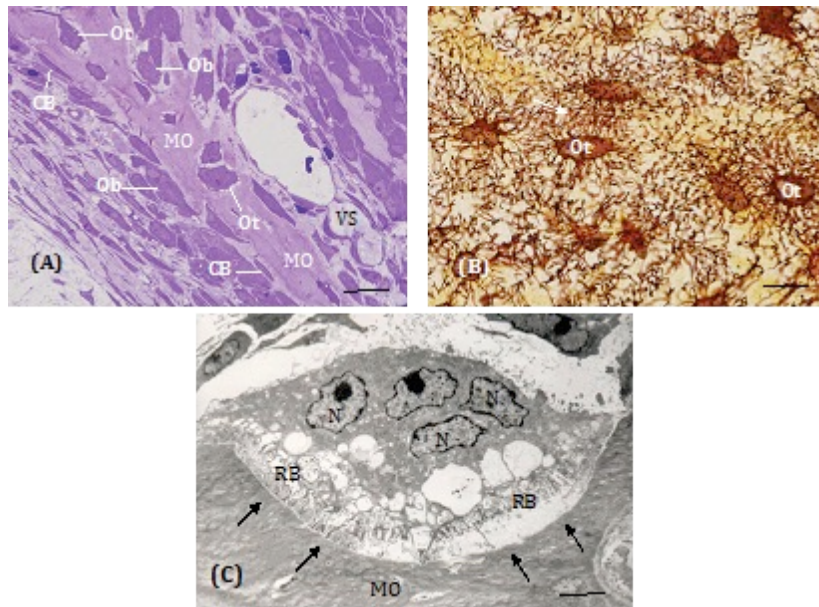
Le tissu osseux est composé de cellules de différentes origines qui agissent ensemble dans la modélisation et remodelage osseux notamment les cellules ostéoprogénitrices (ostéoblastes et ostéocytes) et les ostéoclastes qui sont décrites ci-dessous<sup>(8)</sup>.

Les **ostéoblastes** sont des cellules dérivées des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et leur fonction principale est de fixer la matrice extracellulaire riche en collagène (ostéoïde). Elles sont également responsables de la régulation et de la minéralisation du tissu osseux<sup>(4,6)</sup>. Ces cellules présentent une morphologie cuboïdale et elles forment une couche serrée de cellules à la surface de l'os (Figure 2a). Les ostéoblastes ont une durée de vie d'environ 8 semaines chez l'homme. Lors de cette période, elles déposent entre 0,5 et 1,5  $\mu\text{m}$  d'ostéoïde par jour<sup>(6)</sup>. A la fin de leurs vies, les ostéoblastes peuvent s'internaliser dans la matrice minéralisée, changer leur phénotype et devenir *ostéocytes*. Elles peuvent aussi se transformer en ostéoblastes inactives dites *cellules bordantes* ou subir une mort cellulaire programmée (apoptose)<sup>(6,8)</sup>.

Les **cellules bordantes** sont des ostéoblastes aplatis formant une monocouche à la surface de l'os (Figure 2a). Celles-ci sont inactives et ne sont pas soumises à la formation ni à la résorption de l'os. Elles empêchent l'interaction directe entre les ostéoclastes et la matrice osseuse, lorsque la résorption osseuse ne doit pas se produire<sup>(10)</sup>. De plus, les cellules bordantes peuvent être activées par une hormone, une cytokine ou un facteur de croissance. Elles agissent donc comme une source d'ostéoblastes de réserve<sup>(11)</sup>.

Les **ostéocytes** sont les cellules osseuses les plus abondantes<sup>(6,8)</sup>. Elles sont plus petites que les ostéoblastes et présentent un plus grand nombre de filopodes ou extensions cytoplasmiques (Figure 2b). De cette manière, les ostéocytes peuvent être interconnectés les

uns avec les autres et également avec les cellules bordantes<sup>(6)</sup>. Les ostéocytes détectent la contrainte mécanique et envoient des signaux pour résorber ou former de l'os<sup>(4,6)</sup>.



**Figure 2.** Micrographies de l'os alvéolaire murin. **(A)** Dans la section de trabécule osseuse, les ostéoblastes (Ob) et les cellules bordantes (CB) sont présents à la surface de l'os, tandis que des ostéocytes (Ot) sont observés piégés dans la matrice osseuse (MO). VS : vaisseaux sanguins. Barre d'échelle : 15  $\mu\text{m}$ . **(B)** Les ostéocytes (Ot) reliés les uns aux autres en utilisant ses extensions cytoplasmiques (flèches). Barre d'échelle : 15  $\mu\text{m}$ . **(C)** L'ostéoclaste multinucléée montre une bordure rugueuse (RB) limitrophe à la lacune de résorption (flèches). N : noyau. MO : matrice osseuse. Barre d'échelle : 4  $\mu\text{m}$ . Adapté de Florencio-Silva *et al.*<sup>(10)</sup>.

Les **ostéoclastes** sont des cellules dérivées des cellules souches hématopoïétiques et sont similaires aux macrophages. Celles-ci sont des cellules hautement migratrices, multinucléées et polarisées, et sont porteuses d'un grand nombre d'enzymes lysosomales. Les ostéoclastes sont responsables de la résorption de la matrice minérale du tissu osseux par acidification<sup>(6,8)</sup>. Une caractéristique très particulière est leur capacité à former un joint étanche avec la matrice calcifiée. Lors de leur activité, les ostéoclastes forment une lacune de résorption (Figure 2c) dans laquelle les enzymes lytiques sont sécrétées. Un ostéoclaste activé est capable de résorber 200 000  $\mu\text{m}^3$ /jour d'os, ce qui correspond à une quantité d'os formée de sept à dix générations d'ostéoblastes qui ont une durée de vie moyenne de 15 à 20 jours<sup>(6)</sup>.

### 1.3. Structures osseuses

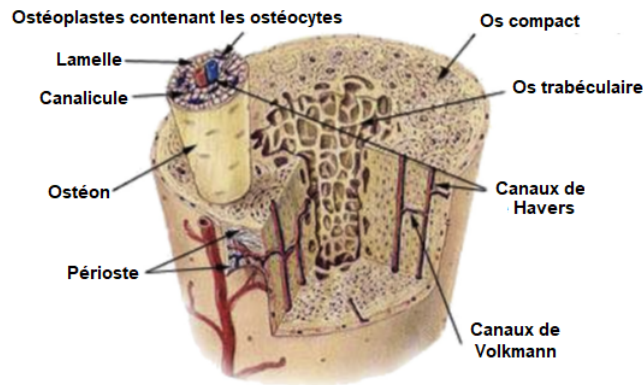
Les os peuvent être classés selon différents critères tels que la forme ou la microstructure. Selon la forme, ils sont classifiés comme des os longs (*e.g.* le fémur et le tibia), des os courts (*e.g.* les carpes et les tarse), des os plats (*e.g.* les os du crâne et les côtes) et des os irréguliers (*e.g.* les vertèbres et le coccyx)<sup>(12,13)</sup>.

D'un point de vue microstructural, l'os est constitué de deux structures selon le niveau de maturité : le tissu osseux réticulaire et le tissu osseux lamellaire. Le **tissu osseux**

**réticulaire** ou primaire se trouve principalement au stade embryonnaire et foetal. Il fait partie des ligaments et des tendons et il est présent lors des étapes précoces de la réparation osseuse. C'est un tissu à structure irrégulière avec des fibres de collagène désorganisées. Il est généralement résorbé et remplacé rapidement par du tissu lamellaire<sup>(6,12)</sup>. Le **tissu osseux lamellaire** est l'os mature composé de fibrilles de collagène, déposées par les ostéoblastes de façon organisée dans des orientations alternées. Cette structure confère une résistance mécanique supérieure à celle de l'os réticulaire<sup>(12)</sup>. Ainsi, les os matures (lamellaire) présentent deux structures architecturales en fonction de leurs porosités, de leurs structures et de leurs activités métaboliques : l'os cortical et l'os trabéculaire<sup>(6,14,15)</sup>. En général, le squelette humain adulte est constitué d'environ 80% d'os cortical et d'environ 20% d'os trabéculaire. Les rapports d'os corticaux et d'os trabéculaires peuvent varier en fonction du type d'os (*i.e.* un os long ou un os plat)<sup>(12,15,16)</sup>.

**L'os cortical** se trouve dans la partie externe de l'os et n'est pas en contact avec la moelle osseuse. C'est un os dense, rigide et solide, similaire à une matrice de phosphate de calcium<sup>(8,13,15)</sup>. Il s'agit d'une structure hiérarchique constituée d'unités répétitives dit ostéons ou système de Havers qui contiennent des fibres de collagène minéralisées sous forme de lamelles parallèles. Celles-ci se déposent autour du canal de Havers contenant des vaisseaux sanguins et des nerfs<sup>(7,8,13)</sup>. Les canaux de Havers sont interconnectés et reliés au périoste (surface de l'os enrichi en vaisseaux sanguins et fibres nerveuses) par des canaux transversaux appelés canaux de Volkmann<sup>(7,13)</sup>. Les ostéocytes sont internalisés dans des structures comme les ostéoblastes qui se trouvent entre les lamelles. Ces cellules sont reliées entre elles à travers des canalicules, permettant l'échange de nutriments et de déchets métaboliques (Figure 3)<sup>(13)</sup>. L'os cortical fournit les propriétés de résistance à la torsion/flexion, grâce aux ostéons, et à la compression<sup>(8)</sup>.

**L'os trabéculaire** est un os très poreux (> 75% de porosité) situé dans le noyau interne des os<sup>(13,15)</sup> (Figure 3). Il est composé d'un réseau interconnecté formé par des plaques, appelées trabécules, qui sont remplis de moelle osseuse rouge<sup>(8,13,16)</sup>. Contrairement à l'os cortical, le tissu spongieux est métaboliquement actif et peut être remodelé plus fréquemment. Ceci grâce aux trabécules qui offrent une grande surface disponible pour la diffusion des nutriments et l'exposition aux facteurs de croissance en circulation constante<sup>(8)</sup>. Bien que les trabécules soient disposées de manière aléatoire, leur rigidité et leur élasticité confèrent au tissu spongieux une résistance aux contraintes mécaniques<sup>(15,16)</sup>.



**Figure 3.** Microstructure de l'os (os cortical et os trabéculaire)<sup>(7)</sup>.

## 2. Physiologie de l'os

L'os est considéré comme étant la plus grande partie du tissu conjonctif du corps humain. Il est notamment capable d'exercer de nombreuses fonctions métaboliques, physiques et endocriniennes. Les fonctions les plus caractéristiques sont : (1) le soutien structurel et la locomotion, (2) la protection des organes internes ; (3) le maintien de l'homéostasie systémique des minéraux via le stockage des ions calcium, phosphore et magnésium. L'os contient plus de 99% du calcium, le 85% du phosphore et le 65% du magnésium du corps humain ; (4) la désintoxication des métaux lourds (par exemple le plomb) en les éliminant de la circulation sanguine ; (5) le stockage des FC et éléments biologiques nécessaires à l'hématopoïèse ; (6) le maintien de l'équilibre acido – basique du sang en absorbant ou en libérant des sels alcalins contre les variations excessives du pH ; (7) le contrôle du métabolisme du phosphate dans les reins. De plus, l'os est capable de se renouveler et de se remodeler en permanence tout au long de la vie<sup>(7,14,17)</sup>.

### 2.1. Le remodelage osseux

L'os est un tissu dynamique qui subit deux processus : la modélisation et le remodelage osseux. Dans la modélisation, le nouvel os est déposé sans résorption osseuse préalable contrairement au processus de remodelage, où la formation de l'os suit la phase de résorption par les ostéoclastes. La modélisation est caractéristique plutôt lors de la croissance, alors que le remodelage osseux est le processus le plus actif qui dure toute la vie<sup>(6,18)</sup>. Le remodelage aide non seulement à réparer les tissus endommagés, mais également à réguler le taux de calcium sérique dans le corps<sup>(6,9)</sup>.

Le cycle du remodelage osseux comprend 5 étapes qui sont illustrées dans la Figure 4 : l'activation, la résorption, l'inversion, la formation et enfin le repos (quiescence)<sup>(6,17,19)</sup>. La durée du cycle de remodelage est de 3 à 6 mois chez l'Homme<sup>(6)</sup>. L'os trabéculaire est celui qui subit plus souvent le remodelage osseux (25% d'os remplacé par an) alors que l'os corticale est renouvelé de 3% chaque année<sup>(18)</sup>. Le remodelage peut être d'origine hormonal dû à une

augmentation de l'hormone parathyroïdienne (PTH) ou d'origine mécanique dû à la réponse à une microlésion<sup>(9)</sup>.

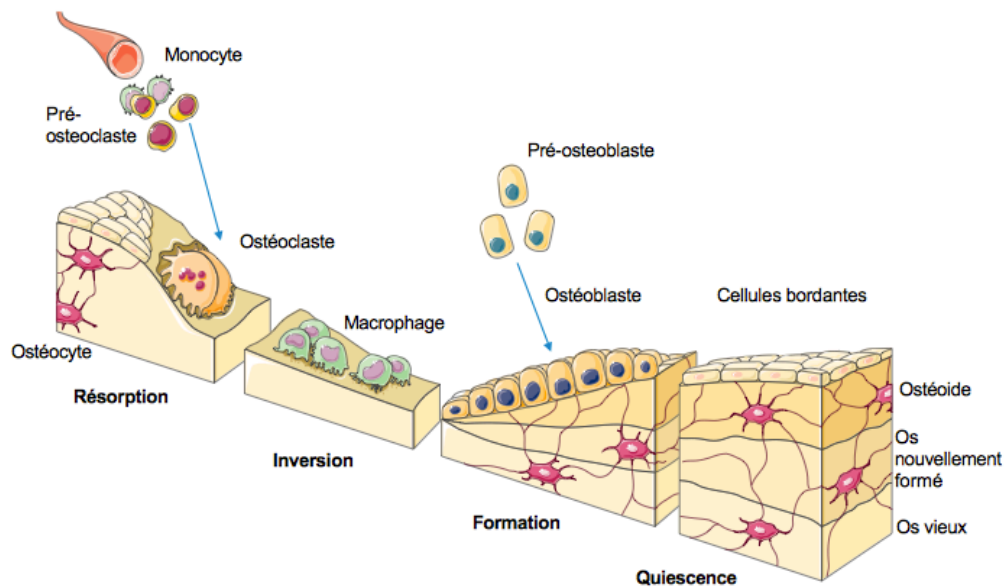


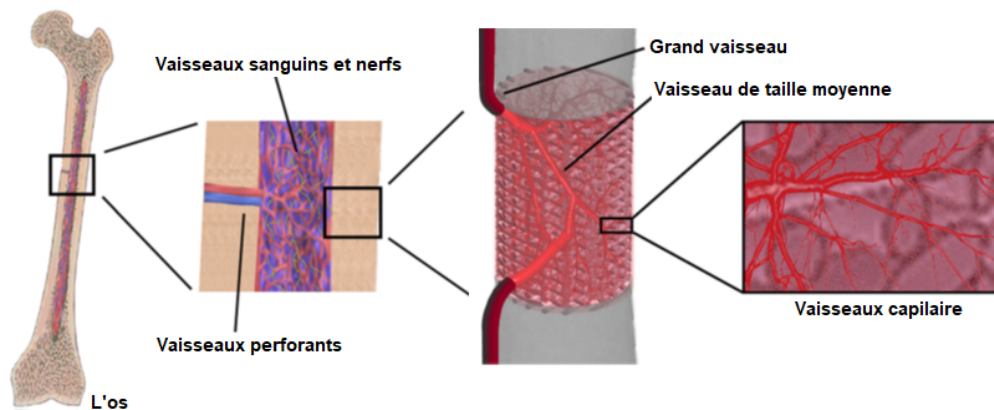
Figure 4. Cycle du remodelage osseux<sup>(20)</sup>.

Lors de la première étape (**phase d'activation**), les cellules bordantes empêchent l'accès à la matrice osseuse aux ostéoclastes. Suite à l'action de signaux initiateurs tels que le PTH, les cellules bordantes se rétractent et permettent l'accès aux ostéoclastes. Ces derniers se fixent à la surface osseuse minéralisée<sup>(9,12,17)</sup>. La **phase de résorption** a ensuite lieu. Les ostéoclastes sont activés et commencent à sécréter des ions  $H^+$  afin de dissoudre la matrice minérale par acidification. Les ostéoclastes libèrent également des enzymes dégradant la matrice organique. Enfin, ces derniers finissent par former une lacune et provoquer l'apoptose<sup>(9,17)</sup>. Pendant la **phase d'inversion**, les ostéoclastes morts sont alors éliminés par des macrophages, et une couche mince à base de glycoprotéines est formée au fond de la lacune<sup>(9,12,17)</sup>. La **phase de formation** se déroule en deux parties. Tout d'abord, les pré-ostéoblastes synthétisent une substance liante sur laquelle le nouveau tissu est attaché et expriment des BMPs (Bone Morphogenic Proteins) responsables de la différenciation. Ces dernières se divisent et deviennent des ostéoblastes. Quelques jours plus tard, les ostéoblastes synthétisent la matrice ostéoïde qui comble la lacune et dans un second temps, ils initient la minéralisation, le nouvel os est ainsi formé<sup>(9,17)</sup>. Finalement, dans la **phase de repos**, la formation osseuse est terminée. Ainsi, certains ostéoblastes subissent une apoptose, d'autres deviennent des cellules bordantes et d'autres sont piégés dans l'os minéralisé où ils restent sous forme d'ostéocytes<sup>(9,12)</sup>.

## 2.2. Vascularisation du tissu osseux

L'os est un tissu hautement vascularisé (Figure 5), une propriété qui est vitale pour son bon fonctionnement (croissance osseuse et réparation osseuse)<sup>(21)</sup>. La vascularisation joue un

rôle très important dans la nutrition et le transport de l'oxygène vers les cellules osseuses et les cellules endothéliales (EC)<sup>(22-24)</sup>. Ainsi, les ostéocytes sont situés à moins de 100 µm d'un vaisseau sanguin<sup>(1,25)</sup> qui apportent différentes biomolécules aux tissu osseux tels que les hormones et les FC<sup>(24)</sup>. Il y a 4 types de réseaux vasculaires dans l'os long adulte : diaphysaire, métaphysaire, épiphysaire et périosté<sup>(22,26,27)</sup>. L'artère diaphysaire traverse l'intérieure de l'os et se répand parmi les canaux de Havers et les canaux des Volkmann, ceux-ci formant des vaisseaux sanguins interconnectés dans l'os cortical. Les artérioles se répandent également sous la forme des vaisseaux capillaires dans la moelle osseuse<sup>(21,27)</sup>. Lors de ramification de l'artère diaphysaire, les vaisseaux sanguins épiphysaires, métaphysaires et périostés pénètrent dans l'os et le connectent à l'approvisionnement vasculaire du tissu environnant<sup>(22)</sup>. Dans le cas des os courts ou plats, ils contiennent les vaisseaux sanguins à partir du périoste, un tissu hautement vascularisé qui entoure l'os et fournis des CSM<sup>(22,23)</sup>. Un des acteurs principaux dans la vascularisation et dans l'angiogenèse osseuse est le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF), plus spécialement le VEGF-A. Cette biomolécule agit comme une molécule chimiotactique en attirant des ECs et en contrôlant différentes fonctions des cellules osseuses<sup>(24)</sup>. Elle joue donc un rôle important lors du développement osseux, et participe activement à plusieurs étapes de la réparation osseuse<sup>(28)</sup>. Son rôle dans les phénomènes de vasculogenèse et d'angiogenèse sera discuté en détail plus tard.



**Figure 5.** Niveaux hiérarchiques dans le réseau vasculaire osseux. Les grands vaisseaux se ramifient à l'intérieur de l'os sous la forme des capillaires plus petits pour fournir le sang au sein de l'os. Adapté de Mercado-Pagan *et al.*<sup>(23)</sup>.

### 2.3. Ostéogénèse et réparation osseuse

Le tissu osseux a la capacité de se régénérer spontanément en limitant les fractures, sauf dans le cas d'une charge dépassant la résistance de l'os ou dans le cas de dommages progressivement accumulés<sup>(7)</sup>. Suite à l'apparition d'une fracture, un processus complexe est déclenché. Ces événements impliquent une interaction coordonnée des cellules, des FCs et de la MEC. La réparation osseuse peut se diviser en deux catégories en fonction de la quantité de tissu perdue. La *réparation osseuse primaire* est rare et se produit lorsque la taille de

fracture est inférieure à 0,1 mm<sup>(7,18)</sup>. La *réparation osseuse secondaire* est la plus courante et se produit lorsque les bords de la fracture sont au moins de deux fois le diamètre de l'os blessé<sup>(18)</sup>. Dans ce contexte, plusieurs événements se produisent : l'inflammation, la formation de cals mous, l'ossification membraneuse et enchondrale et le remodelage osseux<sup>(7,18)</sup>.

### 2.3.1. Types d'ostéogenèse

La formation osseuse est divisée en deux types : l'ossification membraneuse et l'ossification enchondrale. Bien que ces processus d'ossification soient différents, ils présentent certaines caractéristiques communes. La vascularisation, qui est fondamentale pour la formation correcte de l'os dans les deux cas<sup>(22)</sup>, et les CSM, qui jouent un rôle important et servent de matrice initiale pour la formation ultérieure de l'os<sup>(14)</sup>. Plusieurs régulateurs moléculaires critiques sont aussi partagés, tels que le peptide apparenté à l'hormone parathyroïdienne (PTHrP), les BMPs, le VEGF et les facteurs de croissance fibroblastique (FGF)<sup>(14)</sup>.

#### 2.3.1.1. Ossification membraneuse

L'ossification membraneuse est responsable de la formation des os plats lors du renouvellement<sup>(7,14,17,22)</sup>, ou de la réparation suite à une fracture<sup>(17)</sup>. Dans ce processus, l'os est formé à partir de tissu conjonctif tel que le mésenchyme sans intermédiaire cartilagineux. La formation de l'os est produite à partir des CSM trouvées dans la cavité médullaire d'une fracture qui est hautement vascularisée. Celles-ci sont différenciées directement en ostéoblastes<sup>(14)</sup> lesquels sécrètent l'osteoïde sous forme de fibrilles de collagène désorganisées dans la matrice extracellulaire (MEC) environnante<sup>(7,17,22)</sup>. Ensuite, les ostéoblastes commencent à minéraliser l'osteoïde. Lors de la minéralisation, certains ostéoblastes restent piégés dans la matrice (en devenant ostéocytes), les trabécules s'épaississent progressivement et les espaces sont occupés par le tissu hémopoïétique. Ce tissu est connu comme le tissu réticulé qui sera finalement remplacé par le tissu lamellaire après remodelage<sup>(17)</sup>.

#### 2.3.1.2. Ossification enchondrale

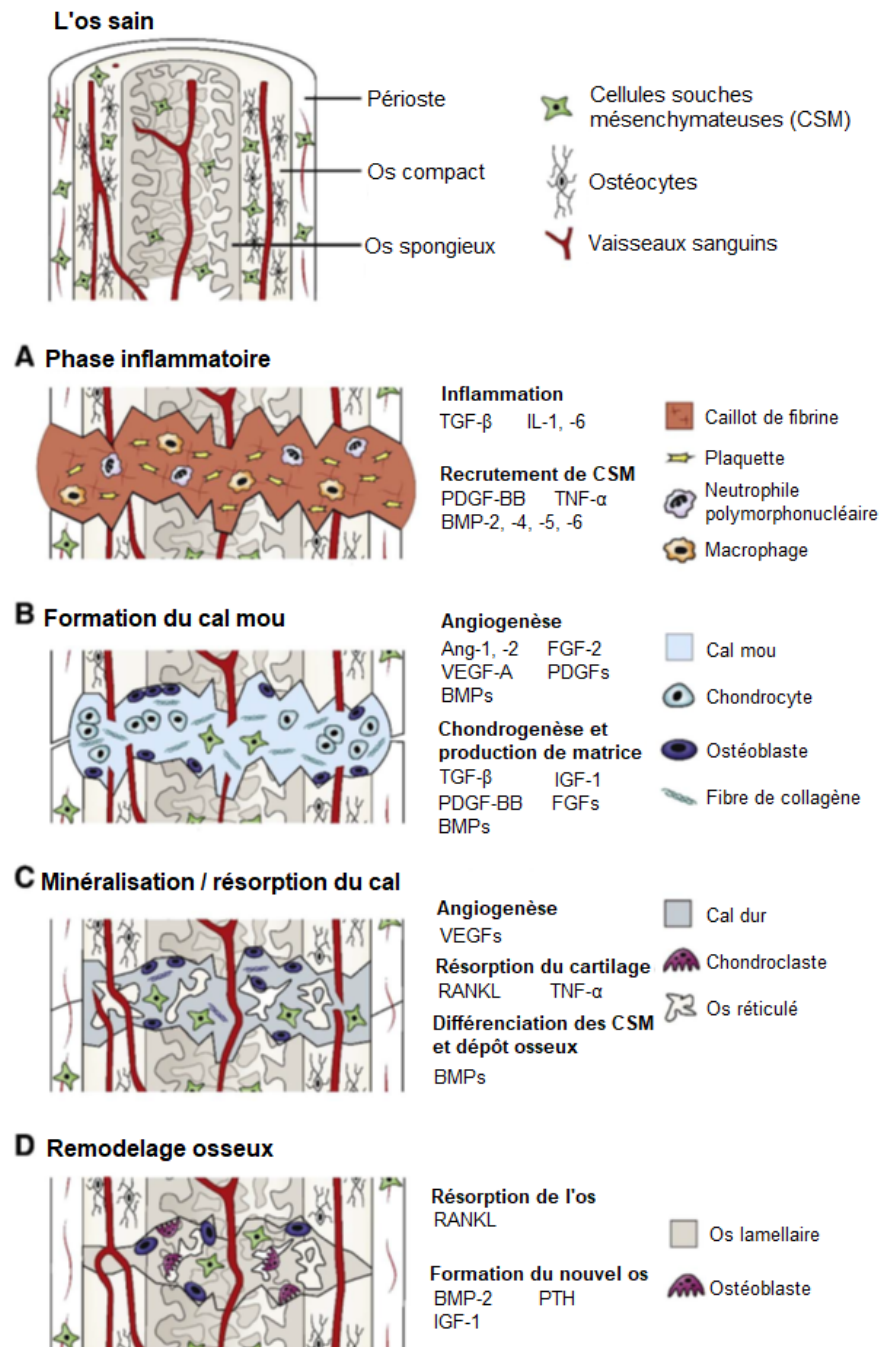
L'ossification enchondrale se produit principalement dans les os longs et dans la plupart des autres os du corps<sup>(7,14,17,22)</sup>. Il s'agit d'un processus fondamental lors de la croissance des os longs mais aussi dans la réparation des fractures<sup>(17)</sup>. Les cellules mésenchymateuses vont se différencier d'abord en chondrocytes<sup>(14,22)</sup>. Ces cellules prolifèrent et produisent une matrice cartilagineuse via la sécrétion de collagène et de protéoglycanes, qui va servir de scaffold pour la formation du nouvel os<sup>(7,14,22)</sup>. Puis, les chondrocytes subissent d'une hypertrophie suivie d'une calcification et d'une apoptose subséquente. La dégradation de la matrice est accomplie par les chondroclastes<sup>(22)</sup>. Les vaisseaux sanguins colonisent la région cartilagineuse calcifiée.

Ceux-ci transportent les cellules hémopoïétiques et les cellules ostéoprogénitrices qui deviendront des ostéoblastes. Finalement, la matrice osseuse sera déposée dans une première étape en forme du tissu réticulé, lequel sera remplacé par un tissu mature lamellaire<sup>(7,22)</sup>.

### 2.3.2. Phases de la réparation osseuses des fractures

Lors d'une fracture un processus physiologique complexe se déroule pour réparer l'os (Figure 6). Ce mécanisme commence avec la **phase inflammatoire** et la formation d'un hématome dû à la lésion des tissus et des vaisseaux sanguins (Figure 6A). La dégranulation des plaquettes et l'activation des cellules inflammatoires survient alors. Ces cellules libèrent des cytokines et des FCs, comme les interleukines (ILs), le facteur de nécrose tumorale alpha (TNF- $\alpha$ ), le FGF, les BMPs, le facteur de croissance dérivé des plaquettes (PDGF), le VEGF, etc., nécessaires à la réparation osseuse<sup>(7,14,29)</sup>. Les CSMs, les cellules du périoste et celles des vaisseaux sanguins sont donc recrutées vers la lésion. Cette étape peut durer jusqu'à 7 jours avec une réponse inflammatoire maximale après 24 h<sup>(29)</sup>. Ensuite, l'ossification membraneuse se produit au niveau du cortex et au périoste<sup>(14)</sup>. L'ossification enchondrale commence avec la **formation d'un cal mou** (Figure 6B). Les CSMs sont différenciées en chondrocytes qui forment cette matrice cartilagineuse riche en collagène (section 1.1.2), laquelle maintient la lésion<sup>(29)</sup>. Lors de cette étape, la prolifération et la croissance des vaisseaux sanguins est déclenchée. En même temps, la minéralisation par les chondrocytes hypertrophiques est enclenchée pour former un cal « dur »<sup>(14,29)</sup>. Par la suite, les CSMs apportées par le système vasculaire, et grâce à l'action des BMPs, sont différenciées en ostéoblastes et l'étape de **minéralisation** commence (Figure 6C). Dans cette étape, les chondroclastes dégradent le cal dur et les ostéoblastes synthétisent la matrice osseuse minéralisée<sup>(7,9,14,29)</sup>. Le nouveau tissu formé est du tissu osseux réticulé qui après l'étape de **remodelage** (Figure 6D) est transformé en tissu osseux lamellaire<sup>(9)</sup>. Lors de ce stade final, le cycle de remodelage se répète plusieurs fois, et donc les ostéoblastes et les ostéoclastes amènent la restauration de la structure et des fonctions (e.g. les propriétés mécaniques) de l'os sain<sup>(7,29)</sup>.





**Figure 6.** Schéma de la réparation osseuse d'une fracture avec les différents acteurs. Chaque phase est régulée par la sécrétion de différentes cytokines et facteurs de croissance. Ang : angiopoïétine ; IGF-1 : facteur de croissance analogue à l'insuline ; RANKL : Ligand du récepteur activateur du facteur nucléaire kappa B. TGF- $\beta$  : facteur de croissance transformant  $-\beta^{(30)}$ .

### **3. Conclusion**

L'os est un tissu vascularisé qui est constamment renouvelé et qui mène plusieurs rôles métaboliques, physiques et endocriniennes dans le corps humain. L'os subit le processus important de la réparation osseuse qui permet la consolidation des fractures. Ce processus comprend plusieurs étapes dans lesquelles un ensemble de facteurs de croissance, de cytokines et d'hormones agissent conjointement ou séparément.

Néanmoins, certains défauts ou lésions ne peuvent pas être régénérés de manière naturelle. Ainsi, dans le cas de la non-consolidation osseuse, la fixation osseuse et le comblement d'un éventuel défaut osseux est devenu indispensable. Le développement et l'application de greffes osseuses ou de substituts osseux est donc indispensable pour favoriser la réparation osseuse, ce qui sera détaillé dans la section suivante. De même, une approche par l'ingénierie tissulaire, en élaborant des bio-soutiens, est considérée comme une alternative pour favoriser la régénération de l'os. Il est donc particulièrement important de connaître et comprendre la biologie osseuse, les processus biologiques et les biomolécules pour appliquer ces connaissances dans le développement de scaffold pour favoriser la régénération de l'os.

## Chapitre 2. Défaut osseux et stratégies de réparation osseuse

---

Comme décrit dans le chapitre 2, l'os est capable de se réparer en continu. Cependant, si la taille de la lésion est supérieure à 3 mm, le corps ne sera pas capable de produire de l'os en quantité suffisante<sup>(31)</sup>. De plus, le manque de vascularisation empêchera la formation de cals et la consolidation osseuse sera perturbée<sup>(31,32)</sup>. Ces lésions sont la conséquence de défauts osseux larges survenant lors de traumatismes, de maladies comme l'ostéonécrose, de déformations, de résections tumorales ou d'infections comme l'ostéomyélite<sup>(18,31)</sup>. Dans ce cas, le chirurgien devra utiliser une greffe ou un substitut osseux pour favoriser la guérison<sup>(32)</sup>. Actuellement, sur les 6,3 millions de personnes qui ont des fractures chaque année aux États-Unis, au moins 500 000 ont besoin d'une greffe osseuse. Ces chiffres se traduisent par un coût d'environ 2,5 milliards de dollars par an. Par conséquent, la perte osseuse devient un problème clinique et socio-économique majeur<sup>(31)</sup>.

Les greffes et substituts osseux doivent avoir 3 caractéristiques essentielles : (1) *l'ostéointégration* qui permet l'ancrage stable d'un substitut par contact direct avec l'os sans formation d'un tissu fibreux, (2) *l'ostéoconduction*, qui soutient la fixation, la prolifération et la migration des cellules osseuses vers/dans le substitut et (3) *l'ostéoinduction*, qui induit le recrutement et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices par la formation du nouvel os (ostéogenèse)<sup>(18,31,32)</sup>. Dans ce chapitre les greffes osseuses, les substituts osseux et l'approche de l'ingénierie tissulaire seront présentés.

### 1. Greffes et substituts osseux

#### 1.1. Les greffes osseuses

##### 1.1.1. Les autogreffes

L'autogreffe est considérée comme le « gold standard » pour le traitement des fractures non consolidées et des défaut osseux larges<sup>(18,29,31-33)</sup>. L'autogreffe possède les propriétés ostéoconductive, ostéoinductive et ostéogénique nécessaires pour l'intégration de l'os et la réparation osseuse<sup>(18)</sup>. Dans ce cas, le greffon est obtenu à partir du même patient généralement à partir du pelvis ou de la crête iliaque<sup>(31,32)</sup>. Une méthode développée récemment, RIA (reamer-irrigator-aspirator), permet d'obtenir des greffes à partir du canal intramédullaire du fémur ou du tibia. Il existe deux types d'autogreffes : soit à partir du tissu spongieux qui est une source de CSMs avec un taux de revascularisation important ; soit à partir du tissu cortical qui possède un meilleur soutien mécanique<sup>(18)</sup>. La technique de l'autogreffe présente plusieurs complications dont la morbidité au site du donneur<sup>(31-33)</sup>, une disponibilité limitée des tissus pouvant servir à l'autogreffe<sup>(18,29,31-33)</sup>, des douleurs et la paresthésie<sup>(29,31)</sup>, une durée d'intervention, d'hospitalisation et de rééducation

prolongées<sup>(29,31,33)</sup> et un risque accru d'infections profondes, d'inflammation et d'hémorragies<sup>(18,31)</sup>.

Une autre option pour améliorer la réparation osseuse est l'utilisation d'autogreffes vascularisées<sup>(34–36)</sup>. Les greffes vascularisées comprennent les lambeaux pédiculés et les lambeaux libres. Dans le cas des lambeaux pédiculés, la greffe osseuse reste attachée à sa source sanguine : le tissu osseux donneur doit rester à proximité du site d'implantation<sup>(34,37)</sup>. En revanche, les lambeaux libres sont des greffes séparées de leur source de sang. Ils sont revascularisés par une anastomose afin d'être intégrés à la circulation sanguine du site receveur<sup>(34,37)</sup>. Malgré leurs avantages sur les greffes conventionnelles, cette technique nécessite une intervention chirurgicale plus complexe avec certains inconvénients identiques à l'autogreffe<sup>(34,36)</sup>.

### *1.1.2. Les allogreffes*

Afin de surmonter le problème de la morbidité au site du donneur, les allogreffes sont une bonne alternative aux autogreffes. Ces greffons sont obtenus à partir de cadavres humains ou de donneurs. Comme dans les cas des autogreffes, il existe aussi des allogreffes vascularisées<sup>(38)</sup>. L'allogreffe peut subir divers traitements et seront donc disponibles sous différentes formes notamment des dérivés d'os corticaux, d'os spongieux et de matrice osseuse déminéralisée<sup>(18)</sup>. Néanmoins, il existe des inconvénients tels que le rejet immunitaire et le risque de transmission de maladies du donneur au receveur<sup>(18,31–33)</sup>. Une bio-activité réduite est aussi remarquée où la disparition de l'ostéoinduction empêchant la néovascularisation et provoquant la nécrose des cellules ostéoprogénitrices<sup>(18)</sup>.

### *1.1.3. Les xénogreffes*

Les xénogreffes sont obtenus à partir de tissus animaux, le plus utilisé étant le tissu d'origine bovine<sup>(33,39)</sup>. Ce type de greffes nécessite une déminéralisation, une déprotéinisation et une stérilisation<sup>(39,40)</sup>. Le BioOss<sup>®</sup> (Geistlich AG, Suisse) est un produit commercial très utilisé dans le domaine de la chirurgie dentaire. Il est composé de la partie minérale de l'os bovin avec une granulométrie de 0,25 – 2 mm et présente de bonnes propriétés mécaniques et une structure similaire à celle de l'os humain. Des autres produits xénogéniques comme l'OsteoGraf N, le Cerabone<sup>®</sup>, le Nu-Oss<sup>®</sup>, le Biotek<sup>®</sup>, l'Osteobiol<sup>®</sup> et le Pegen P-15<sup>®</sup> sont également sur le marché. La différence entre chaque produit est leur source (bovine, porcine, ou chevaline) et leurs procédés de fabrication (par exemple le frittage)<sup>(41)</sup>. Par contre, il existe des inconvénients comme la possible toxicité liée à la stérilisation<sup>(31,33)</sup>. Sur cette base, la recherche de nouveaux matériaux pour la réparation osseuse est nécessaire afin de surmonter les inconvénients des greffes d'origine naturelle.

## 1.2. Substituts osseux



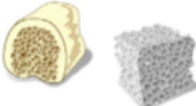

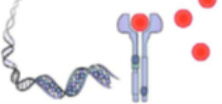





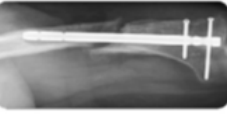
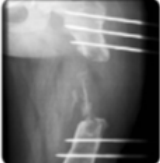
De nos jours, il existe une quantité importante des substituts osseux naturels et synthétiques sur le marché. Parmi les substituts d'origine naturelle, ceux à base de corail (dérivé du corail marin) sont principalement composés de carbonate de calcium conservé à l'état d'origine ou transformé industriellement en HAp (HAp dérivé du corail). Sa structure poreuse interconnectée ressemble à celle de l'os cortical et de l'os spongieux humain<sup>(42,43)</sup>. Dans cette partie, nous allons plus particulièrement nous concentrer sur les substituts osseux synthétiques. En effet, l'évolution de ces produits a donné lieu à trois générations de substituts osseux comme le décrit Navarro *et al.*<sup>(44)</sup> :

*Les substituts osseux de première génération* sont des biomatériaux inertes vis-à-vis du microenvironnement tissulaire. Leur rôle principal est le support physique et mécanique du site d'implantation. Les implants métalliques (l'acier inoxydable, le titane et ses alliages), les céramiques (alumines et zircons) et les polymères (le polypropylène et le polyméthacrylate de méthyle) font partie de cette génération. Un problème courant avec ce type de biomatériaux est la formation de tissu fibreux autour du matériau en l'absence de propriétés ostéoconductive et ostéoinductive<sup>(8,44)</sup>.

*Les substituts osseux de deuxième génération* sont des biomatériaux possédant des propriétés ostéoconductive, *c.à.d.* qu'ils montrent une bio-activité vis-à-vis des tissus environnants après l'implantation. Ils comprennent les céramiques bioactives dites biocéramiques, notamment les bio-verres et les phosphates de calcium (CaP) avec des propriétés très similaires à la partie minérale de l'os<sup>(8,44)</sup>. Actuellement, les biocéramiques sont les substituts osseux les plus répandus sur le marché<sup>(18)</sup>. Afin d'améliorer l'activité des substituts de première génération, la modification de surface a été mise en place. De cette manière, des revêtements bioactifs à base de CaP comme l'HAp ou le phosphate tricalcique ( $\beta$ -TCP) ont été déposés sur le métal<sup>(8)</sup>. Par exemple, Nguyen *et al.*<sup>(45)</sup> ont évalué l'impact du dépôt d'un film d'HAp sur la surface des implants en Ti-6Al-4V au regard de l'ostéoconductive. Les résultats obtenus après implantation chez l'animal ont démontré que le film de CaP a augmenté considérablement le taux de croissance osseuse et donc une amélioration de l'ostéoconductive<sup>(45)</sup>. Les substituts de deuxième génération incluent également les polymères résorbables. Ainsi, les polymères synthétiques et naturels, avec une vitesse de dégradation chimique et/ou enzymatique contrôlée dans l'organisme, sont utilisés. Parmi eux, on trouve l'acide polylactique (PLA), la polycaprolactone (PCL) et la polyglycolide (PGA) pour les polymères synthétiques ; et le collagène, la gélatine, le chitosane (CHT), l'acide hyaluronique (HA), l'alginate ou encore la soie pour les polymères naturels<sup>(8,44)</sup>. En général, les substituts de deuxième génération ne sont utilisés que dans le cas de défauts bien vascularisés et en présence des tissus mous<sup>(43)</sup>.

Enfin, les *substituts osseux de troisième génération* cherchent à générer et à induire des réponses cellulaires spécifiques, en intégrant les concepts de bio-activité et la biodégradabilité. De cette façon, la réparation et la régénération osseuse seront améliorées. Ce type de biomatériau est donc basé sur l'approche de l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) qui sera développée dans la section 2. Ceci inclut l'utilisation de cellules et de FCs pour stimuler la régénération de l'os<sup>(8,31)</sup>.

Ho-Shui-Ling *et al.*<sup>(46)</sup> proposent 3 stratégies de réparation osseuse, dont les deux dernières sont comprises dans le concept de l'ITO : (1) les substituts osseux synthétiques seuls (première et deuxième génération), (2) les biomatériaux combinés avec des molécules bioactives et (3) les biomatériaux associés à des cellules de différentes sources (Figure 7).

Catégorie	DM Classe II	DM Classe III	MTI
Scaffold	3D Scaffold 	Eponges de collagène, biocéramiques 	Substituts osseux, biocéramiques 
Fonctionnalité supplémentaire	Modification de surface 	Facteurs de croissance, BMPs, PDGF, gènes, petites molécules 	Cellules souches BMSCs, ASCs, PDSCs 
Défait osseux	In situ  Petit < 2 cm	In situ  Intermédiaire/grand 2 - 4 cm	In vitro/ in situ  Grand et compromis > 4 cm
Observation clinique			

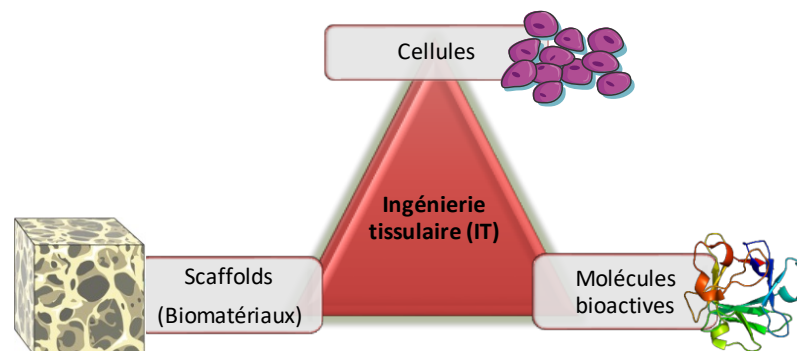
**Figure 7.** Les trois principales stratégies utilisées et développées pour réparer l'os. La classification présentée fait partie de la directive européenne 93/42/CE dans le cadre du Marquage CE. Celle-ci est faite en fonction de l'utilisation prévue et du niveau de risque du dispositif médical (DM). Les cellules souches appartiennent également à une catégorie spécifique : Médicaments de thérapie innovante (MTI). Plus le produit est complexe, plus le chemin vers la clinique est long et le coût du produit est élevé. Les produits les plus complexes sont de loin les produits à base de cellules souche<sup>(46)</sup>.

Actuellement sur le marché, nous pouvons trouver des substituts osseux incluant des FCs notamment les BMPs. A titre d'exemple, l'Op-1 Putty contenant le FC recombinant rhBMP-7 dans une matrice de collagène (Stryker Biotech, Hopkinton, MA) et l'InFUSE<sup>®</sup>, une éponge de collagène chargée avec rhBMP-2 (Medtronic, Memphis, TN) sont déjà approuvés par la FDA (Food and Drug Administration) pour une utilisation aux États-Unis<sup>(43,47,48)</sup>. Cependant, aucun d'eux n'est autorisé en France. En revanche, l'HAS (Haute Autorité de Santé) a approuvé le substitut osseux INDUCTOS<sup>®</sup> qui contient le FC recombinant rhBMP-2 (dibotermine alfa) sous forme injectable dans une matrice de collagène de type I (Medtronic Biopharma BV)<sup>(49)</sup>. Van Cauwenberge *et al.*<sup>(50)</sup> ont réalisé une étude clinique sur l'utilisation du substitut osseux INDUCTOS<sup>®</sup> sur 70 patients ayant des fractures non consolidées. La technique a permis d'obtenir une reconstruction et une consolidation chez 90% des patients avec un délai moyen de 6 mois<sup>(50)</sup>. Malgré des résultats positifs lors des essais cliniques, des effets indésirables peuvent survenir tels que la formation d'os ectopique, d'ostéolyse, *etc.*<sup>(43)</sup>.

Ces matériaux, n'étant pas complètement satisfaisants, les chercheurs ont été amenés à poursuivre leurs recherches sur de nouveaux produits ou approches favorisant la régénération osseuse et plus particulièrement la vascularisation notamment dans le cas des défaut osseux larges, pour lesquels le développement d'un réseaux vasculaire fonctionnel reste un défi<sup>(27)</sup>. L'ingénierie tissulaire osseuse apporterait une solution à la génération d'une vascularisation suffisante nécessaire aux larges substituts osseux pour la réparation osseuse.

## 2. L'ingénierie tissulaire osseuse

L'ingénierie tissulaire (IT) est définie comme un domaine scientifique multidisciplinaire et évoque l'application et l'intégration des principes et des stratégies des sciences médicales, de la biologie et de l'ingénierie. Ce domaine permet le développement de substituts biologiques pour la réparation, la préservation ou l'amélioration de la fonction des tissus ou organes endommagés<sup>(21,51,52)</sup>. L'IT recourt à trois composants : les cellules, les scaffolds (biomatériaux) et les molécules bioactives (Figure 8). Ceux-ci forment la triade «classique» de l'IT<sup>(52,53)</sup>.



**Figure 8.** La triade de l'IT : les cellules, les scaffolds et les molécules bioactives.

Comme décrit dans la section 1, la nécessité de trouver de meilleures alternatives face aux inconvénients des substituts osseux (premier et deuxième génération) oriente la recherche vers l'IT. Dans ce contexte, l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) est devenue une alternative prometteuse pour la reconstruction osseuse<sup>(54)</sup>.

## 2.1. L'ingénierie tissulaire *in vitro* et *in situ*

D'après Sengupta *et al.*<sup>(55)</sup>, l'IT peut se classer en 2 catégories : l'IT *in vitro* et l'IT *in situ*. Le premier fait appel à la triade « classique », dont le bio-support tissulaire fonctionnel est produit avant l'implantation. L'IT *in situ* tire avantage du potentiel du corps humain pour favoriser la régénération tissulaire sur le site de la lésion à l'aide d'un scaffold et des signaux pour guider la réparation<sup>(55)</sup>. La comparaison générale entre les deux technologies est décrite dans le Tableau 1.

**Tableau 1.** Comparaison des approches de l'IT *in situ* et *in vitro*<sup>(55)</sup>.

Paramètre	IT <i>in vitro</i>	IT <i>in situ</i>
Disponibilité sur le marché	Possible	Plus probable
Production à grande échelle	Difficile	Plus facile
Clinique translationnelle	Complexe	Éventuellement plus facile
Biomatériaux	Largement utilisé	Largement utilisé
Bioréacteurs	Utilisé	Non utilisé
Facteurs chimiques	Utilisé	Utilisé
Cellules	Utilisé	Non utilisé
Rentabilité	Moins rentable	Plus rentable
Modélisation des maladies et « drug screening »	Oui	N'est pas applicable

### 2.1.1. L'ingénierie tissulaire *in vitro*

L'IT *in vitro* a comme objectif la formation de bio-supports tissulaires fonctionnels et matures dans un environnement contrôlé en dehors du corps humain. Les scaffolds (biomatériaux) sontensemencés avec cellules (isolées du patient) et soumis à des stimuli biophysiques (e.g. pH, température, pression, flux du milieu, etc.) dans un bioréacteur (Figure 9). Les biomatériaux agissent comme un support pour la formation des tissus tandis que le bioréacteur applique différents types de stimuli aux cellules notamment des stimuli mécaniques et chimiques. Ensemble, ils créent un environnement approprié pour le développement *in vitro* des tissus matures avant l'implantation<sup>(55,56)</sup>.



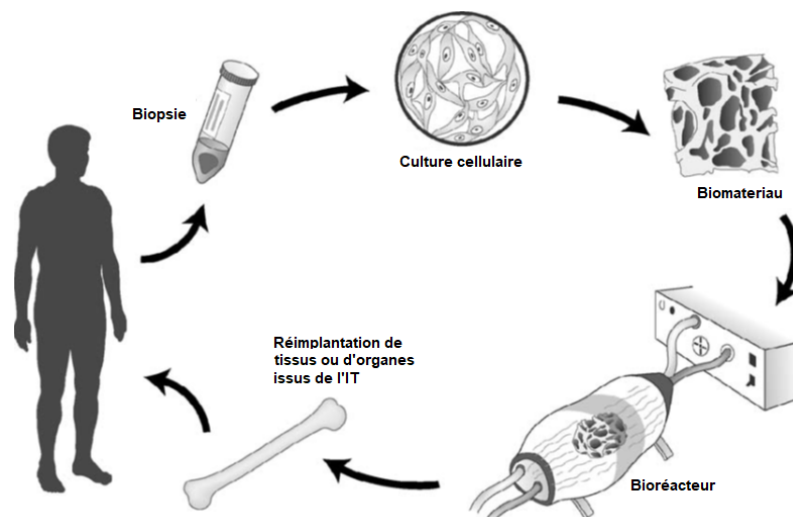


Figure 9. Schéma des étapes fondamentales de l'IT *in vitro*<sup>(21)</sup>.

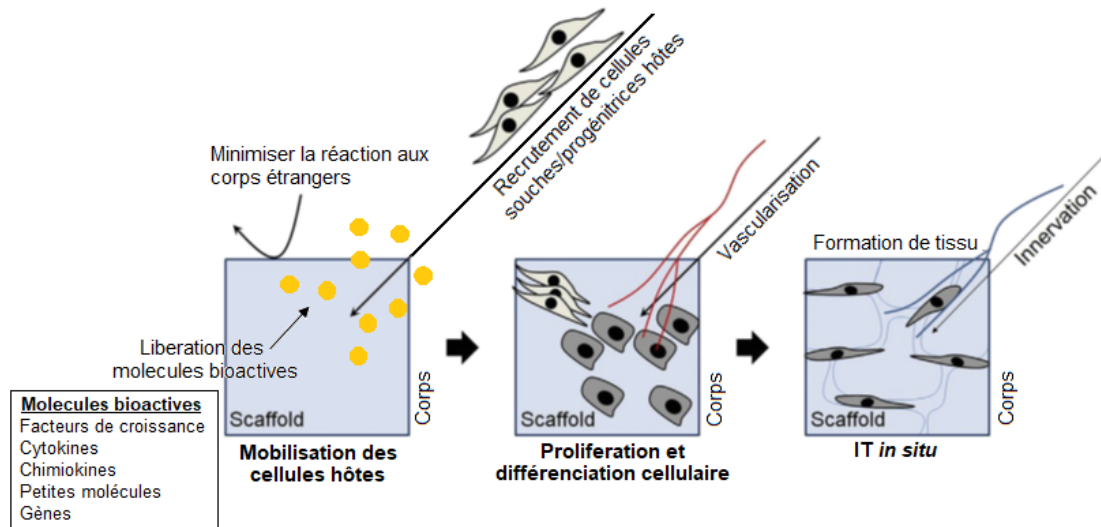
L'ITO a été développée par plusieurs groupes de recherche en utilisant différentes combinaisons de biomatériaux, de cellules, de biomolécules et de stimuli externes<sup>(57-60)</sup>. Par exemple, les biomatériaux ont été combinés avec différentes cellules souches, et ont été cultivés *in vitro*. He *et al.*<sup>(59)</sup> ont évalué la co-culture des cellules souches mésenchymateuses (modifiées par le gène BMP-2) et des cellules progénitrices endothéliales dans un hydrogel à base d'alginate et de nanoparticules de sulfate de calcium. Ce bio-support a ensuite été implanté chez la souris. Les résultats ont démontré une accélération significative de la vascularisation et de la régénération osseuse *in vivo* des défauts osseux larges<sup>(59)</sup>. Bien qu'il y ait eu certains succès chez les animaux, l'implantation de ce type de bio-support tissulaire chez l'humain reste un défi. En effet, il est difficile de prévoir si les résultats cliniques auront le même succès. De plus, le transfert du bio-support pendant l'opération chirurgicale peut conduire à la mort cellulaire immédiate après l'implantation<sup>(61)</sup>.

Enfin, l'application clinique de bio-supports tissulaires reste encore limitée en raison des contraintes techniques, réglementaire et éthiques notamment concernant l'utilisation de cellules souches<sup>(55,61)</sup>. Néanmoins, le progrès rapide et les approches innovantes sur la bio-ingénierie sont très prometteuses pour surmonter ces obstacles et permettre des applications cliniques de cette technologie dans le futur.

### 2.1.2. L'ingénierie tissulaire *in situ*

Le principe de l'IT *in situ*, d'un côté, tire parti de la capacité de régénération du corps humain en tant que bioréacteur *in situ* lequel peut régénérer les tissus de manière relativement simple, évolutive et rentable<sup>(62)</sup>; et d'un autre côté, se concentre principalement sur le recrutement de cellules souches endogènes ou de cellules progénitrices spécifiques sur le site de la lésion. Ceci est possible grâce à l'utilisation de molécules « signaux » appropriées (e.g. les FCs ou les cytokines) incorporées dans le biomatériau<sup>(55,63)</sup>. Comme il est montré dans la

Figure 10, lors de l'implantation et de la libération des molécules bioactives, les cellules souches ou les cellules progénitrices sont attirées vers le site de la lésion. Ici, la régénération des tissus sera faite dans un microenvironnement *in vivo* en évitant les complications de la manipulation *in vitro*<sup>(63,64)</sup>.



**Figure 10.** Schéma de la stratégie de l'IT *in situ*. Adaptée de Lee *et al.*<sup>(63)</sup>.

La technologie de l'IT *in situ* possède plusieurs avantages, notamment l'amélioration de la disponibilité des produits finis. Cela est dû à l'absence de manipulation des cellules et des biomatériaux en dehors du corps pour créer un tissu fonctionnel<sup>(55,63)</sup>. Étant donné que cette technique se sert principalement des biomatériaux et des facteurs extracellulaires, il est plus facilement envisageable de surmonter certaines contraintes réglementaires inhérentes à l'IT *in vitro*<sup>(55)</sup>.

Sur la base de l'IT *in situ*, les biomatériaux et les molécules bioactives deviennent les acteurs capitaux pour cette technologie. Pour l'ITO, les molécules bioactives, *c.à.d.* les FCs, comme les BMPs, ou les cytokines, jouent un rôle important en tant que « chimio-attracteurs ». Lors de la libération contrôlée et prolongée sur le site de la lésion, les cellules souches endogènes/progénitrices sont activement recrutées et guidées vers le tissu endommagé<sup>(65)</sup>. Les biomatériaux à utiliser doivent avoir une structure et une composition adaptée aux tissus. Ceci est important car le biomatériau devra mimer le microenvironnement *in vivo* afin de guider l'infiltration et la croissance cellulaire sur le site de la lésion<sup>(55,64)</sup>. Par exemple, Boerckel *et al.*<sup>(66)</sup> ont démontré la régénération osseuse chez les souris à partir de la 4<sup>ème</sup> semaine d'implantation en utilisant un système hybride de nanofibres de PCL et un hydrogel d'alginate chargée avec le rhBMP-2<sup>(66)</sup>.

## 2.2. La vascularisation dans l'ingénierie tissulaire osseuse

Les défauts osseux larges deviennent très difficiles à traiter cliniquement notamment à cause du faible ou manque d'apport sanguin. De ce fait, la vascularisation des scaffolds est

essentielle pour la réussite dans la régénération osseuse et reste encore un défi majeur pour l'ITO<sup>(30,67)</sup>. Il a été déjà rapporté qu'une mauvaise néovascularisation est la raison principale des échecs des implants dû au manque de nutriments et d'oxygène<sup>(67-69)</sup>.

La revascularisation est possible à travers de 2 processus : la vasculogénèse et l'angiogénèse<sup>(69-72)</sup>. D'un côté, la *vasculogénèse* dite formation *de novo*<sup>(70)</sup>, correspond à la formation (dans un premier temps) de capillaires sanguins à partir des cellules progénitrices endothéliales (EPCs). Dans ce processus, le VEGF est très important pour la survie et la différenciation des EPCs<sup>(72)</sup>. D'autre part, l'*angiogénèse* se fait à partir des vaisseaux sanguins existants (*e.g.* à partir du périoste dans le cas de l'os). Ce dernier est connu pour être le principal mécanisme de revascularisation lors de la vie adulte<sup>(72)</sup>, contrairement à la vasculogénèse qui est plutôt exprimé lors du développement embryonnaire<sup>(69,70)</sup>.

Lors de l'implantation d'un scaffold, le processus d'inflammation induit une revascularisation spontanée (à travers l'angiogénèse)<sup>(25,73)</sup>. Cependant, ces nouveaux vaisseaux sanguins sont transitoires et très facilement perdus, si le défaut osseux est large. Cette réaction est due à la lente formation du réseaux vasculaire dans l'implant (inférieure à 1 mm par jour), qui est limitante pour former des capillaires fonctionnels<sup>(25)</sup>.

### **2.3. Composants de l'ingénierie tissulaire osseuse**

Dans cette section, nous allons présenter les principaux composants de l'ITO à savoir : les scaffolds, les cellules et les molécules bioactives avec un focus sur la vascularisation<sup>(5)</sup>.

#### **2.3.1. Les scaffolds**

Les biomatériaux utilisés en tant que scaffolds pour l'ITO tendent à mimer la MEC. Il s'agit donc de structures 3D temporaires qui donnent l'environnement adéquat pour les cellules et le développement de l'os<sup>(30,54,74)</sup>. De cette façon, le biomatériau sera complètement remplacé par le nouveau tissu osseux au cours du temps<sup>(75)</sup>.

##### *2.3.1.1. Cahier de charges des scaffolds*

Le scaffold idéal devra présenter des propriétés spécifiques pour permettre l'adhésion et la prolifération cellulaire, la différenciation des cellules ostéoprogénitrices, la vascularisation, l'intégration avec le tissu hôte, et dans certains cas la résistance à la charge<sup>(54)</sup>. Ces propriétés ou exigences, décrites dans le Tableau 2 sont souvent liées les unes aux autres. Par exemple, si la porosité augmente dans le biomatériau, il est très probable que la résistance mécanique soit plus faible<sup>(75)</sup>. De la même manière, la vitesse de dégradation du biomatériau doit être en corrélation avec la formation du nouvel os afin d'assurer le support mécanique<sup>(30,74)</sup>.

**Tableau 2.** Exigences pour un scaffold idéal<sup>(25,30,33,54,56,73–76)</sup>.

Propriétés	Caractéristiques souhaitables pour le scaffold
<b>Biocompatibilité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Assurer l'activité cellulaire normale.</li> <li>Produits de dégradation non toxiques et éliminés facilement du corps.</li> <li>Réponse immunitaire négligeable afin d'éviter une réaction inflammatoire grave et le rejet par le corps.</li> </ul>
<b>Biodégradabilité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Dégradation par des enzymes ou réactions biologiques chez l'homme.</li> <li>Dégradation contrôlée : pas trop rapide, <i>i.e.</i> risque d'une rupture mécanique, ni trop lente, <i>i.e.</i> risque d'une réponse inflammatoire.</li> <li>Permettre aux cellules hôtes envahissantes de produire leur propre MEC au cours de la dégradation.</li> </ul>
<b>Microarchitecture</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Porosité interconnectée afin de favoriser la diffusion interne de nutriments et la diffusion externe des déchets.</li> <li>Promouvoir la migration, l'infiltration cellulaire et la croissance tissulaire.</li> <li>Posséder entre 60% et 90% de porosité et contenir pores de différentes tailles : <ul style="list-style-type: none"> <li>Les macropores (100 – 350 <math>\mu\text{m}</math>) permettant la croissance cellulaire et tissulaire <i>in vivo</i>, et l'invasion du système vasculaire.</li> <li>Les micropores (&lt;20 <math>\mu\text{m}</math>) pour fournir une grande surface et stimuler les interactions entre les cellules et le biomatériau.</li> </ul> </li> </ul>
<b>Bio-activité</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Interaction et liaison avec le tissu de l'hôte.</li> <li>Posséder des propriétés ostéoconductrices et ostéoinductives.</li> <li>Être capable d'incorporer des signaux biologiques tels que les FC pour stimuler l'adhésion cellulaire ou avoir des signaux physiques tels que la topographie de surface pour stimuler la morphologie et l'aliénation cellulaire.</li> </ul>
<b>Propriétés mécaniques</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>Posséder un module de Young, une résistance à la compression et à la fatigue équivalents à celle de l'os. Les propriétés mécaniques sont différentes en fonction du type d'os, par exemple : <ul style="list-style-type: none"> <li>Le module de Young de l'os cortical est compris entre 15 et 20 GPa et celui de l'os spongieux entre 0,1 et 2 GPa.</li> <li>La résistance à la compression varie entre 100 et 200 MPa pour l'os cortical et entre 2 et 20 MPa pour l'os spongieux.</li> </ul> </li> <li>Permettre une manipulation chirurgicale facile lors de l'implantation.</li> </ul>

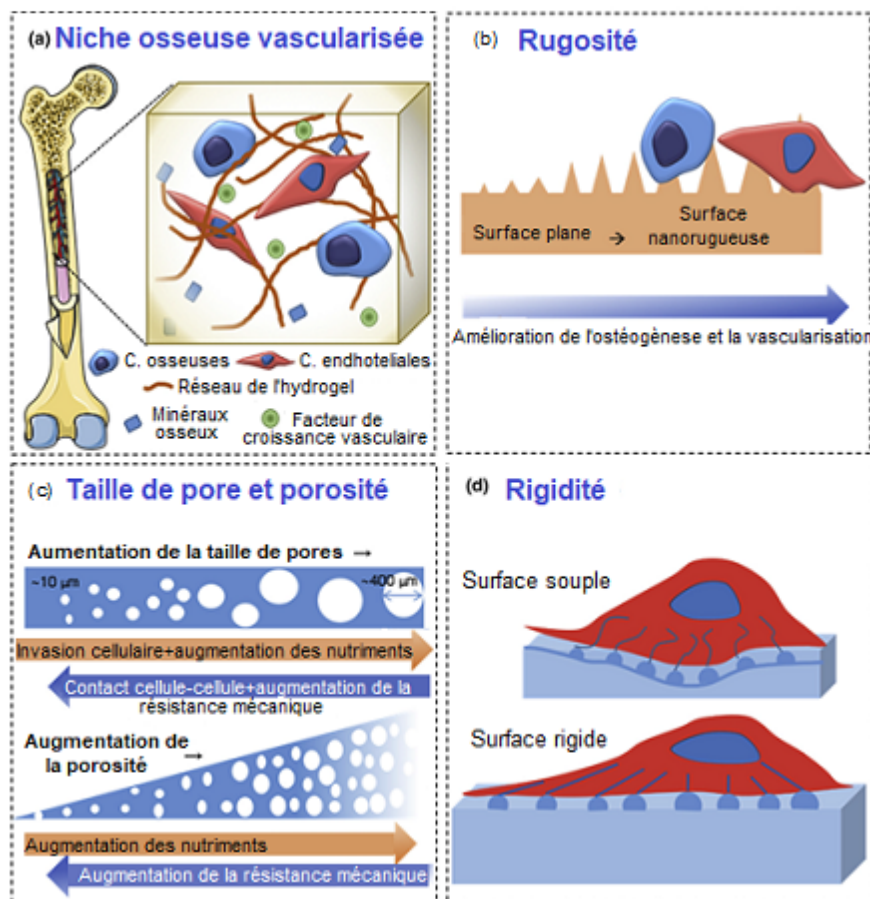
Parmi les caractéristiques des scaffolds mentionnées dans le Tableau 2, il est important de souligner que la topographie de surface, la porosité (microarchitecture) et certaines propriétés mécaniques ont des effets primordiaux sur la vitesse à laquelle la vascularisation aura lieu *in situ*<sup>(70)</sup>.

Sachant que la surface du scaffold est le premier point de contact entre les cellules et le scaffold, la **topographie de surface** devient un facteur important dans la

vascularisation<sup>(26,69,70,77)</sup>. En effet, la MEC est composée des protéines de taille nanométrique qui forment une partie de la surface des os et des vaisseaux sanguins. Une surface micro-/nanostructurée a une énergie de surface plus importante comparativement à une surface lisse. Cette caractéristique rend le matériau encore plus hydrophile de par la Loi de Wenzel, et donc, améliore l'adsorption des protéines et l'adhésion des cellules lors de l'implantation<sup>(26,69)</sup> (Figure 11b). Ainsi, des modifications de rugosité à échelle nanométrique (10 – 100  $\mu\text{m}$ ) peuvent augmenter l'énergie de surface de façon significative<sup>(26,77)</sup>.

La **porosité** du scaffold joue un rôle très important pour la vascularisation. Il est connu qu'une taille de pore entre 150 – 300  $\mu\text{m}$  est idéale pour le développement d'un réseau vasculaire, grâce à une bonne oxygénation<sup>(14,26,27,68)</sup> (Figure 11c). Les interactions matériaux-cellules sont favorisées par différentes tailles de pores<sup>(77)</sup>. La remarque la plus importante à considérer est qu'une taille moyenne de pores inférieure à 100  $\mu\text{m}$  peut conduire à un état d'hypoxie et favoriser la formation de tissu ostéoïde non minéralisé ou de tissu conjonctif fibreux<sup>(26,27,77)</sup>. Un autre facteur clé est l'interconnectivité des pores permettant la migration des cellules, ce qui est une partie essentielle du processus angiogénique. De plus, l'interconnectivité permet le transport des nutriments et des déchets chimiques et métaboliques. D'après, Buranawat *et al.*<sup>(70)</sup>, l'absence d'interconnectivité empêche la vascularisation complète du scaffold<sup>(70)</sup>. Afin d'obtenir des scaffolds poreux, les techniques de fabrication tels que le « gas foaming », la séparation de phases et la lyophilisation sont utilisées avec ou sans agents porogènes<sup>(14)</sup>. L'impression 3D et l'électrospinning sont des techniques également utilisées pour la fabrication de scaffolds poreux<sup>(72)</sup>.

Les propriétés mécaniques du scaffold, telles que la **rigidité** des matériaux, sont importantes pour les interactions matériaux-cellules. La MEC présente différents modules d'élasticité. Les cellules peuvent donc détecter les différences de propriétés mécaniques des matériaux. Un des phénomènes liés à cela est la durotaxie (migration par gradients de rigidité). Ainsi les cellules peuvent réagir en modifiant leur morphologie d'adhésion et en se différenciant en certains types cellulaires (Figure 11d). A titre d'exemple, la différenciation ostéogénique des CSMs se produit de manière optimale lorsque la rigidité du scaffold est d'environ 25 à 40 kPa<sup>(26)</sup>. De même, plusieurs études ont rapporté qu'un scaffold plus rigide pourrait favoriser la néovascularisation. Les interactions matériaux-cellules sont visibles dans le cas de cellules endothéliales. Ainsi, sur une matrice souple (~180 Pa) les cellules montrent une morphologie plutôt arrondie, tandis que sur une surface plus rigide (~28 kPa) les cellules sont beaucoup plus étalées. De plus, les fibres de stress du cytosquelette, composées par l'actine, des cellules endothéliales se développent uniquement quand elles sont cultivées sur une surface ayant une rigidité supérieure à 2 kPa<sup>(26,77)</sup>.



**Figure 11.** Illustration des propriétés des matériaux qui influencent la différenciation ostéogénique et la vascularisation. **(a)** Cellules ostéogéniques (bleues) et cellules endothéliales (rouges) résidant dans la niche osseuse vascularisée. **(b)** Les matériaux ayant une rugosité à l'échelle nanométrique peuvent favoriser la fixation et la différenciation des cellules ostéogéniques et endothéliales progénitrices. **(c)** Le niveau optimal de porosité dans les biomatériaux osseux induit la croissance des vaisseaux sanguins et maintient une résistance mécanique élevée des biomatériaux. **(d)** La rigidité du matériau influence l'adhésion, la forme et la différenciation cellulaire, en fonction du « mechanosensing » des cellules. Adapté de Marrella *et al.*<sup>(26)</sup>.

### 2.3.1.2. Biomatériaux pour scaffolds de l'ITO

Dans le cas de l'ITO, les scaffolds les plus représentatifs sont les polymères, les biocéramiques et les matériaux composites<sup>(8,54,76)</sup>. D'un autre côté, les hydrogels sont devenus très intéressants pour l'ITO en raison de leur capacité à mimer la topographie de la MEC et de servir de réservoir de principes actifs<sup>(54,67)</sup>. Ce sont également des matériaux très malléables qui peuvent être transformés sous différentes formes en utilisant des techniques comme la lyophilisation et l'impression 3D, mais aussi en tant qu'injectables. Cette partie sera développée dans le chapitre 3 de cette partie.

Les **polymères synthétiques** choisis pour une application dans l'ITO devraient être biodégradables, permettant ainsi un remplacement total de l'os dans le temps. De plus, les polymères synthétiques montrent une bonne stabilité mécanique<sup>(30,54)</sup>. Dans cette catégorie, le PLA et la PCL sont largement étudiés dans la littérature<sup>(42)</sup>. Par exemple, Eap *et al.*<sup>(78)</sup> ont développé des nanofibres à base de PCL qui possédaient une bonne porosité. Les résultats

des tests biologiques ont montré la prolifération cellules ostéoblastes humaines<sup>(78)</sup>. D'un autre côté, la fabrication des scaffolds en 3D à partir de PLA a été rapporté par Grémare *et al.*<sup>(79)</sup>. Les scaffolds ont démontré être cytocompatibles vis-à-vis des cellules stromales de la moelle osseuse humaine<sup>(79)</sup>.

Les **polymères naturels** sont utilisées dans la formation des scaffolds pour l'ITO en raison de sa bonne cytocompatibilité, de bonnes propriétés d'ostéoconductivité et d'une faible immunogénicité, parmi eux les plus utilisées sont le collagène, la gélatine, la cellulose, l'acide hyaluronique, l'alginate, la soie et le CHT<sup>(8,75,76,80)</sup>. Ce dernier sera largement développé dans le chapitre 3 de cette partie.

Les **biocéramiques** utilisées comprennent les CaPs, comme l'HAp et le  $\beta$ -TCP, le bio-verre et le silicate de calcium<sup>(8,54,76)</sup>. Ces types de composants sont similaires à la phase minérale de l'os et présentent une biocompatibilité et une bio-activité excellentes. Bien qu'ils présentent une résistance à la compression élevée par rapport aux polymères, ils sont très friables<sup>(8,54)</sup>. Meurice *et al.*<sup>(81)</sup> ont développé des scaffolds de  $\beta$ -TCP en utilisant la méthode de « freeze-casting ». Les scaffolds obtenus ont montré des pores tubulaires interconnectés de forme ellipsoïdale qui ont favorisé l'invasion et la prolifération des cellules ostéoblastes<sup>(81)</sup>. Shao *et al.*<sup>(82)</sup> ont développé un scaffold poreux d'HAp par impression 3D. Le scaffold 3D a démontré des propriétés mécaniques supérieures à celles de l'os spongieux et une dégradation lente (10%) pendant 5 semaines<sup>(82)</sup>.

Les **matériaux composites** sont formés en utilisant au moins deux composants. Ce type de biomatériau permet de tirer l'avantage des propriétés de chaque composant. Les plus connus sont les mélanges polymères-polymères et polymères-biocéramiques<sup>(5,54)</sup>. Ce dernier simule davantage la matrice osseuse et son efficacité a été démontrée en comparaison avec les deux matériaux séparés<sup>(30,54)</sup>. Lian *et al.*<sup>(83)</sup> ont développé des films composites à base de nanofibres d'HAp et de gélatine à différents ratios. Leur étude a révélé que le film ayant la quantité la plus élevée d'HAp montrait une différenciation ostéogénique des cellules souches de la moelle osseuse de la souris supérieure aux autres films. De même, l'ajout d'HAp a amélioré les propriétés mécaniques des films<sup>(83)</sup>. Moreira *et al.*<sup>(84)</sup> ont fabriqué des matrices composites injectables de CHT/gélatine avec une quantité de 10% de bio-verre (58S). Il a été démontré que l'ajout du bio-verre augmentait le module élastique des hydrogels et la cytocompatibilité vis-à-vis d'une lignée cellulaire d'ostéosarcome humain (SAOS)<sup>(84)</sup>. Les résultats confirment que l'ajout de biocéramiques aux systèmes polymères favorisent leurs propriétés physicochimiques mais aussi leur bio-activité.

### 2.3.2. Les cellules

Le type de cellules utilisées dans l'ITO (Tableau 3) est aussi essentiel que le choix du scaffold<sup>(25)</sup>. Les cellules les plus utilisées pour la régénération osseuse sont des CSMs (notamment les cellules souches dérivées de la moelle osseuse, du tissu adipeux, des dents et du sang périphérique), des cellules souches embryonnaires et des cellules pluripotentes induites<sup>(54)</sup>.

**Tableau 3.** Les cellules utilisées pour la régénération osseuse<sup>(25,67,68,85)</sup>.

Cellule	Source	Avantages	Inconvénients
<b>Cellules souches mésenchymateuses (CSMs)</b>	<i>CS dérivées de la moelle osseuse</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plus utilisées.</li> <li>• Haut potentiel de différenciation.</li> <li>• Relativement facile à obtenir.</li> <li>• Largement caractérisées.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morbidité des donneurs associée à la procédure invasive.</li> <li>• Potentiel prolifératif limité.</li> <li>• Nombre de cellules dépendant de l'âge et la santé du donneur.</li> </ul>
	<i>CS dérivées du tissu adipeux</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Beaucoup plus accessibles et abondantes.</li> <li>• Plus résistantes (e.g. concentrations basses en oxygène ou en glucose).</li> <li>• Facilement extensibles.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Morbidité des donneurs (à cause de l'anesthésie au cours du liposuccon).</li> </ul>
	<i>CS de sang de cordon ombilical</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacité proliférative.</li> <li>• Morbidité minimale des donneurs.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu caractérisées.</li> </ul>
	<i>CS dérivées des dents et gencives</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faciles à obtenir et abondantes.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Peu caractérisées.</li> </ul>
<b>Cellules souches embryonnaires (CSE)</b>	<i>CS dérivées de la masse cellulaire interne d'un blastocyste.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Différenciation ostéogénique dans un milieu ostéoinductif (contenant <math>\beta</math>-glycérophosphate, simvastatine et BMPs).</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Questions éthiques concernant l'utilisation d'embryons.</li> <li>• Risque de rejet immunitaire après la transplantation.</li> </ul>
<b>Cellules pluripotentes induites (iPC)</b>	<i>Fibroblastes, cellules progénitrices du sang, cellules du sang de cordon, etc.</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cellules différenciées qui sont reprogrammées génétiquement en cellules de type ostéoblaste.</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Reprogrammation incomplète.</li> <li>• Formation des tumeurs.</li> </ul>

Afin de produire un réseau vasculaire dans le scaffold, l'incorporation des cellules angiogéniques est devenue une alternative dans nombreuses recherches. Dans ce cas, les



cellules utilisées pour la vascularisation sont décrites dans le Tableau 4 et comprennent les cellules endothéliales (EC) et les cellules progénitrices endothéliales (EPC)<sup>(27,70)</sup>.

**Tableau 4.** Les cellules utilisées pour favoriser la vascularisation<sup>(23,27,69,70,72)</sup>.

Cellule	Source	Avantages	Inconvénients
<b>Cellules endothéliales (EC)</b>	<i>Vaisseaux du cordon ombilical (HUVECs), de la peau, du tissu adipeux, et de la veine saphène</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Plus utilisées dans la vascularisation des scaffolds.</li> <li>• Potentiel angiogénique <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i> démontré</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Faible capacité de prolifération et faible disponibilité</li> <li>• Vieillesse rapide (car cellules matures)</li> <li>• Faible capacité de réponse aux FC angiogéniques</li> <li>• Phénotype pas spécifique au tissu traité</li> </ul>
<b>Cellules progénitrices endothéliales (EPC)</b>	<i>Moelle osseuse, tissu adipeux, sang périphérique, cordon ombilical</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Capacité de se différencier en EC du tissu traité</li> <li>• Participe activement dans l'angiogenèse et la vasculogenèse</li> <li>• Potentiel proliférative élevé</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Protocoles spécifiques de l'induction afin d'obtenir les EC</li> </ul>

Bien que les combinaisons de cellules humaines et scaffolds pour générer des bio-supports offrent de grandes opportunités pour des études *in vitro* de l'IT avancée, l'application de cellules autologues fait face à de nombreuses difficultés. En plus aux problèmes techniques tels que la disponibilité limitée, l'hétérogénéité des cellules natives, *etc.*<sup>(55,64)</sup>, l'inconvénient majeur dans l'application *in vivo* chez l'homme est le défi de la transposition des résultats de modèles animaux à la situation humaine. Ceci est plutôt lié à la faible survie *in vivo* des cellules (donneuses ou autologues). Ainsi, les approches innovantes (par exemple, des signaux biologiques pour la vascularisation des scaffolds) sont très prometteuses pour surmonter ces obstacles et pouvoir les appliquer dans la clinique.

### 2.3.3. Les molécules bioactives

Bien que les scaffolds pour l'ITO aient évolué pour répondre aux divers besoins cliniques, ces scaffolds ont besoin des signaux biologiques pour générer des interactions optimales avec les cellules. Par conséquent, l'addition de biomolécules ou éléments biomimiques est largement étudiée dans la littérature. Parmi elles, les cytokines (comme le facteur dérivé du stroma 1 (SDF-1) et le CXCR4)<sup>(5)</sup>, les molécules et peptides dérivés de la MEC (comme le motif RGD - Arg-Gly-Asp)<sup>(86,87)</sup>, et les facteurs de croissance (FC,

ostéogéniques et angiogéniques) sont des molécules bioactives utilisées dans les stratégies de fonctionnalisation des scaffolds. Nous allons nous focaliser sur les FCs ostéogéniques et angiogéniques utilisés pour l'ITO.

#### *2.3.3.1. Les facteurs de croissance ostéogéniques*

Les FCs jouent un rôle majeur lors de la réparation osseuse et sont des molécules solubles capables d'induire des réponses cellulaires spécifiques<sup>(33,85)</sup>. Il est donc évident que l'utilisation de FCs appropriés peut induire le recrutement et la différenciation des cellules ostéoprogénitrices, la formation de la MEC et du réseau vasculaire, et par conséquent la réparation du tissu osseux<sup>(48,73)</sup>. Ce type de molécules a cependant une courte demi-vie, en conséquence leur action reste locale et à faible distance par diffusion à travers la MEC<sup>(33)</sup>. Les FCs qui ont été étudiés pour la *régénération osseuse* comprennent le TGF- $\beta$ , les BMPs, le VEGF, le PDGF, l'IGF et le FGF<sup>(7,18,25,67,68,75,85,88)</sup> et sont décrits dans le Tableau 5. Parmi eux, les BMPs, le FGF et le VEGF sont utilisés dans des essais précliniques et cliniques<sup>(18)</sup>.

**Tableau 5.** Les FCs utilisés dans la régénération osseuse<sup>(7,18,25,67,68,75,80,85,88)</sup>.

FC	Caractéristiques
<b>TGF-<math>\beta</math></b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Polypeptide (25 kDa) ayant 4 isoformes (TGF-<math>\beta</math>1, -<math>\beta</math>2, -<math>\beta</math>3, et -<math>\beta</math>5).</li> <li>• Favorise la prolifération des cellules de type ostéoblaste et stimule la production de collagène <i>in vitro</i>.</li> <li>• Aide à la synergie entre la formation et la résorption de l'os.</li> <li>• Contrôle l'expression des protéines non collagéniques impliquées dans la régulation du remodelage osseux et de la minéralisation.</li> </ul>
<b>BMPs</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Appartiennent à la famille de TGF- <math>\beta</math>, et sont les plus largement étudiés dans l'ITO.</li> <li>• Les isoformes les plus utilisés sont le BMP-2 et BMP-7, et ils sont les plus osteoconducteurs.</li> <li>• Favorisent la migration et la différenciation de cellules ostéoprogénitrices ou des CSM en ostéoblastes, et stimulent donc l'ostéogenèse.</li> <li>• Risque de formation de l'os ectopique et de l'augmentation paradoxale de la résorption osseuse.</li> </ul>
<b>FGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Stimule la différenciation des ostéoblastes et augmente les dépôts de collagène.</li> <li>• Favorise le recrutement, la prolifération et la survie des EC.</li> </ul>
<b>VEGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• L'isoforme VEGF-A est le FC dominant dans la formation du réseau vasculaire dans l'os.</li> <li>• Favorise l'angiogenèse et le développement des vaisseaux sanguins.</li> <li>• L'activité ostrogénique a été également reportée.</li> </ul>
<b>IGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Facteur chimiotactique des ostéoblastes, stimule l'ostéogenèse.</li> <li>• IGF-I et IGF-II favorisent les fonctions des ostéoblastes et la formation de la matrice osseuse.</li> </ul>
<b>PDGF</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Agent chimio-attractant puissant pour diverses cellules mésenchymateuses, y compris les cellules ostéogéniques.</li> <li>• Il est exprimé lors de la réparation osseuse normale (sauf dans les patients atteints de diabète).</li> </ul>

Le plasma riche en plaquettes (PRP) présente également un intérêt pour son utilisation dans la régénération osseuse. Le PRP est obtenu en isolant et en concentrant les plaquettes du sang périphérique autologue. Sachant que le PRP contient des facteurs de croissance importants (notamment le PDGF, l'IGF, les FGF, les TGF- $\beta$  et le VEGF), il peut être utilisé avec les dispositifs disponibles sur le marché. Bien qu'il ait démontré de bons résultats pour le traitement orthopédique dans les douleurs du genou et du coude du joueur de tennis, les études cliniques lors de l'utilisation dans la réparation de l'os humain n'ont pas donné de résultats convaincants<sup>(14,18,89)</sup>.

### 2.3.3.2. Les facteurs de croissance angiogéniques

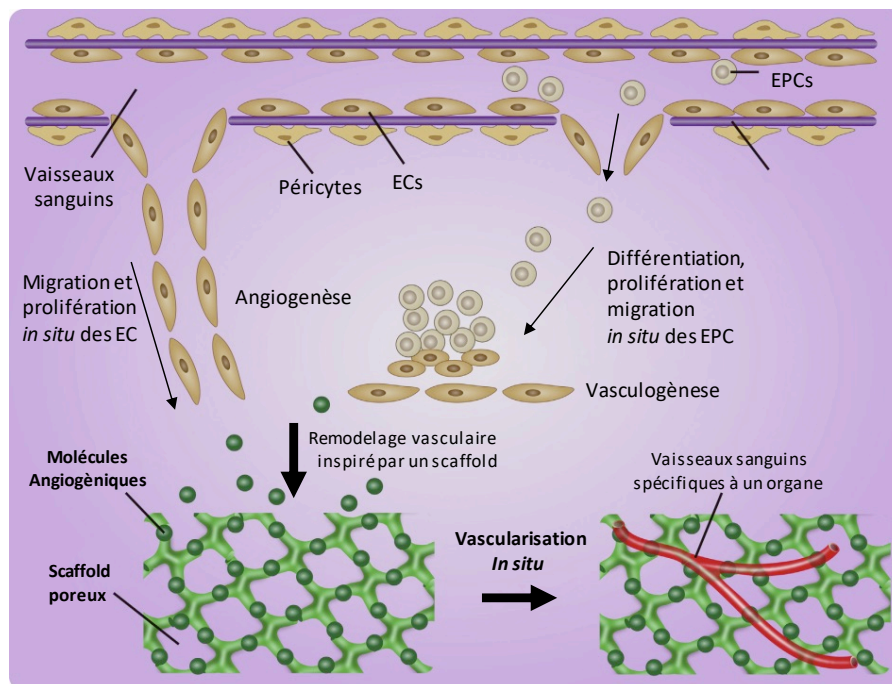
D'un autre côté, afin d'accélérer la vascularisation et par conséquent la régénération osseuse, les FCs angiogéniques tels que le VEGF, le PDGF, l'IGF, le TGF- $\beta$ , le bFGF, l'Ang-1, l'Ang-2 et le SHH (Sonic Hedgehog)<sup>(14,21,22,30,36,69,70,90)</sup> sont utilisés dans l'ITO. La formation de nouveaux vaisseaux sanguins suit plusieurs étapes de la migration et la prolifération des cellules endothéliales, jusqu'à la formation des tubes capillaires et à leur stabilisation. En conséquence, les FCs angiogéniques peuvent stimuler ces différentes étapes et sont classés selon leurs actions. Nous pouvons trouver deux catégories principales : (1) les FCs qui stimulent l'activité des ECs, l'invasion cellulaire et la formation initiale des vaisseaux sanguins, *c.à.d.* l'angiogénèse ; et (2) les FCs qui contrôlent la stabilisation et la maturation des nouveaux vaisseaux (Tableau 6). Lors de la formation de nouveaux vaisseaux, leur structure est désorganisée, perméable et hémorragique. Afin de stabiliser la paroi des vaisseaux, le recrutement de cellules périvasculaires et de cellules musculaires lisses est essentiel<sup>(69,70)</sup>.

**Tableau 6.** Classification des FC angiogéniques<sup>(69,91)</sup>.

(1) Facteurs favorisant l'angiogénèse	(2) Facteurs favorisant la maturation des vaisseaux
VEGF*	PDGF
PDGF*	TGF- $\beta$ *
bFGF	Ang-1
Ang-2	

\* FCs qui favorisent aussi l'ostéogénèse.

Dans ce cas, la vascularisation *in situ* est mise en place due à l'invasion cellulaire en réponse aux FCs angiogéniques provenant du scaffold sur le site de l'implantation (Figure 12). Cette stratégie est avantageuse car le nouveau réseau vasculaire est spécifique à l'os<sup>(72)</sup>. Par conséquent, le choix du FC angiogénique est très important.



**Figure 12.** Vascularisation *in situ* à partir d'un scaffold fonctionnalisé avec molécules angiogéniques<sup>(72)</sup>.

Les informations les plus pertinentes pour chaque FC ont été résumées dans le Tableau 5. Dans cette section, nous allons nous concentrer sur la molécule VEGF, en raison de ses caractéristiques et de ses propriétés en termes de vascularisation et de régénération osseuse.

Le **VEGF** est l'un des facteurs de croissance les plus importants pour la régulation de l'angiogenèse et le développement vasculaire à la fois dans des conditions physiologiques et pathologiques<sup>(28,92)</sup>. Il a été rapporté que cette molécule participe à plusieurs étapes de la réparation et de la régénération osseuse (chapitre 1, 2.3) et donc, elle joue aussi un rôle important dans l'ostéogenèse<sup>(18,28)</sup>.

Le VEGF est produit par les ECs, les macrophages, les fibroblastes, les cellules musculaires lisses, les ostéoblastes et les chondrocytes hypertrophiques<sup>(93)</sup>. Bien que la production de VEGF soit fréquemment stimulée par la plupart des facteurs ostéo-inducteurs (*i.e.* TGF- $\beta$ , BMPs, IGF, FGF2), il a été suggéré que cette molécule pourrait servir en tant que médiateur central pour d'autres FCs<sup>(91)</sup>. L'expression de VEGF répond aussi à différents facteurs, tels que l'hypoxie (manque d'apport en oxygène) et les stimuli mécaniques<sup>(28,91)</sup>.

Le VEGF appartient à une famille de protéines homodimères comprenant 5 membres : VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D et le FC placentaire (PlGF). Parmi eux, le VEGF-A (appelé ci-après VEGF) est la forme la plus abondante et est le principal modulateur de l'angiogenèse. Il joue un rôle important dans la mobilisation et le recrutement d'EPCs, dans la différenciation, la prolifération, et l'activation des ECs, dans la promotion de la perméabilité capillaire et de la fenestration des vaisseaux sanguins, ainsi que dans le recrutement et la survie des ostéoblastes et des ostéoclastes. Le VEGF exprime quatre isoformes (à partir d'un

épissage alternatif de l'ADN) dont le VEGF-165 est la plus abondante, et montre la plus grande activité biologique<sup>(28,91-93)</sup>. Ainsi, le VEGF-165 est la molécule la plus étudiée dans les modèles *in vitro/in vivo* de régénération osseuse<sup>(28,92)</sup>.

Des nombreuses études ont montré l'utilisation du VEGF dans la régénération osseuse<sup>(94-97)</sup>. A cet effet, l'utilisation de scaffolds (biomatériaux) est très importante afin d'obtenir une délivrance localisée, soutenue et prolongée de cette molécule. De plus, l'incorporation du VEGF dans un scaffold permet d'augmenter son effet thérapeutique dans la régénération osseuse, en le protégeant d'une dégradation rapide<sup>(27,28,90)</sup>. En revanche, l'administration de VEGF sans scaffold sur le site du défaut ne permet pas de d'obtenir de bons résultats en termes de vascularisation et de formation de l'os. De plus, l'utilisation de doses supra-physiologiques (mg/mL au lieu de ng/mL) de VEGF provoque la formation de vaisseaux anormaux et présentant des fuites. De même, une perfusion continue de VEGF peut déclencher des complications tels que l'hypotension (à cause des fuites vasculaires graves), et le développement d'un hémangiome<sup>(5,22,27,28,90)</sup>.

#### **2.3.4. Approches pour l'incorporation des molécules bioactives dans les scaffolds**

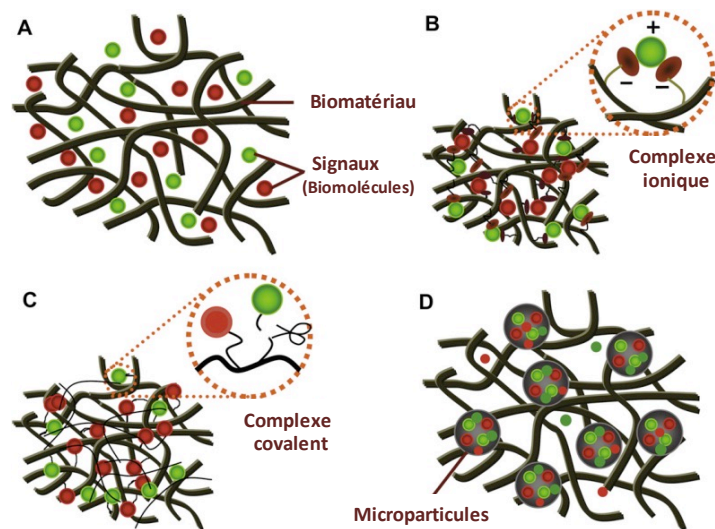
Afin de favoriser une interaction appropriée entre les cellules avec la surface des scaffolds, ces derniers peuvent être modifiés ou fonctionnalisés pour transmettre des signaux biologiques dirigeant par exemple la migration et l'adhésion cellulaire, la différenciation et la prolifération cellulaire, mais aussi la biominéralisation et la néovascularisation<sup>(86)</sup>.

Différentes techniques d'incorporation de signaux biologiques (biomolécules) dans les scaffolds ont été développées afin d'avoir une cinétique de libération appropriée, on retrouve le chargement l'absorption ou l'adsorption, l'immobilisation covalente, l'immobilisation non covalente (formation de complexes ioniques) et l'addition de micro/nanoparticules<sup>(5,21,69,72,90,98)</sup>. Ces techniques sont décrites ci-dessous dans le Tableau 7 et elles sont illustrées dans la Figure 13. Selon la technique d'incorporation, la vitesse de libération des biomolécules peut être contrôlée par des processus tels que la diffusion de la molécule, l'érosion ou la dégradation du polymère, le gonflement du polymère suivi de la diffusion, ou par le phénomène d'osmose<sup>(98)</sup>.

**Tableau 7.** Techniques d'incorporation des biomolécules<sup>(87,90,98)</sup>.

Technique d'incorporation	Description
<b>Adsorption</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La biomolécule est adsorbée directement par le biomatériau et reste incorporée dans la structure du scaffold</li> <li>• L'adsorption de biomolécules est influencée par les propriétés telles que la mouillabilité de la surface, la rugosité, la charge, la densité de charge et les groupes fonctionnels.</li> <li>• Les propriétés de la solution contenant la biomolécule, telles que la force ionique et la présence d'autres protéines dans le milieu, peuvent aussi avoir un impact significatif sur l'adsorption.</li> <li>• Le profil de libération montre généralement un « <i>burst</i> » de libération et peut être contrôlé en fonction de la taille des pores et la dégradation du scaffold. Cependant, dans le cas des FCs, il y a le risque de perdre la bio-activité si la molécule est piégée longtemps.</li> <li>• L'adsorption est considérée comme une méthode rentable pour la délivrance de protéines et de FCs.</li> </ul>
<b>Immobilisation non covalente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les biomolécules sont associées par interactions ioniques au scaffold en utilisant les domaines de liaisons endogènes entre la biomolécule et la MEC.</li> <li>• Elle permet une libération plus lente en fonction de l'affinité moléculaire. La fibrine et le collagène (polymères à base de protéines) sont utilisés pour cette technique en raison de la présence des domaines de liaisons aux biomolécules.</li> <li>• Les polymères synthétiques sont greffés avec l'héparine sur sa surface.</li> </ul>
<b>Immobilisation covalente</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La biomolécule est réticulée chimiquement à un réseau polymère.</li> <li>• Cette technique garanti l'immobilisation d'un FC, donc sa libération dans le tissu est prévisible et calculable. En plus, une faible quantité de FC est nécessaire.</li> <li>• Il existe un risque de dénaturation des protéines pendant la réticulation. Le site d'attachement de la biomolécule ne doit pas être près du domaine de liaison du récepteur.</li> </ul>
<b>Incorporation directe</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• La biomolécule est ajoutée pendant le processus de polymérisation/gélicification de l'hydrogel et reste piégée dans le réseau polymère.</li> <li>• Le profil de libération est similaire à celle de la méthode d'adsorption.</li> </ul>
<b>Délivrance par un transporteur</b>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Les biomolécules sont encapsulées dans les systèmes particuliers, <i>i.e.</i> microparticules ou nanoparticules. Leurs petites tailles permettent d'être intégrées dans la structure d'un scaffold.</li> </ul>

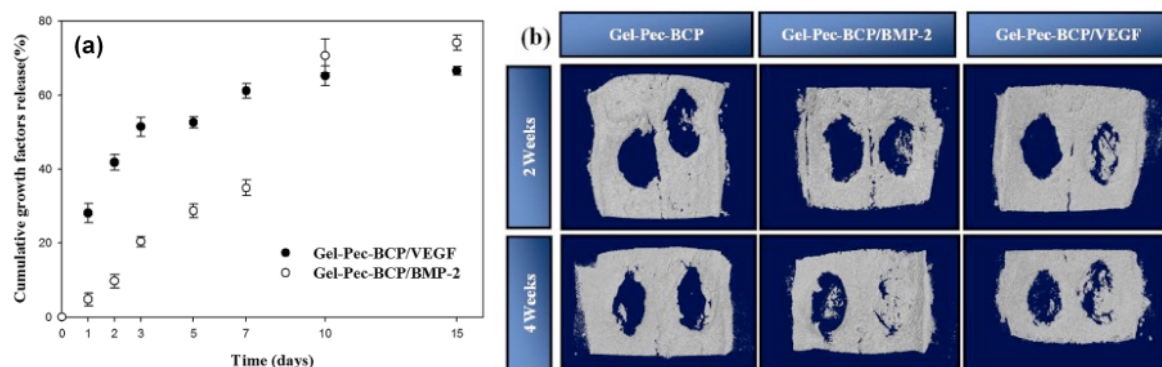
- Le profil de libération est prolongé et la cinétique de libération est souvent contrôlée par diffusion. Il est possible de combiner cette approche avec le chargement direct des biomolécules afin d'avoir une libération séquentielle.
- L'encapsulation de biomolécules comme les FC peut être compliquée en raison de sa grande taille.



**Figure 13.** Schéma illustrant les différentes techniques utilisées pour l'incorporation des biomolécules dans les biomatériaux. **(A)** Incorporation directe ou absorption dans le biomatériau. **(B)** Immobilisation non covalente des biomolécules par la formation de complexes ioniques avec les chaînes du polymère. **(C)** Immobilisation covalente de biomolécules aux chaînes de polymère. **(D)** Délivrance par transporteur en utilisant de microparticules avec des biomolécules cibles<sup>(99)</sup>.

A titre d'exemple, plusieurs études ont montré la biofonctionnalisation de scaffolds avec le VEGF. Behr *et al.*<sup>(95)</sup> ont chargé 200 ng de VEGF-A par imprégnation d'une éponge commerciale de collagène (HELISTAT<sup>®</sup>) implantée chez la souris. Les résultats ont démontré une régénération osseuse complète dès la troisième semaine similaire à une éponge chargée avec BMP-2. Ils ont également démontré une réponse antigénique accrue lors de la régénération des défauts. Amirian *et al.*<sup>(100)</sup> ont développé un scaffold composite à base de gélatine/pectine/BCP (Gel-Pec BCP) chargé avec VEGF et BMP-2 séparément. Les résultats obtenus ont montré une libération *in vitro* de VEGF 2,5 fois plus rapide que celle de BMP-2 pendant les 3 premiers jours, puis le VEGF a été libéré progressivement jusqu'à 15 jours (Figure 14a). La régénération osseuse *in vivo* a été un succès chez les rats après 4 semaines pour les scaffolds composites chargées avec VEGF et BMP-2 contrairement au scaffold sans biomolécules (Figure 14b).





**Figure 14.** Résultats d'un scaffold composite de Gel-Pec BCP chargé avec VEGF et BMP-2 séparément obtenus par Amirian *et al.*<sup>(100)</sup>. **(a)** Profils de libération cumulatifs *in vitro* de VEGF et de BMP-2 et **(b)** Images 3D µ-CT des scaffolds composites chargés et non-chargés implantés chez les rats.

Le Tableau 8 montre un résumé des études concernant l'incorporation de VEGF dans les scaffolds. Les systèmes à libération de deux FCs ont de manière générale montré de meilleurs résultats en termes de vascularisation et de régénération osseuse. Ainsi, la libération combinée de VEGF et BMPs est largement étudiée<sup>(5,21,27,36)</sup>.

**Tableau 8.** Scaffolds utilisés pour la libération de VEGF seul et avec autres FC pour l'ITO.

VEGF seul				
Scaffold	Mise en forme du scaffold	Technique d'incorporation FC	Résultats	Réf.
<b>Alginate/chitosane /PLA</b>	Lyophilisation	Microsphères	Libération contrôlée <i>in vitro</i> du VEGF avec une bio-activité élevée.	(94)
<b>Collagène (HELISTAT®)</b>	Éponge	Chargement direct par imprégnation	Régénération complète de l'os chez les souris après 3 semaines d'implantation.	(95)
<b>Fibroïne de soie/CaP/PLGA</b>	Lyophilisation/ electrospinning	Chargement direct dans les nano-fibres	Libération contrôlée <i>in vitro</i> jusqu'à 28 jours avec une bio-activité élevée.	(96)
<b>Gélatine/pectine/ BCP</b>	Lyophilisation	Chargement direct par imprégnation	La libération <i>in vitro</i> de VEGF a été 2.5 fois plus rapide que celle de BMP-2 pendant les 3 premiers jours. La régénération osseuse a été réussie chez les rats après 4 semaines.	(100)
<b>Hydroxyapatite/ collagène</b>	Lyophilisation	Chargement direct avant lyophilisation	« Burst » de libération initiale <i>in vitro</i> pendant les 3 premiers jours. Chez les rats, il y a eu une amélioration d'angiogenèse et d'ostéogenèse (comparée au scaffold nu).	(97)
<b>Hydroxyapatite-collagène</b>	Lyophilisation	Chargement direct avant lyophilisation	Cinétique de libération plus élevée et plus rapide, atteignant	(101)

un pic de libération au septième jour.

**Double système : VEGF + FC**

Scaffold	Mise en forme du scaffold	Technique d'incorporation FC	Résultats	Réf.
<b>PPF/gélatine</b>	Photocrosslinking/ Hydrogel	VEGF – Chargement direct dans l'hydrogel BMP-2 – microsphères	La libération des FC chez les rats a démontré un « burst » de libération de VEGF pendant 3 jours, et une libération prolongée de BMP-2.	(102)
<b>Brushite – chitosane</b>	Lyophilisation	VEGF - Microsphères PDGF - Chargement direct	Libération contrôlée <i>in vivo</i> de deux FC localisée sur le site du défaut osseux.	(103)
<b>Fibroïne de soie/CaP/PLGA</b>	Lyophilisation/ electrospinning	VEGF - Chargement direct dans les nano-fibres de fibroïne PDGF -Chargement direct dans les nano-fibres de PLGA	Libération contrôlée <i>in vitro</i> de deux FC jusqu'à 28 jours avec une bio-activité élevée. Le PDGF a été libéré plus lentement que le VEGF.	(104)

### 3. Conclusion

Le traitement de défauts osseux est devenu un problème clinique et socio-économique majeur. L'utilisation de greffes osseuses et substituts osseux n'est pas suffisant pour la réussite du traitement. De plus, la vascularisation est essentielle pour la régénération complète du tissu osseux. L'ITO, une stratégie qui combine l'utilisation de scaffolds, cellules et molécules bioactives, est donc perçue comme une alternative face aux greffes traditionnelles. L'importance des différents composants de l'ITO (tels que les scaffolds, les cellules et les molécules bioactives) ont été discutés et mis en évidence. D'un autre côté, l'ITO *in situ* semble d'être une alternative car elle n'utilise pas les cellules exogènes.

Les scaffolds sont une partie essentielle dans l'ITO. Le scaffold idéal aura des propriétés essentielles comme la biocompatibilité, la biodégradabilité et la bio-activité, ainsi qu'une porosité interconnectée supérieure à 60%, des pores (entre 150 et 400  $\mu\text{m}$ ) et des propriétés mécaniques nécessaires pour une réponse cellulaire adaptée.

La fonctionnalisation des scaffolds avec des biomolécules est important pour favoriser la réponse cellulaire, mais aussi pour attirer les cellules vers le site d'implantation et favoriser la prolifération cellulaire. Parmi la large gamme de biomolécules étudiées dans la littérature, le VEGF est très intéressant en raison de son activité angiogénique (développement de vaisseaux sanguins) et son activité ostéogénique (recrutement d'ostéoblastes). Enfin, la technique d'incorporation des biomolécules reste essentielle pour contrôler la vitesse de libération et la stabilité de la biomolécule. Ainsi, au regardant des résultats dans la littérature, l'incorporation de biomolécules comme le VEGF par adsorption semble être intéressante dans un scaffold comme les hydrogels, répondant à de nombreux points du cahier des charges.

### Chapitre 3. Les hydrogels pour l'ingénierie tissulaire osseuse

Les hydrogels sont des biomatériaux de choix pour la réparation osseuse, notamment par l'approche de l'ITO, grâce à leurs caractéristiques uniques. En effet, ils peuvent être utilisés sous plusieurs formes en fonction des besoins cliniques, par exemple, pour le remplissage de petits défauts (injectable) ou le comblement de défauts osseux larges (éponges) en s'adaptant parfaitement à la forme du défaut <sup>(105,106)</sup>.

Les hydrogels sont des réseaux tridimensionnels de chaînes polymères enchevêtrés gonflés par l'eau. La très forte teneur en eau ( $\geq 90\%$ ) des hydrogels permet le transport efficace de l'oxygène, des nutriments et des produits métabolisés. Malgré leur forte affinité pour l'eau, ces réseaux tridimensionnels sont insolubles grâce à des liaisons physiques et chimiques formées entre les chaînes de polymère. Les hydrogels possèdent des propriétés viscoélastiques ajustables pour réduire au maximum l'irritation des tissus environnants <sup>(106-111)</sup>.

Les hydrogels sont aussi capables de mimer les caractéristiques structurelles, mécaniques et chimiques de la MEC. Par conséquent, ils peuvent idéalement servir de supports aux cellules exogènes pour la régénération tissulaire <sup>(105,106,111,112)</sup>. Ils ont montré également leur capacité à piéger des biomolécules et des principes actifs, et peuvent donc agir comme véhicules pour la libération de molécules (tels que des médicaments, des facteurs de croissance (FCs), des cytokines, *etc.*) <sup>(105,106,111)</sup>.

#### 1. Classification des hydrogels

Les hydrogels sont classifiés selon différents critères, *i.e.* la nature des polymères, le type de réticulation, structure, *etc.*, comme illustré dans le Tableau 9.

**Tableau 9.** Classification des hydrogels en fonction des différentes propriétés <sup>(107,109,111)</sup>.

Classification	Caractéristique
<b>Nature des polymères</b>	Naturels Synthétiques Hybrides ou Composites
<b>Méthode de préparation /Structure</b>	Homopolymères Copolymères Réseau interpénétrant
<b>Charge ionique</b>	Anioniques Cationiques Non-ioniques
<b>Méthode de réticulation</b>	Chimiques Physiques
<b>Structures physiques</b>	Amorphes Cristallines
<b>Biodégradabilité</b>	Dégradable/Résorbable Non dégradable

<b>Sensibilité aux stimuli environnementaux</b>	Chimique :	Biochimique :	Physique :
	pH Glucose Oxydation	Antigènes Enzymes Ligands	Température Lumière Force ionique Rayonnement électrique et magnétique

Dans le cas de la classification des hydrogels selon la nature des polymères, nous allons plus particulièrement nous focaliser sur les hydrogels à base de polymères naturels, lesquels peuvent être formés à partir de protéines et de polysaccharides<sup>(105,108,110,112)</sup>.

Les hydrogels à base de polymères naturels sont particulièrement avantageux pour l'IT et pour la délivrance de biomolécules de par leur biocompatibilité et dégradabilité. En effet, la composition chimique des polymères naturels s'approche de celle de la MEC et favorise l'adhésion et la prolifération cellulaire, dont la régénération des tissus<sup>(105)</sup>. De plus, ils sont dégradés dans le corps humain par voie enzymatique et leurs produits de dégradation ne sont pas toxiques pour les tissus environnants avec de faibles réponses inflammatoires<sup>(105,110)</sup>. Par conséquent, ils sont un bon choix pour offrir une intégrité structurelle aux tissus<sup>(105,108)</sup>.

De nos jours, il existe de nombreux travaux dans la littérature sur la formation des hydrogels à partir de protéines telles que la fibrine<sup>(113,114)</sup>, la soie<sup>(115,116)</sup>, le collagène<sup>(117,118)</sup> et la gélatine<sup>(119,120)</sup>. Bien que les protéines favorisent la signalisation cellulaire en raison de leur interaction spécifique avec d'autres protéines ou ligands dans le corps<sup>(121)</sup>, leur inconvénient majeur est la réponse immunologique qu'ils provoquent<sup>(108)</sup>. Cela est dû à l'origine humaine ou animale des protéines, notamment le collagène et la fibrine.

Les polysaccharides tels que l'acide hyaluronique (HA)<sup>(122,123)</sup>, les alginates<sup>(124,125)</sup>, la cellulose<sup>(126,127)</sup> et le chitosane (CHT) sont également utilisés pour l'obtention d'hydrogels pour l'IT. Parmi eux, le CHT fait l'objet de nombreuses études en raison de ses propriétés intéressantes. Ses caractéristiques, propriétés et formulation en tant qu'hydrogels seront développées dans la section 3.

## 2. Formes des hydrogels

Les hydrogels peuvent être utilisés sous différentes formes où états physiques. Ci-dessous nous allons décrire trois formes d'hydrogels : les hydrogels non-injectables, les hydrogels injectables et les éponges (hydrogel macroporeux). Parmi eux, ces deux derniers présentent des caractères intéressants pour notre application et seront développés plus en détail.

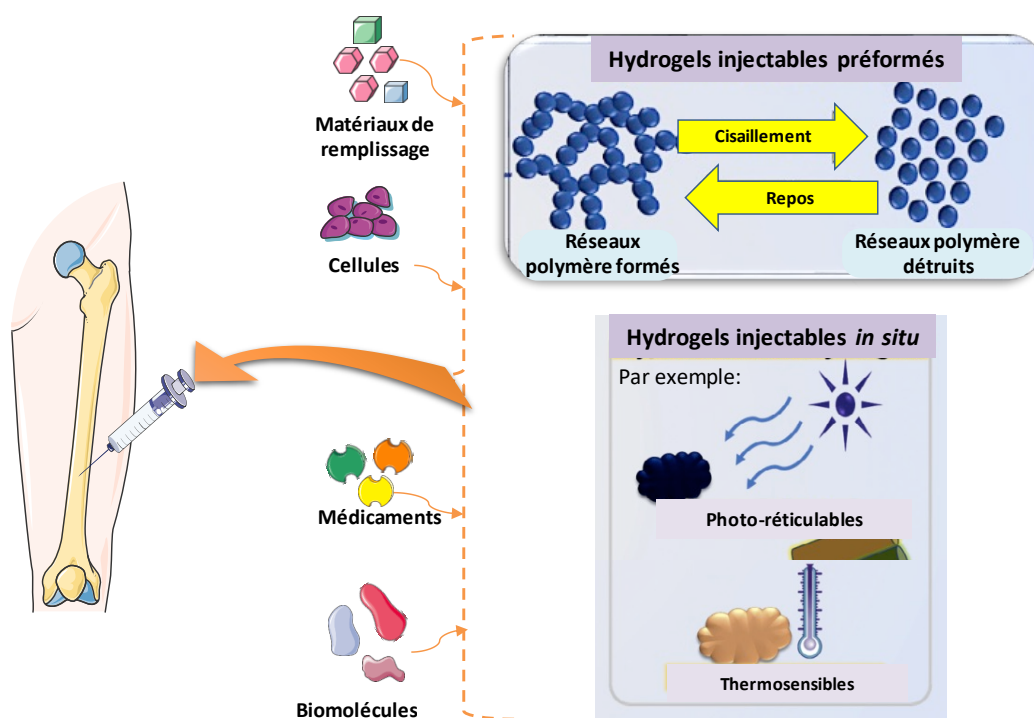
## 2.1. Hydrogels non-injectables

Les hydrogels non-injectables ont des structures fortement réticulées par des liaisons chimiques ou physiques et sont de nature « solide » à température ambiante. Ils peuvent gonfler dans l'eau, les solutions tamponnées et les fluides biologiques<sup>(110)</sup>. Par exemple, Zheng *et al.*<sup>(128)</sup> ont développé des hydrogels hybrides d'acide polyacrylique/alginate /matrice osseuse déminéralisée (PAA/Alg/DBM) obtenus à partir d'une réticulation chimique en deux étapes. Les résultats ont montré que l'hydrogel hybride « solide » possédait une résistance mécanique élevée, un rapport de gonflement supérieur à 15 et une bonne cytocompatibilité vis-à-vis la lignée cellulaire d'ostéosarcome humain (MG63)<sup>(128)</sup>. Cependant, l'application d'un hydrogel « solide » dans l'IT semble être limitée, en raison de sa structure mal appropriée pour l'ensemencement ou l'encapsulation des cellules.

## 2.2. Hydrogels injectables

Les hydrogels injectables sont basés sur un système « sol-gel » à partir d'un mélange polymère. Ce mélange peut être injecté en raison de sa viscosité suffisamment basse pour passer à travers une aiguille qui deviendra un hydrogel pendant la transition de phase du sol au gel<sup>(129)</sup>. Les hydrogels sont étroitement dépendants de ses propriétés viscoélastiques pour être injectables.

Les hydrogels injectables sont devenus très intéressants pour l'ITO en raison de leur facilité de manipulation, leur capacité à remplir les défauts irréguliers, et surtout leur potentiel à être utilisés dans la chirurgie mini-invasive<sup>(112,130,131)</sup>. De plus, ils peuvent être utilisés en tant que supports pour l'administration d'agents thérapeutiques et de cellules<sup>(130,132)</sup>. Pour la reconstruction osseuse, différents polymères naturels (comme le collagène, la gélatine, le CHT, l'alginate, l'acide hyaluronique et le fibrinogène) et synthétiques (comme le polyéthylène glycol, le poly(N-isopropylacrylamide), et le copolymère Pluronic®) ont été utilisés pour l'obtention d'hydrogels injectables<sup>(133)</sup>. Dans ce contexte, deux types d'hydrogels injectables (selon le moment de gélification) ont été décrites<sup>(134,135)</sup> (Figure 15) : les hydrogels injectables *in situ* et les hydrogels injectables *préformés*.



**Figure 15.** Schéma illustrant les deux classes d'hydrogels injectables : hydrogels préformés et les hydrogels *in situ*. Ils peuvent servir comme support pour la délivrance des cellules, médicaments, biomolécules et matériaux de remplissages (e.g. les CaP). Adapté de Sivashanmugam *et al.*<sup>(130)</sup>.

### 2.2.1. Hydrogels *in situ* et préformés

Les **hydrogels *in situ*** sont obtenus à partir de la transition sol–gel des précurseurs de l'hydrogel dans conditions physiologiques. Ce type d'hydrogel peut être formé par réticulation chimique (par des agents réticulants, des agents photosensibles, par réactions polymère-polymère, *etc.*) ou par réticulation physique (e.g. Réaction thermo sensible des polymères, réaction au pH, *etc.*)<sup>(134)</sup>. Chichiricco *et al.*<sup>(136)</sup> ont développé un hydrogel *in situ* à base d'hydroxypropylméthylcellulose silanisée (Si-HPMC) et carboxyméthyle chitosane méthacrylé (MA-CMCS) via la réticulation photochimique (120 s d'irradiation) pour la régénération guidée de défauts parodontaux. Les résultats ont montré un bonne cytocompatibilité de l'hydrogel Si-HPMC/ MA-CMCS vis-à-vis les fibroblastes murins<sup>(136)</sup>. Néanmoins, un des inconvénients majeurs des hydrogels *in situ* est sa progressive gélification sensible au temps. En conséquence, la solution initiale (contenant les précurseurs) peut diffuser des composants toxiques (dans le cas des agents réticulant, par exemple) dans les tissus environnants et diminuer l'efficacité de la gélification<sup>(134,135)</sup>.

Les **hydrogels injectables préformés** sont obtenus à partir de la transition gel–sol–gel à partir des hydrogels préformés dans une seringue par auto-assemblage des chaînes polymères via des liaisons faible<sup>(135)</sup>. Ces systèmes comprennent les hydrogels réticulés par assemblage peptidique et des protéines, par interactions ioniques entre deux polymères (complexes polyélectrolytes), par interactions électrostatiques entre systèmes colloïdaux et par la formation de structures supramoléculaires<sup>(134,135,137)</sup>. Il convient de signaler que la

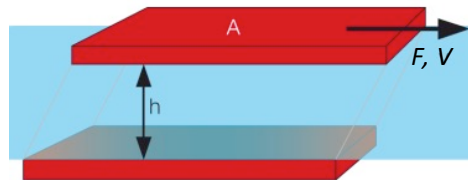
majorité des hydrogels injectables *préformés* sont particulièrement adaptés à l'encapsulation et à la délivrance de cellules et/ou de principes actifs<sup>(135,138,139)</sup>.

## 2.2.2. Caractéristiques rhéologiques des hydrogels

### 2.2.2.1. Notions fondamentales de rhéologie

La rhéologie étudie la déformation de la matière, y compris son écoulement, sous une contrainte appliquée. Le terme a été introduit en 1920 par Bingham, sur la base du mot grec «panta rhei» qui signifie écoulement<sup>(140)</sup>.

Un modèle à deux plaques est utilisé pour définir les paramètres rhéologiques nécessaires du comportement de l'écoulement comme est montré dans la Figure 16. Le cisaillement appliqué à l'échantillon sera exprimé en termes de déformation ( $\gamma$ ), taux de cisaillement ( $\dot{\gamma}$ ) et de contrainte de cisaillement ( $\tau$ )<sup>(141)</sup>.



**Figure 16.** Modèle à deux plaques utilisé pour décrire le mouvement de cisaillement à l'aide des paramètres comme la force (F) et la vitesse (V)<sup>(141)</sup>.

#### a) Viscosité

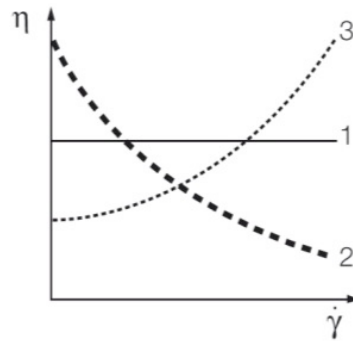
La viscosité ( $\eta$ ) est une mesure directe de la capacité de l'hydrogel à résister à la déformation en réponse à une contrainte<sup>(134)</sup> défini comme suit :

$$\eta = \tau / \dot{\gamma} \quad (1)$$

Soit  $\tau$  contrainte de cisaillement et  $\dot{\gamma}$  taux de cisaillement<sup>(141)</sup>.

La rhéologie permet d'étudier la viscosité des mélanges en mode rotation<sup>(141)</sup>. La Figure 17 illustre les 3 principales rhéogrammes représentatifs des fluides newtoniennes (viscosité est constante et indépendante de la contrainte et du temps) et non newtoniennes. C'est dernier présente deux catégories de fluides : les rhéofluidifiantes (la viscosité diminue pour des taux de cisaillement croissants) et les rhéoépaississants (la viscosité augmente pour des vitesses de cisaillement croissantes)<sup>(141,145)</sup>.





**Figure 17.** Rhéogrammes des fluides (1) newtoniennes, (2) rhéofluidifiants et (3) rhéoépaississant<sup>(141)</sup>.

## b) Propriétés viscoélastiques

Deux paramètres importants existent permettant la caractérisation des matériaux viscoélastiques, à savoir le module de stockage ( $G'$ ) et le module de perte ( $G''$ ). Ceux-ci sont dérivés du module de cisaillement complexe ( $G^*$ ) défini comme suit<sup>(142)</sup> :

$$G^* = \tau / \gamma \quad (2) \quad G' = G^* \cos \delta \quad (3) \quad G'' = G^* \sin \delta \quad (4)$$

Soit  $\tau$  contrainte de cisaillement,  $\gamma$  déformation<sup>(142)</sup> .

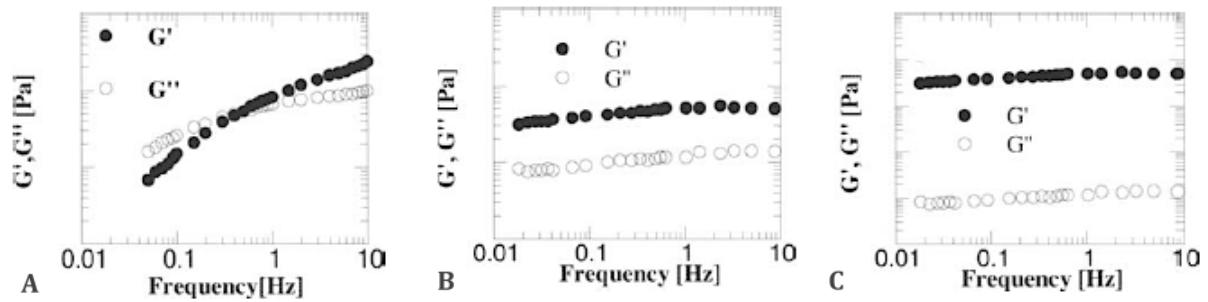
Le  $G'$ , défini comme le composant élastique, est la mesure de l'énergie de déformation stockée pour l'hydrogel lors du processus de cisaillement et décrit la force et le degré auquel le gel agit comme un solide<sup>(140,142)</sup>.

Le  $G''$ , défini comme le composant visqueux, est la mesure de l'énergie de déformation dépensée et perdue par l'hydrogel lors de l'application du cisaillement. Un  $G''$  élevé par rapport à  $G'$  décrit un matériau très visqueux<sup>(140,142)</sup>.

Le  $\tan \delta$ , défini comme le rapport  $G''/G'$ , exprime le bilan viscoélastique de l'hydrogel<sup>(140,142,143)</sup>.

Le mode oscillatoire est la méthode plus efficace pour mesurer les propriétés viscoélastiques des hydrogels<sup>(141)</sup>, et déterminer la gélification d'un mélange par le point gel ( $G' = G''$ ). Les tests classiques sont le balayage d'amplitude, le balayage de fréquence, le balayage au cours du temps et le balayage de température (pour les hydrogels thermosensibles)<sup>(142)</sup>.

- *Balayage d'amplitude de déformation ( $\gamma$ )* : Ce test détermine la valeur de la déformation à laquelle l'hydrogel est détruit hors de la région viscoélastique (RVE)<sup>(141,144)</sup>.
- *Balayage de fréquence ( $\nu, \omega$ )* : Ce test permet d'observer le spectre mécanique des mélanges et de distinguer clairement les solutions (enchevêtrés) et hydrogels comme illustre la Figure 18.

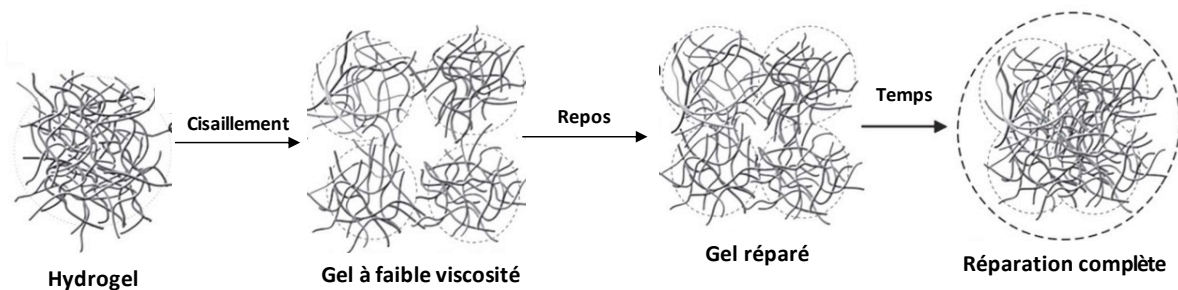


**Figure 18.** Spectres mécaniques caractéristiques de (A) une solution, (B) un hydrogel "faible" (interactions physiques) et (C) un hydrogel "forte" (interactions covalentes)<sup>(143)</sup>.

- *Balayage au cours du temps* : Ce test détermine la gélification d'un mélange par rapport au temps à une déformation et à une fréquence définies.
- *Balayage de température* : Ce test détermine la thermo gélification des mélanges, à une déformation et à une fréquence définies.

### 2.2.2.2. Caractérisation rhéologique des hydrogels injectables

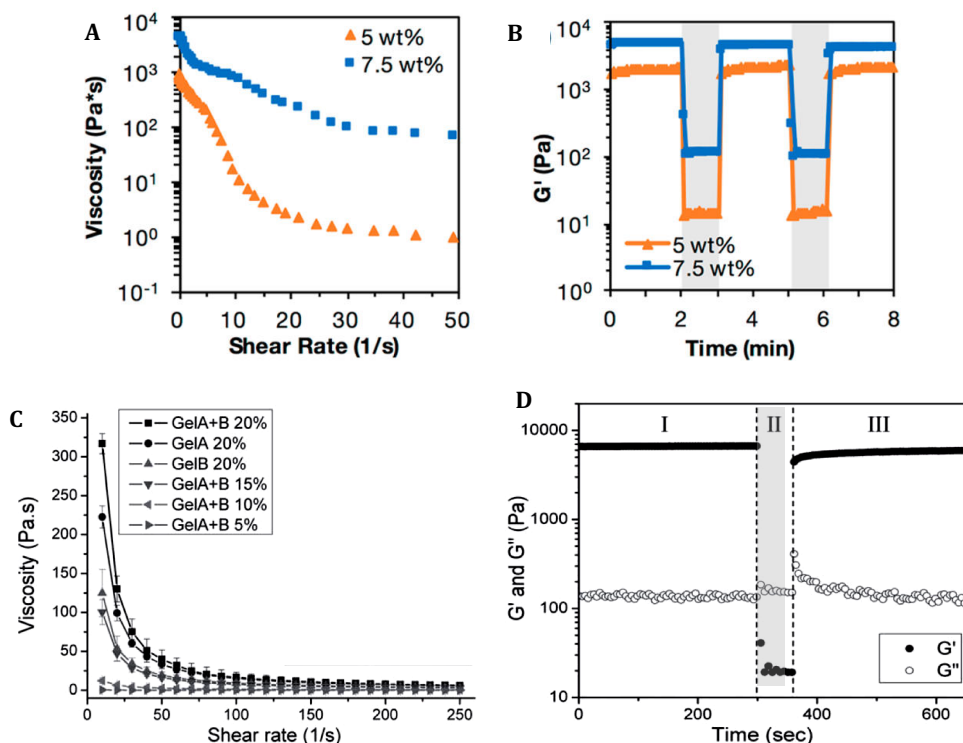
Les hydrogels injectables *préformés* doivent répondre à des exigences essentielles comme posséder un caractère rhéofluidifiant et autoréparant<sup>(134,135)</sup>. Les hydrogels peuvent être injectés grâce à leur caractère rhéofluidifiant, où la viscosité de l'hydrogel diminue avec l'augmentation de la force de cisaillement. Une fois l'hydrogel au repos, il reprend son caractère élastique (propriété appelé autoréparante)<sup>(131,134,138,146)</sup>. Ce comportement est illustré dans la Figure 19.



**Figure 19.** Schéma de l'évolution de la structure du réseau polymère pendant le cisaillement (destruction du réseau) et le repos (réparation du réseau)<sup>(135)</sup>.

Les méthodes d'analyse rhéologique qui sont utilisées pour observer le caractère injectable d'un hydrogel seront décrites ci-dessous.

Le caractère **rhéofluidifiant** (shear-thinning) d'un hydrogel est déterminé en appliquant une rampe continue de cisaillement et en mesurant la diminution de la viscosité. La Figure 20A-C illustre les courbes représentatives des hydrogels rhéofluidifiants : la viscosité du gel diminue considérablement lorsque le taux de cisaillement augmente<sup>(134,147)</sup>.



**Figure 20.** Résultats des analyses rhéologiques pour (A et B) des hydrogels supramoléculaires à base d'HA modifié avec  $\beta$ -cyclodextrine (CD-HA) et adamantane (Ad-HA) à une concentration de 5 et 7,5%<sup>(134)</sup> et (C et D) des hydrogels à base d'un complexe d'auto-assemblage de gélatine contenant différentes concentrations de nanosphères de gélatine<sup>(147)</sup>. (A et C) Analyse en mode balayage du taux de cisaillement et (B et D) Analyse de déformation cyclique, les régions ombrées sont à forte contrainte et les régions non ombragées sont à faible contrainte.

Le caractère **autoréparant** (self-healing) est évalué à travers une analyse de déformation cyclique. Pour ce faire, les hydrogels seront soumis à des cycles répétitifs de contrainte faible et de contrainte élevé. La Figure 20B-D illustre le comportement d'auto-réparation des hydrogels : à forte contrainte le module  $G'$  de l'hydrogel diminue et il devient visqueux (région ombrée). Lorsque la contrainte cesse, les liaisons inter chaînes se rétablissent et l'hydrogel reprend son comportement élastique ( $G' \gg G''$ )<sup>(134,147)</sup>.

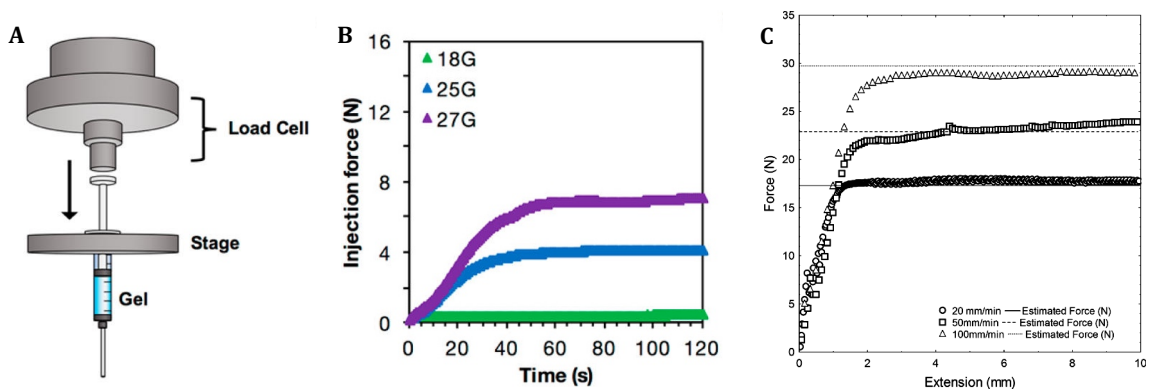
En conclusion, un hydrogel injectable préformé montre un caractère viscoélastique modulable en fonction de la force de cisaillement appliquée, dit phénomène réversible.

### 2.2.3. Mesure de la force d'injection d'hydrogel

Lors de son application en clinique, l'hydrogel est injecté au moyen d'une seringue. La force à appliquer sur le piston pour provoquer son écoulement à travers l'aiguille est donc un critère essentiel à considérer<sup>(134)</sup>. L'injectabilité d'un hydrogel est liée ses propriétés viscoélastiques ( $G'$  et  $G''$ ), mais aussi aux facteurs tels que la concentration, la viscosité, le processus de gélification et le taux de gélification<sup>(133)</sup>.

Une méthode typique de test d'injectabilité consiste à extruder l'hydrogel à travers une seringue avec ou sans aiguille par application d'une force (dit force d'injection)<sup>(148)</sup>. Un test de résistance à la compression est utilisé pour mesurer la force d'injection (Figure 21A). La cellule

de charge applique une force sur le piston d'une seringue pour éjecter l'hydrogel à travers une aiguille<sup>(134)</sup>. La force d'injection est fortement influencée par différents facteurs tels que la vitesse d'enfoncement du piston, le débit, le diamètre et longueur de la seringue et le calibre et la longueur des aiguilles<sup>(134,149,150)</sup>. Par exemple, Chen *et al.*<sup>(134)</sup> ont trouvé que la réduction du diamètre de l'aiguille (de 18G à 27G) a induit l'augmentation de la force d'injection pour l'hydrogel supramoléculaire d'acide hyaluronique modifié avec  $\beta$ -cyclodextrine (CD-HA) ou l'adamantane (Ad-HA) (Figure 21B). Lima *et al.*<sup>(149)</sup> ont rapporté l'augmentation de la force d'injection lors de l'augmentation de la vitesse d'enfoncement du piston (de 20 mm/min à 100 mm/min) pour un hydrogel à base de CHT/polyéthylène glycol (PEG) (Figure 21C).



**Figure 21.** (A) Schéma illustrant le montage pour mesurer la force d'injection avec une machine d'essai mécanique. (B) Graphique montrant la force d'injection pour un hydrogel supramoléculaire d'HA injecté à partir d'une seringue de 1 mL avec différentes aiguilles de 18G, 25G et 27G à un débit de 2 mL/h<sup>(134)</sup>. (C) Graphique montrant la force d'injection pour un hydrogel de CHT/PEG injecté avec la même aiguille à différentes vitesses transversales<sup>(149)</sup>.

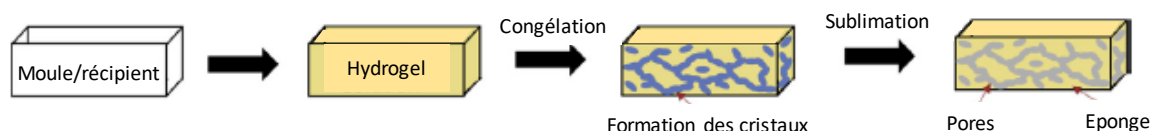
L'étude de Cilurzo *et al.*<sup>(151)</sup> a défini qu'une force d'injection inférieure à 45 N représente une injection facile pour le chirurgien<sup>(151)</sup>. Cependant l'injectabilité réelle peut varier par rapport à l'ergonomie de la seringue qui peut affecter la force appliquée<sup>(134)</sup>.

### 2.3. Éponges (hydrogels macroporeux)

Les éponges sont des hydrogels macroporeux et présentent une architecture similaire à celle de la MEC. La littérature rapporte beaucoup d'exemples dans lesquelles les éponges ont été utilisées dans l'IT pour la croissance du tissu hôte, la régénération osseuse ou la vascularisation d'un organe<sup>(152,153)</sup>. Différentes méthodes ont été rapportées pour la mise en forme des éponges telles que l'utilisation de gaz pour la génération des pores (« gas foaming »), l'utilisation de solvants avec des agents porogènes (« solvent casting ») et la lyophilisation<sup>(153-155)</sup>. Cette dernière méthode est la plus utilisée en raison de sa simplicité<sup>(155-158)</sup>.

### 2.3.1. Formation d'éponges par lyophilisation

La lyophilisation des hydrogels conduit à la formation des structures poreuses alvéolaires sous la forme de mousses ou d'éponges. Cette méthode consiste à éliminer l'eau (sous la forme de cristaux) d'un hydrogel congelé par sublimation de la glace (Figure 22).

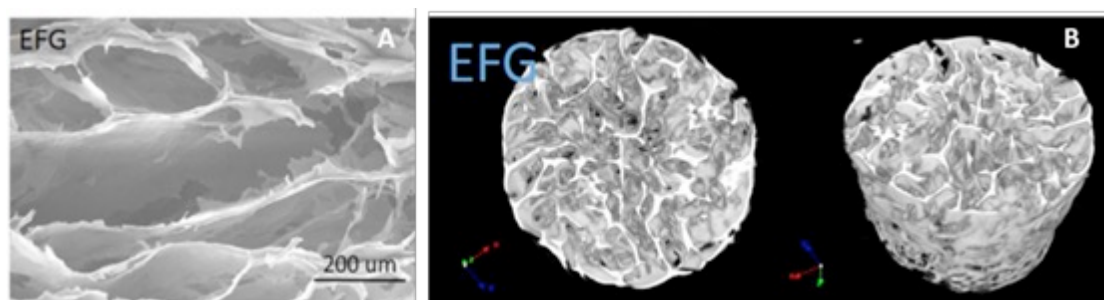


**Figure 22.** Processus de fabrication d'éponge de CHT par lyophilisation<sup>(155)</sup>.

### 2.3.2. Propriétés des éponges formées par lyophilisation

#### 2.3.2.1. Porosité

L'éponge formée par lyophilisation d'un hydrogel présente une porosité allant jusqu'à 90% et présente des pores interconnectés<sup>(159)</sup>. Cette structure poreuse interconnectée est un bon support pour la culture des cellules<sup>(160)</sup> et sa topographie de surface peut favoriser la prolifération et la migration des cellules<sup>(155)</sup>. La porosité des éponges dépend généralement de plusieurs facteurs en fonction de la composition de l'hydrogel (concentration du polymère, degré de réticulation, etc.) et des conditions de congélation (température, gradient de congélation, vitesse de congélation, etc.)<sup>(157-159)</sup>. Par exemple, plus la température de congélation est basse, plus la vitesse de congélation est rapide. Cela entraîne la formation des cristaux de glace dans un court période de temps pour se développer et donc la taille des pores sera plus petite<sup>(159)</sup>.



**Figure 23.** Caractérisation de la porosité d'une éponge de soie réticulé par la genipine et obtenue par lyophilisation rapporté par Silva *et al.*<sup>(115)</sup>. **(A)** Images au MEB de la coupe transversale des éponges et **(B)** reconstruction 3D des éponges par  $\mu$ CT, en vue de dessus, longitudinale (gauche) et latérale (droite).

La porosité de l'éponge peut être caractérisée en utilisant différentes techniques comme la microscopie électronique à balayage (MEB) et la microtomographie par rayons X ( $\mu$ CT). Le MEB permet l'observation de la surface de l'éponge avec une résolution de jusqu'à 1  $\mu$ m de profondeur sur un champ d'observation relativement petit (Figure 23A). En revanche, le  $\mu$ CT permet d'analyser des échantillons de différentes tailles et de visualiser la structure interne de

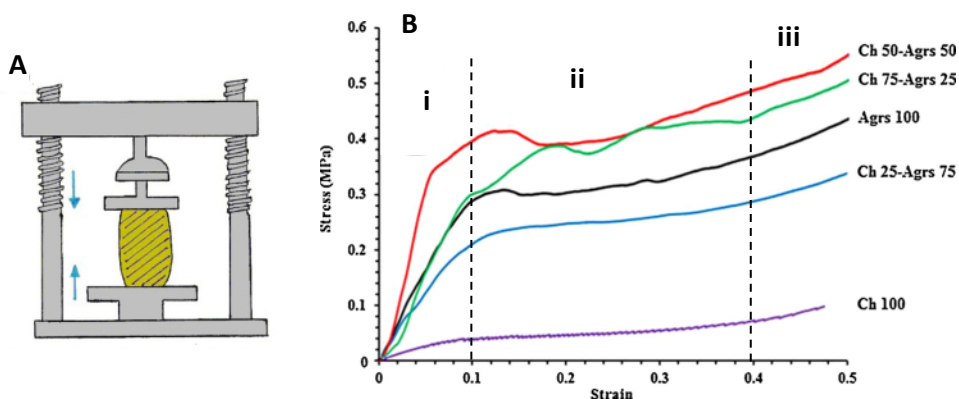
l'éponge en 3D par reconstruction d'images en 2D prises sous différents angles (Figure 23B)<sup>(154)</sup>.

### 2.3.2.2. Propriétés mécaniques

Les éponges possèdent des propriétés mécaniques supérieures à celles des hydrogels injectables<sup>(153)</sup>. Les propriétés mécaniques des éponges sont évaluées par la mesure du module de Young (E, résistance d'un matériau élastique à la contrainte défini comme le rapport de la contrainte de traction à la déformation), de la résistance à la traction, de la déformation à la rupture et de la résistance à la compression<sup>(161)</sup>.

Une autre propriété importante est la rigidité qui est définie comme la résistance à la déformation lorsque le matériau est soumis à des contraintes mécaniques, elle est habituellement définie comme la pente de la région linéaire de la courbe contrainte – déformation des matériaux<sup>(161)</sup>.

Des techniques différentes sont fréquemment utilisées pour mesurer les propriétés mécaniques comme les méthodes de traction, de compression, le test d'indentation, *etc.*<sup>(161)</sup>. Dans le cas d'étude préliminaire des propriétés mécaniques, nous allons nous focaliser d'abord sur le test de compression.



**Figure 24.** (A) Schéma illustrant le test de compression non confiné<sup>(161)</sup> et (B) Les courbes contrainte – déformation en compression représentatives des éponges de CHT/alginate à différents ratios rapportés par Felfel *et al.*<sup>(162)</sup>.

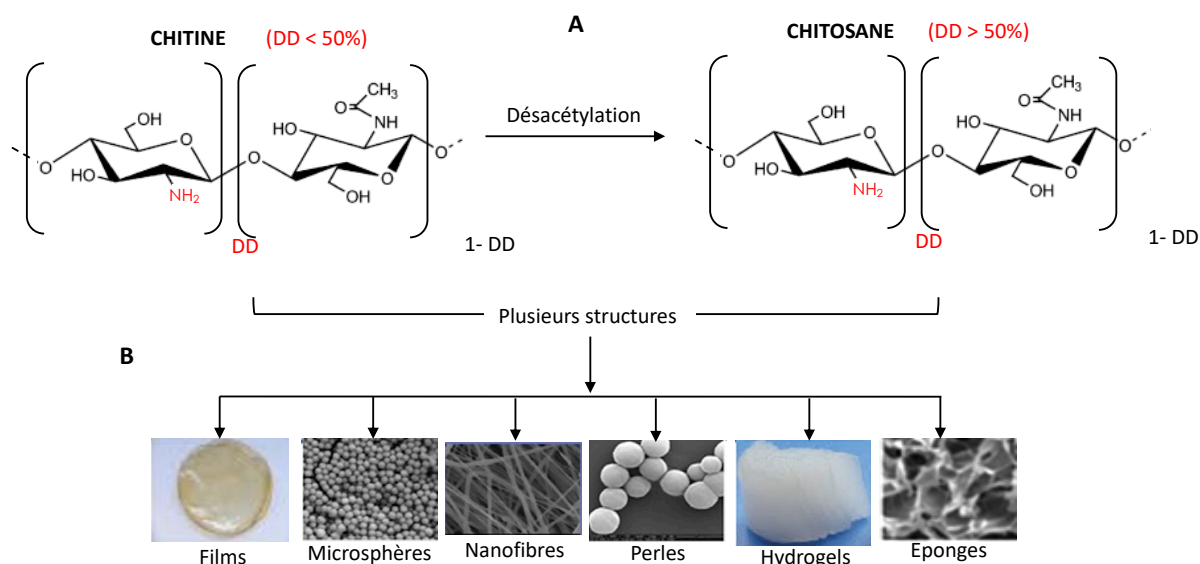
Le test de compression est effectué en utilisant une plaque soumise à une charge spécifique pour induire une force de compression sur un échantillon déposé sur le plateau de l'appareil (Figure 24A). La force et le déplacement pour la compression de l'échantillon sont enregistrés par le logiciel pour créer une courbe de contrainte – déformation. La courbe présentée dans la Figure 24B présente un profil typique d'un matériaux polymère poreux, en exposant 3 régions : (i) la région élastique linéaire entre 5 et 10% de déformation et (ii) une région de plateau aux déformations élevées (jusqu'à 40%) et (iii) la région de densification à une déformation très élevée (au-delà de 45%)<sup>(162,163)</sup>. A partir de cette courbe, les valeurs de module de compression et la résistance à la compression peuvent être obtenus<sup>(161)</sup>.

### 3. Hydrogels à base de chitosane

#### 3.1. Le chitosane : définition, source et structure

Le chitosane (CHT) est un produit dérivé de la chitine, un élément structural retrouvé dans l'exosquelette des crustacés (comme la crevette, le crabe et le homard) et des insectes. Il est aussi naturellement présent dans la paroi cellulaire des champignons<sup>(154,164-166)</sup>. La chitine est le deuxième polymère naturel le plus abondant après la cellulose<sup>(167)</sup>. L'obtention du CHT peut se faire à partir de la désacétylation partielle de la chitine de façon chimique ou enzymatique<sup>(154,156,168)</sup>. Cependant, le processus le plus utilisé est la désacétylation chimique en raison de ses faibles coûts et de la facilité de production à l'échelle industrielle<sup>(168)</sup>. Dans ce cas, la chitine est traitée avec l'hydroxyde de sodium concentré pendant une longue période de temps afin d'éliminer le groupe acétyle et en laissant à sa place le groupe amine ( $-NH_2$ ). Ce processus est souvent réalisé sous une atmosphère d'azote afin d'éviter des réactions indésirables<sup>(160,169)</sup>.

Chimiquement, le CHT (Figure 25A) est un polysaccharide linéaire composé d'unités de répétition D-glucosamine et de N-acétyl-D-glucosamine, reliées par des liaisons glycosidiques de type  $\beta$ -(1-4)<sup>(167,170)</sup>. Le degré de désacétylation (DD) qui représente la fraction de motifs glucosamine est supérieure à 50% pour le CHT, et inférieure à 50% pour la chitine. La masse molaire du CHT varie en fonction des paramètres de l'origine et du traitement<sup>(154,164,168,170)</sup>.



**Figure 25.** Le chitosane (CHT): **(A)** Sa structure à partir de la désacétylation de la chitine et **(B)** représentation schématique du CHT sous différentes structures<sup>(160,171,172)</sup>.

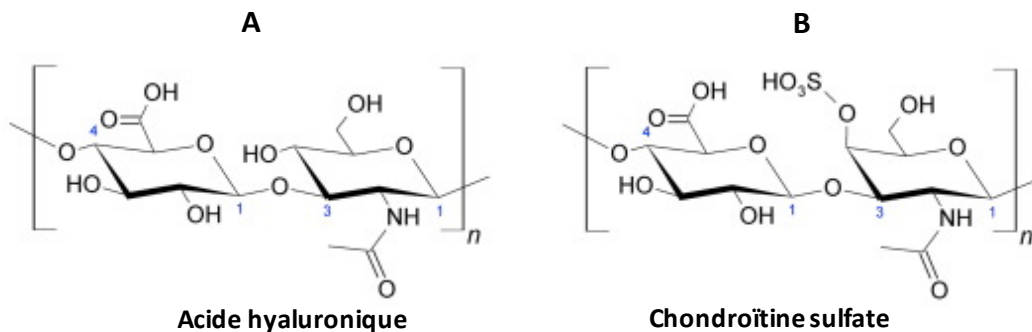
#### 3.2. Propriétés chimiques et biologiques du CHT

Le CHT possède des propriétés chimiques et biologiques particulières en raison de sa structure chimique. Le CHT n'est soluble que dans les solutions ayant un pH égal ou inférieur à 6,5. Lors de la solubilisation, les groupes amine libres ( $-NH_2$ ) sont protonés pour former des

groupes ammonium ( $-\text{NH}_3^+$ ) et le CHT devient un polyélectrolyte cationique, ce qui est une caractéristique unique pour les polysaccharides<sup>(167,168,170)</sup>. De plus, l'ensemble des fonctions amines ( $-\text{NH}_2$ ) et hydroxyles ( $-\text{OH}$ ) permettent au CHT d'interagir avec d'autres polymères et molécules biologiques<sup>(160,164,166)</sup>. Les propriétés physicochimiques du CHT lui permettent d'être mis sous forme de microsphères<sup>(173)</sup>, d'hydrogels<sup>(174,175)</sup>, de nanofibres<sup>(176)</sup>, ou d'éponges<sup>(177,178)</sup> (Figure 25B).

Le CHT est un polymère biodégradable dans le corps humain notamment par différentes enzymes qui hydrolysent ses liaisons glycosidiques<sup>(156,179)</sup>. Parmi elles, le lysozyme est la principale enzyme qui dégrade le CHT<sup>(156,179,180)</sup> et il se trouve en abondance dans le corps humain (1 – 14  $\mu\text{g}/\text{mL}$  dans le sérum<sup>(181)</sup>). Le CHT est donc dégradé en oligosaccharides non-toxiques qui sont ensuite assimilés ou éliminés via les voies métaboliques<sup>(156)</sup>.

Comme illustré dans la Figure 26, la structure du CHT est très proche de celle des glycosaminoglycane (GAG) de la MEC<sup>(182)</sup> et donc possède diverses activités biologiques. Les GAGs sont présents dans le cartilage, l'os et le derme, et comprennent l'héparane sulfate, le dermatane-sulfate, le kératane-sulfate, l'acide hyaluronique (HA) et la chondroïtine sulfate<sup>(183,184)</sup>.



**Figure 26.** Exemples de GAG: structure de (A) l'acide hyluronique (HA) et (B) du chondroïtine sulfate<sup>(184)</sup>.

Par ailleurs, la nature cationique du CHT lui confère des propriétés biologiques particulières comme des propriétés hémostatiques<sup>(185)</sup> et antimicrobiennes<sup>(186)</sup>. De plus, le CHT est un polymère biocompatible qui favorise l'adhésion et la prolifération des cellules ostéoblastes et des cellules mésenchymateuses, la formation d'une matrice osseuse minéralisée *in vitro* et la production de collagène<sup>(154,164,170,187)</sup>. Par conséquent, le CHT est un biomatériau de choix pour être utilisé en tant que support à la croissance et à la régénération de tissus osseux<sup>(154)</sup>.

### 3.3. Influence du DD et de la masse molaire dans les propriétés du CHT

En raison de la très grande diversité de sources, des voies d'obtention et des caractéristiques macromoléculaires, chaque lot de CHT présente des propriétés différentes. Ainsi, le degré de désacétylation (DD) et la masse molaire sont les paramètres les plus



importants du CHT et ont une forte influence sur ses propriétés physico-chimiques, sa cristallinité, sa solubilité, et sa dégradation, mais aussi sur sa biocompatibilité<sup>(170,182,188)</sup>. En conséquence, il faut prendre en compte ces deux paramètres dans le choix du CHT pour la fabrication d'un scaffold pour l'IT.

La solubilité du CHT sera plus importante si le DD est plus élevé dû à la protonation des groupes amines ( $-NH_2$ ). Avec un DD plus faible, le CHT devient insoluble dû aux liaisons hydrogènes entre les fonctions hydroxyles, amides, et éthers de la chaîne polymère. D'autre part, si la masse molaire est élevée, le CHT va se solubiliser plus lentement, en raison de sa haute viscosité<sup>(189)</sup>.

Les scaffolds à base de CHT ayant un DD plus élevé ont montré des propriétés biologiques plus intéressantes concernant la prolifération et l'adhésion cellulaire. Par exemple, les films de CHT avec un DD élevé ont démontré une augmentation de l'adhésion cellulaire de kératinocytes et fibroblastes<sup>(190)</sup>. Cette tendance a également été démontrée dans des éponges de CHT avec un DD supérieur à 85% où la prolifération de fibroblastes a été améliorée<sup>(191)</sup>.

La dégradation du CHT dépend de sa cristallinité, de son DD et de sa masse molaire. Avec un DD élevé, le CHT devient plus cristallin, et donc la propriété de gonflement est diminuée<sup>(182,192-194)</sup>. D'autre part, le CHT avec un DD plus faible montre une structure amorphe laquelle a une plus grande capacité de gonflement (absorption d'eau). Ce phénomène favorise la pénétration des enzymes et donc une dégradation plus rapide<sup>(182,192-194)</sup>. Seda Tigli *et al.*<sup>(191)</sup> ont démontré que les éponges à base de CHT avec un DD supérieur à 85% montrent une dégradation plus lente en comparaison aux éponges de CHT d'un DD plus faible<sup>(191)</sup>. En revanche, une masse molaire élevée du CHT entraîne un taux de gonflement plus faible ce qui ralentit la dégradation<sup>(170,193)</sup>.

Le CHT présente aussi une activité immunostimulatrice sur les cellules immunitaires pour la libération des biomolécules (e.g. cytokines, FC, etc.) pro et antiinflammatoires ; ce qui montre un impact significatif sur l'application des biomatériaux à base de CHT. Ainsi, un DD élevé induit une réponse inflammatoire négligeable en raison de son faible taux de dégradation, tandis qu'un CHT de DD faible peut favoriser une réponse inflammatoire forte à cause de sa dégradation plus rapide<sup>(195)</sup>.

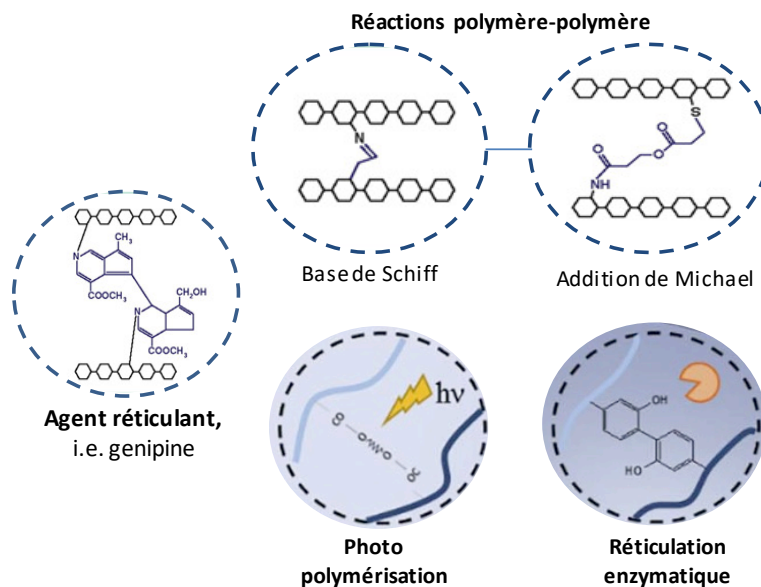
Toutes les variabilités mentionnées ci-dessus soulignent qu'il est impératif de caractériser complètement (surtout le DD et la masse molaire) le CHT destiné à être utilisé dans des études biologiques. Au regard des résultats dans la littérature, le CHT à utiliser devrait avoir un DD supérieur à 85% et une masse molaire moyenne.

### 3.4. Formation d'hydrogels à base de CHT

Les hydrogels à base de CHT peuvent être classifiés selon la méthode de réticulation, *c.à.d.* les hydrogels chimiques, formés à partir des liaisons covalentes et irréversibles ; et les hydrogels physiques, formés à partir des liaisons faibles et réversibles. Ces deux types d'hydrogels seront développés ci-dessous en se focalisant plus sur les hydrogels physiques.

#### 3.4.1. Les hydrogels chimiques du CHT

L'obtention des hydrogels chimiques du CHT est basée sur l'implication des groupes amine ( $-NH_2$ ) et hydroxyles ( $-OH$ ) en formant différentes liaisons amide et/ou ester<sup>(156,179)</sup>. Selon Bhattarai *et al.*<sup>(106)</sup>, les hydrogels chimiques de CHT peuvent être obtenus par 4 voies : (1) en utilisant les agents réticulants, tels que glutaraldéhyde<sup>(196)</sup>, le formaldéhyde<sup>(197)</sup> et la génipine<sup>(198)</sup> ; (2) par réactions polymère-polymère entre des groupes fonctionnels activés, *e.g.* la formation d'une base de Schiff<sup>(199)</sup> et l'addition de Michael<sup>(200)</sup> ; (3) en utilisant des agents photosensibles et (4) par réactions catalysées par des enzymes comme la peroxydase<sup>(201)</sup>.



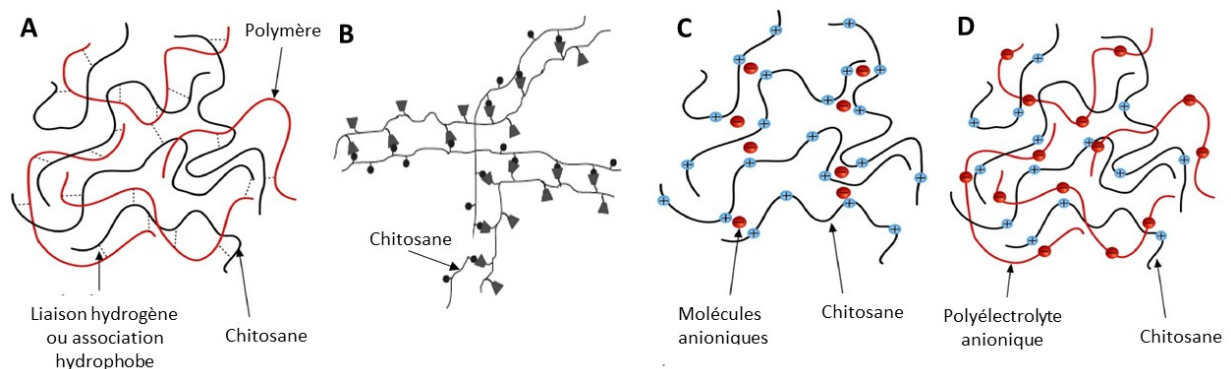
**Figure 27.** Schéma illustrant les 4 voies de réticulation chimique du CHT. Adapté de Bhattarai *et al.*<sup>(106)</sup> et Flégeau *et al.*<sup>(153)</sup>.

Bien que les hydrogels chimiques aient une meilleure stabilité et résistance mécanique, et une réticulation contrôlée<sup>(159)</sup>, ils montrent des inconvénients. D'un côté, les agents réticulants peuvent apporter une certaine toxicité à l'hydrogel, surtout s'il y a des résidus qui n'ont pas réagi avec le CHT<sup>(156,202)</sup>. Concernant les autres voies, le CHT doit subir des modifications chimiques supplémentaires et des étapes de purification<sup>(106)</sup>.

#### 3.4.2. Les hydrogels physiques du CHT

Pour les hydrogels physiques du CHT, l'absence d'agents réticulants dans la formation de l'hydrogels leur assure une meilleure cytocompatibilité<sup>(132)</sup>. Par la suite, les principaux

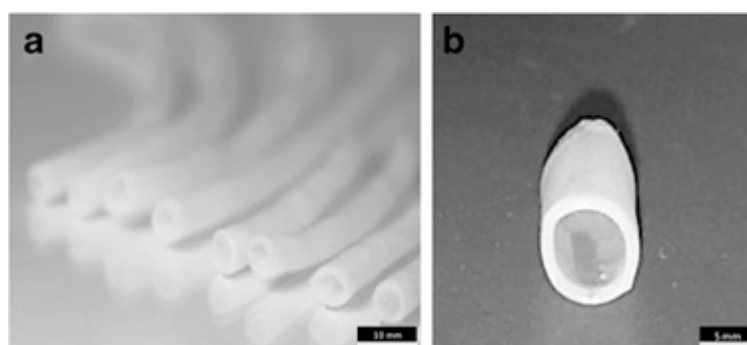
mécanismes de formation des hydrogels physiques seront discutés ci-dessous (Figure 28), avec une préférence pour l'approche de complexes polyélectrolytes (PEC) en raison de leurs propriétés physicochimiques et biologiques intéressantes.



**Figure 28.** Représentation schématique des stratégies de réticulation physique du CHT. (A) Réticulation par interactions hydrophobes, (B) Formation de structures supramoléculaires (C) Réticulation ionique par molécules anioniques et (D) formation d'un complexe polyélectrolytes. Adapté de Pella *et al.*<sup>(203)</sup> et Racine *et al.*<sup>(159)</sup>.

#### 3.4.2.1. Réticulation via des liaisons hydrophobes

Il est possible de former un hydrogel de CHT sans aucun additif. Pour cela, la solution de CHT doit être neutralisée, afin de diminuer la densité de charges, donc de réduire les phénomènes de répulsion électrostatique intra-chaînes, et de permettre l'association des chaînes via des interactions hydrophobes, des liaisons hydrogènes et la formation de clusters formés de cristallites de CHT<sup>(156,159,179)</sup>. Montembault *et al.*<sup>(204)</sup> ont décrit la gélification d'une solution de CHT en milieu hydro-alcoolique. Une solution aqueuse de CHT a été mise en contact avec un volume équivalent de 1,2-propanediol, la solution commence à s'évaporer et la constante diélectrique est réduite favorisant ainsi les interactions hydrophobes et les liaisons hydrogène<sup>(204)</sup>. Cette approche a été appliquée pour l'élaboration de vaisseaux vasculaires<sup>(205)</sup> avec des résultats encourageants. Aussel *et al.*<sup>(205)</sup> ont ainsi démontré la formation de tubes à partir d'une solution hydro-alcoolique de CHT à des concentrations de 5% et 10% avec une résistance mécanique permettant de résister aux contraintes physiologiques<sup>(205)</sup>.

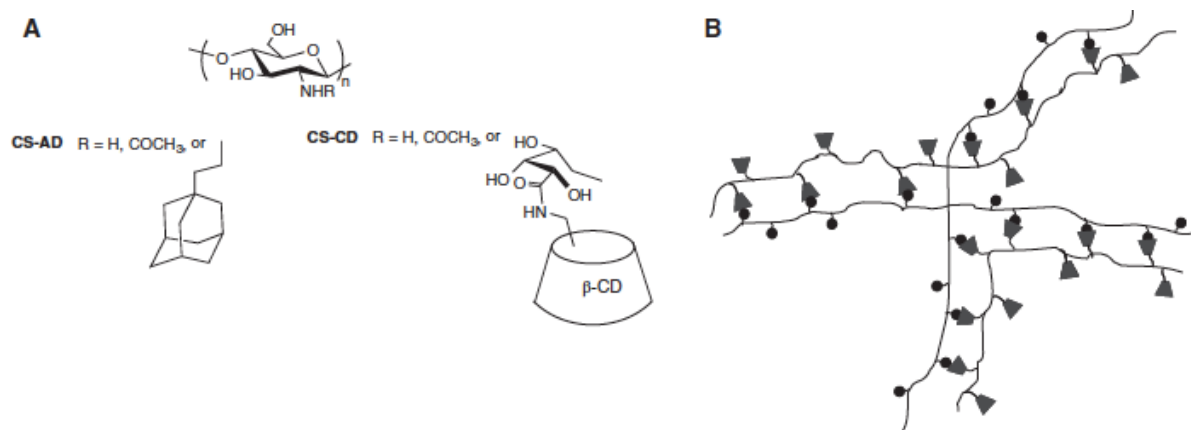


**Figure 29.** Production de tubes d'hydrogels physiques à partir d'une solution hydro-alcoolique du CHT développé par Aussel *et al.*<sup>(205)</sup>. Aspect macroscopique des tubes de chitosane à la concentration de (a) 5% et (b) 10%.

D'autres méthodes rapportées pour la formation d'hydrogels de CHT comprennent la mise en contact d'une solution de CHT avec l'ammoniac gazeux<sup>(206)</sup> ou avec une solution de NaOH<sup>(207)</sup>. Bien que ces techniques démontrent plusieurs avantages pour leur utilisation biomédicale, la biocompatibilité du matériau finale est fortement dépendant du processus de rinçage pour enlever les traces d'ammoniaque.

#### 3.4.2.2. Réticulation par interactions supramoléculaires

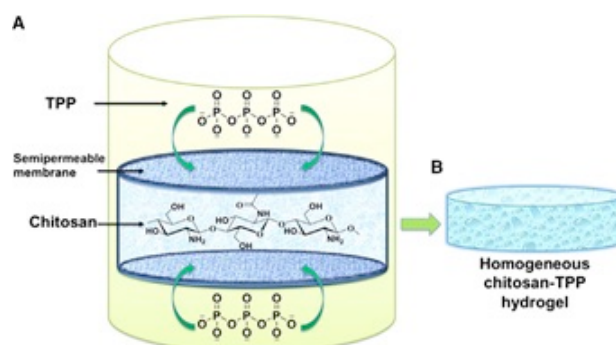
Une autre stratégie est la formation de structures supramoléculaires à partir des interactions « hôte-invitée » (complexe d'inclusion), en utilisant les cyclodextrines (CDs) comme molécules « hôtes ». Ce type d'hydrogels est intéressant car ils sont injectables<sup>(159)</sup>. Auzély-Velty et Rinaudo<sup>(208)</sup> ont décrit pour la première fois la formation des hydrogels supramoléculaires de CHT. Les molécules de  $\beta$ -cyclodextrine (hôte) et d'adamantane (invitée) ont été respectivement greffés tout au long de la chaîne du CHT (Figure 30A). Pour la formation de l'hydrogel, deux solutions séparées du CHT (avec chaque greffage) ont été mélangées, et un hydrogel a été formé instantanément (Figure 30B)<sup>(208)</sup>. Un inconvénient de cette technique est l'étape supplémentaire dont la modification préalable du CHT pour parvenir à former des réseaux supramoléculaires.



**Figure 30.** (A) Structure de CHT modifiée avec la cyclodextrine (CD) et l'adamantane (AD). (B) Représentation schématique de brins à double chaîne reliés par quatre points de jonction constituant un réseau réversible « hôte – invitée » à partir des dérivés de CS<sup>(159)</sup>.

#### 3.4.2.3. Réticulation ionique

Le caractère cationique du CHT lui permet de former des hydrogels par l'interaction ionique avec les molécules anioniques tels que les ions phosphates, sulfates et citrates, ainsi qu'avec les ions métalliques comme le Mo(VI), Pt(II) et Pd(II)<sup>(159,179)</sup>. Dans le groupe de citrates, l'acide citrique a été utilisé en tant qu'agent réticulant avec le CHT<sup>(209,210)</sup>. Parmi les agents réticulants phosphatés, les plus répandus sont le  $\beta$ -glycérophosphate (thermo-sensitif) et le triphosphosphate (TPP). A titre d'exemple, Sacco *et al.*<sup>(211)</sup> ont montré la formation des hydrogels macroscopiques et homogènes en utilisant CHT et TPP dans un système à dialyse (Figure 31)<sup>(211)</sup>.

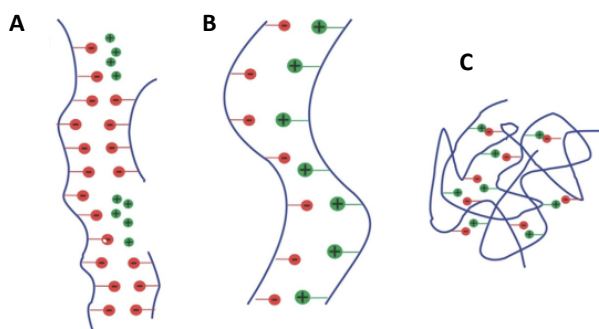


**Figure 31.** Montage expérimental pour développer des hydrogels homogènes CHT – TPP en utilisant la technique de dialyse étudié par Sacco *et al.*<sup>(211)</sup>. **(A)** La solution de CHT est placée dans une membrane semipermeable en contact avec une solution de TPP sous conditions d'agitation. Pendant la dialyse, les ions TPP diffusent à travers les membranes et **(B)** après 24 h, la solution visqueuse s'est transformée en un hydrogel homogène par gélification ionotrope.

La formation d'hydrogels par réticulation ionique est dépendante de plusieurs facteurs comme la densité de charge et la taille des agents anioniques, mais aussi de la concentration du CHT et de sa charge cationique dépendant de son DD et du pH<sup>(179)</sup>. De même, les interactions ioniques fortes ont permis de conférer à l'hydrogel une stabilité en milieu physiologique<sup>(159)</sup>.

#### 3.4.2.4. Hydrogels à base de complexes polyélectrolytes

Le complexe polyélectrolyte (PEC) est formé à partir du mélange en solution de deux polyélectrolytes (polymères ioniques) de charges opposées (polyanion et polycation) (Figure 28D). Un PEC est obtenu grâce aux interactions électrostatiques (réversibles) entre les polyélectrolytes, ainsi qu'aux liaisons hydrogènes et hydrophobes<sup>(212–214)</sup>. Meka *et al.* (212) propose deux types de modèles structuraux de PEC : le modèle non stœchiométrique soluble dans l'eau (rapport de groupes fonctionnels cationiques / anioniques est <1 ou >1) et le modèle stœchiométrique insoluble (mélange de PE en rapport 1:1 avec des groupes ioniques forts)<sup>(212)</sup>. Le dernier est sous-classé en structures semblables à une échelle (chaines polymères ordonnées) et « scrambled-eggs » (chaines polymères désorganisées)(Figure 32)<sup>(212,215)</sup>.



**Figure 32.** Modèles structuraux du complexe polyélectrolyte (PEC). **(A)** Complexes non stœchiométriques, **(B)** Complexes stœchiométriques : modèle en échelle et **(C)** complexes stœchiométriques : modèle « scrambled-eggs ». Adapté de Meka *et al.* <sup>(212)</sup>.

Les hydrogels obtenus par formation de PEC sont cytotocompatibles<sup>(213)</sup> et présentent des caractéristiques de gonflement intéressantes<sup>(214)</sup>. La stabilité du PEC est contrôlée par différents paramètres liés aux polymères tels que la masse molaire, la concentration, la densité de charge et le rapport de charge ; ainsi que par des paramètres physicochimiques notamment les propriétés du solvant (polarité), la température et le pH<sup>(202,213)</sup>.

En raison du caractère cationique du CHT en solution, il est capable de former des PEC avec différents polymères anioniques, naturels ou synthétiques<sup>(202,214)</sup>. Parmi eux, la formation de PEC avec des polyélectrolytes naturels ont attiré notre attention pour leur utilisation en tant que systèmes d'administration de principes actifs et comme scaffolds pour l'ITO<sup>(213,214)</sup>. Le Tableau 10 présente des exemples d'hydrogels formés à partir du PEC entre le CHT et les polymères anioniques naturels.

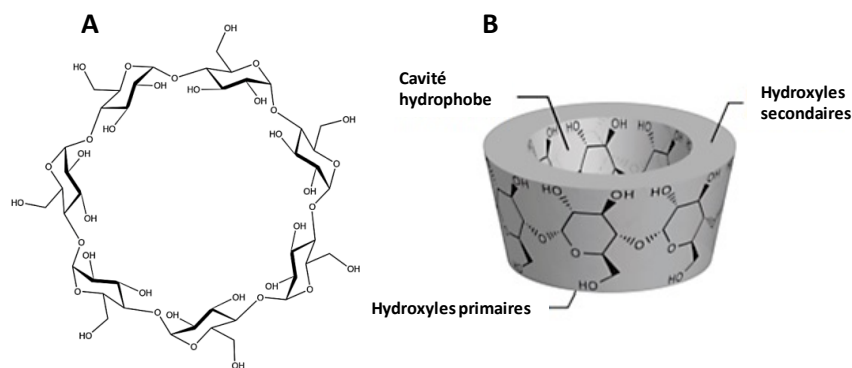
**Tableau 10.** Hydrogels à base de PEC du CHT et polymères naturels anioniques.

<i>Polyélectrolyte cationique</i>	<i>Polyélectrolyte anionique</i>	<i>Réf.</i>
<b>Chitosane (CHT)</b>	Gélatine	(216)
	Polyglutamate	(217,218)
	Alginates	(219–221)
	Acide hyaluronique	(222,223)
	Carboxyméthylcellulose	(224)
	Pectine	(225,226)
	Gomme de gellane	(227)
	Carraghénane	(228,229)
	Xanthane	(230,231)

### 3.5. Formation de complexes polyélectrolytes à base de CHT et de polymères de cyclodextrine anioniques

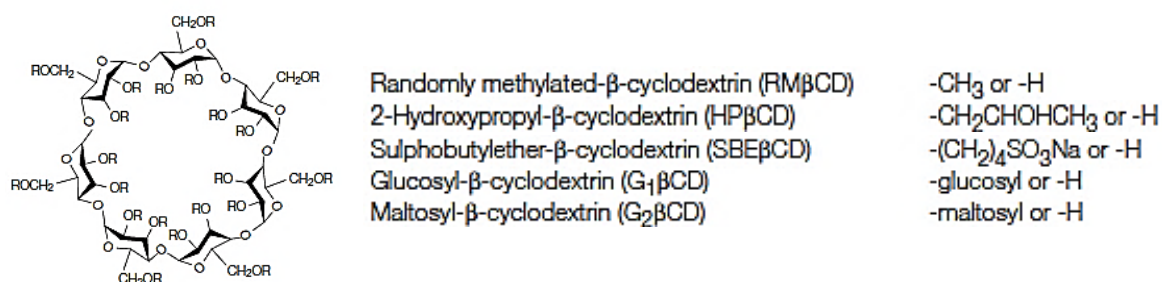
#### 3.5.1. Les cyclodextrines

Les cyclodextrines (CD) sont des oligosaccharides synthétiques cycliques constitués des unités anhydroglucopyranoses liées par des liaisons  $\alpha$ -1,4 glycosidiques, obtenues à partir de la dégradation enzymatique de l'amidon. Les  $\alpha$ -,  $\beta$ -, et  $\gamma$ -CD sont les cyclodextrines les plus courantes, composées de 6, 7, et 8 unités de glucose, respectivement<sup>(232,233)</sup>. Les CDs appartiennent à la famille des molécules cages car leur structure se compose d'une cavité hydrophobe (Figure 33B) qui peut piéger ou encapsuler des molécules et principes actifs. Les propriétés d'encapsulation conduisent donc à la formation d'un complexe d'inclusion « hôte-invité »<sup>(232)</sup>. Les CD sont notamment utilisées dans le domaine pharmaceutique pour améliorer la biodisponibilité des principes actifs, vectoriser des médicaments et prolonger leur libération<sup>(234)</sup>.



**Figure 33.** Représentation schématique de la  $\beta$ -CD. **(A)** La structure chimique de la  $\beta$ -CD et **(B)** l'architecture de la  $\beta$ -CD sous la forme de « tore » ayant une cavité hydrophobe qui peut former des complexes d'inclusion. Adapté de Crini<sup>(235)</sup>.

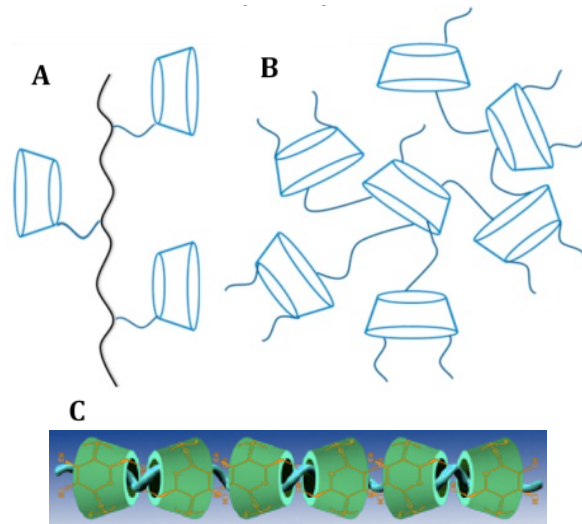
Afin d'obtenir des propriétés spécifiques, les CDs sont modifiés chimiquement de par ses groupes hydroxyles avec différents motifs, et celles-ci sont appelées CD dérivées. Par exemple, l'hydroxypropyl- $\beta$ -CD (HP $\beta$ CD) présente une solubilité dans l'eau supérieure à celle de la  $\beta$ -CD native (1,8 g/100 mL à 20°C)<sup>(236)</sup>. La Figure 34 montre les CD dérivées les plus représentatifs.



**Figure 34.** La  $\beta$ -cyclodextrine et de ses dérivés relevant du domaine pharmaceutique. Adapté de Davis et Brewster<sup>(236)</sup>.

### 3.5.2. Les polymères de cyclodextrine

Les polymères de cyclodextrine sont des structures comprises de molécules de CDs qui sont liées de manière covalente dans la chaîne principale ou conjuguées en tant que groupes latérales des polymères<sup>(232)</sup>. Les polymères de cyclodextrines présentent trois types de structures<sup>(236)</sup>: les polyrotaxanes, les polymères linéaires et les polymères réticulés (Figure 35).



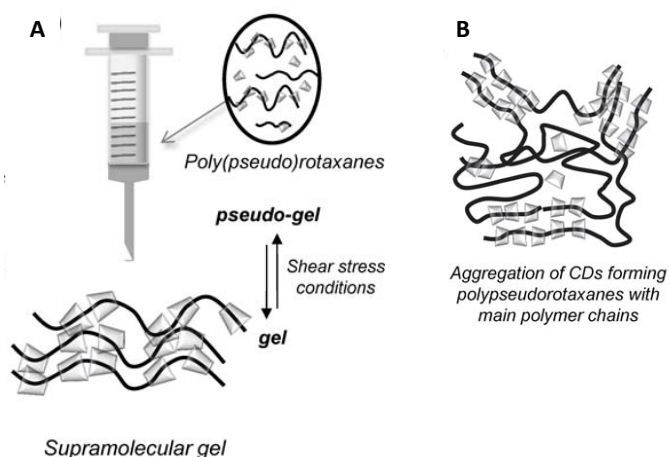
**Figure 35.** Schéma illustrant les différents réseaux de polymères de CD. **(A)** Les polymères linéaires, **(B)** les polymères réticulés et **(C)** les polyrotaxanes. Adapte de Zhang et Ma<sup>(232)</sup> et de Folch-Cano et al.<sup>(237)</sup>.

Les polymères de cyclodextrine réticulés sont obtenus à partir de la réaction entre le CD et des agents réticulants comme les dialdéhydes, les diisocyanates et l'épichlorhydrine<sup>(236)</sup>. Également, il est possible d'obtenir des polymères de cyclodextrines ioniques (cationiques ou anioniques). Un exemple de polymère cationique, est le polymère de cyclodextrine obtenu avec l'épichlorhydrine en présence d'un agent substituant comme le chlorure de choline<sup>(238)</sup> ou le chlorure de glycidyltriméthylammonium (GTMAC)<sup>(239)</sup>. Nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux polymères de cyclodextrine anioniques afin de les utiliser avec le CHT (polymère cationique) dans la formation de PEC.

### 3.5.3. Hydrogels injectables à base de polymères de cyclodextrines

Parmi les applications des polymères de cyclodextrines, ils peuvent former des hydrogels injectables comme a été décrit par Simoes *et al.*<sup>(240)</sup>. Dans leur travail, ils ont rapporté la formation d'un hydrogel « seringeable » fait à partir de pseudo-polyrotaxanes à base de PEO-PPO et de cyclodextrines. Les CD s'enfilent sur les chaînes latérales de copolymères pour créer de polypseudorotaxanes, puis ceux-ci forment un hydrogel via un auto-assemblage (Figure 36). Les chaînes de l'hydrogel peuvent être dissociées sur certaines contraintes et elles peuvent se réformer, présentant une thixotropie qui permet l'écoulement à travers la seringue et la récupération du gel dans le site d'implantation<sup>(240)</sup>.

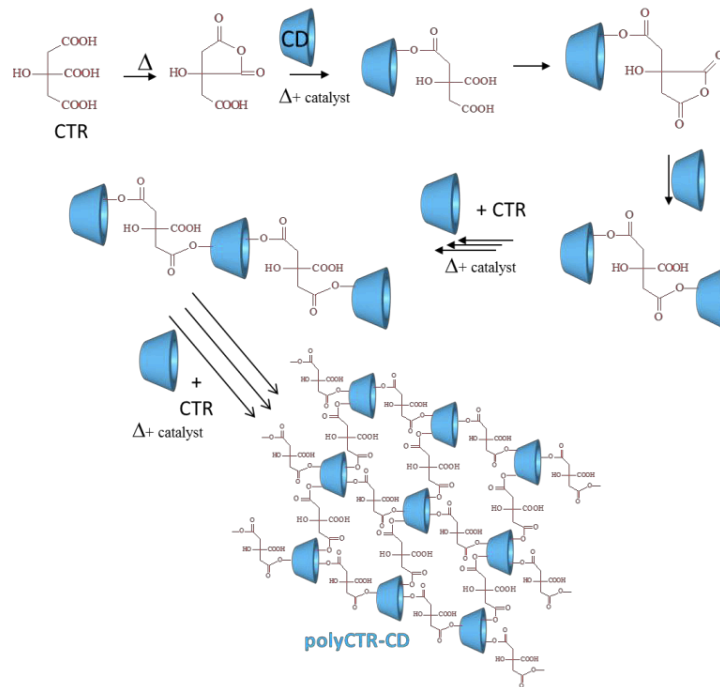




**Figure 36.** Hydrogel injectable à base de pseudo-polyrotaxane rapporté par Simoes *et al.*<sup>(240)</sup>. **(A)** Schéma de la stratégie utilisé et **(B)** Illustration de l'hydrogel de cyclodextrine auto-assemblé.

### 3.5.4. Le polymère de cyclodextrine réticulé par l'acide citrique

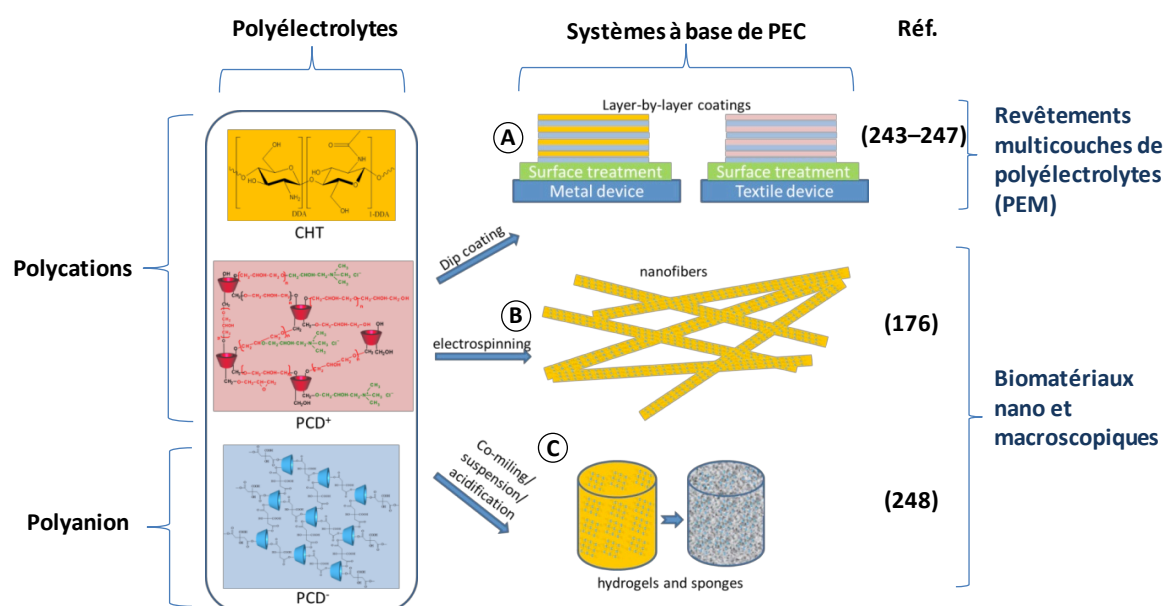
Le polymère de cyclodextrine anionique (PCD) utilisé pour nos travaux de thèse a été développé par Martel *et al.*<sup>(241)</sup> au sein du laboratoire UMET à l'Université de Lille. Ce polymère est obtenu à partir d'une réaction de polymérisation entre l'acide citrique (agent de réticulation) et la  $\beta$ -CD (Figure 37). Lors du processus, le mécanisme de polyestérification a lieu entre les groupes hydroxyles de la CD et les groupes carboxyliques de l'acide citrique, qui produisent finalement le PCD avec un caractère anionique. A partir de cette réaction, le PCD soluble dans l'eau (PCDs) et le PCD insoluble dans l'eau (PCDi) sont obtenus en fonction du degré d'avancement de la réaction de polymérisation<sup>(241)</sup>. Le PCDs montre une structure moléculaire hyperbranchée qui est hautement soluble dans l'eau et une masse molaire entre 5 000 et 30 000 g/mol selon le temps de polymérisation. Le PCDi est isolé pour des temps de polymérisation supérieures et présente une structure réticulée, insoluble mais qui présente des taux de gonflement dans l'eau d'environ 200%<sup>(241,242)</sup>. Le PCDs et le PCDi présentent un taux de fonctions carboxylate d'environ 4 mmol/g.



**Figure 37.** Réaction de polymérisation entre l'acide citrique et le CDs afin d'obtenir le PCD anionique.

### 3.5.5. Systèmes de CHT-PCD – Travaux antérieurs du laboratoire

Notre équipe a développé plusieurs applications basées sur les mélanges CHT-PCDs comme illustré dans la Figure 38. La première approche concerne la formation des revêtements multicouches par la technique « layer-by-layer » (LbL) (Figure 38A). Dans un premier temps, le revêtement LbL a été déposé sur des textiles pour la libération de principes actifs. Martin *et al.*<sup>(243)</sup> ont recouvert un support textile en polyéthylène téréphtalate (PET) avec 20 couches de deux polyélectrolytes CHT-PCDs et a révélé leur potentiel pour la délivrance de médicaments en utilisant une molécule modèle, comme l'acide 4-tert-butylbenzoic (TBBA)<sup>(243)</sup> ou le bleu de méthylène<sup>(244)</sup>. Cette technique a été utilisée pour une application dans les pansements. Mogrovejo-Valdivia *et al.*<sup>(245)</sup> ont montré que le revêtement multicouches CHT-PCDs limitait la diffusion de l'argent sans perdre son effet antibactérien<sup>(245)</sup>. D'un autre côté, Junthip *et al.*<sup>(246)</sup> ont formé un assemblage LbL à base de PCD anionique et cationique (fonctionnalisé par des groupes ammonium)<sup>(246)</sup>. Pérez-Anes *et al.*<sup>(247)</sup> ont modifié une surface métallique en titane par un assemblage LbL de 30 couches de CHT-PCDs pour la libération prolongée de gentamicine<sup>(247)</sup>.



**Figure 38.** Schéma illustrant les systèmes CHT-PCDs étudiés au sein du laboratoire. (A) Système multicouches, (B) Nanofibres et (C) Hydrogels et éponges.

La deuxième approche a été la formation de nanofibres électrofilées de CHT-PCDs (Figure 38B). Ouerghemmi *et al.*<sup>(176)</sup> ont élaboré des nanofibres monolithiques et « core-shell » par electrospinning à base du mélange CHT-PCD pour la libération prolongée de triclosane<sup>(176)</sup>. Actuellement, ces nanofibres sont étudiés dans un projet de thèse pour former des revêtements sur stents pour la libération prolongée de simvastatine.

Plus récemment, la formation d'hydrogels et d'éponges (Figure 38C) a été étudiée dans le travail de thèse de Dr. Claudia Flores<sup>(38)</sup>. Son étude a été basée sur la formation d'hydrogel physique en évaluant les processus de préparation, la granulométrie des composants (*c.à.d.* le CHT et le PCDs) et les ratios CHT:PCDs à utiliser. Une étape importante dans cette stratégie a été le mélange des composants à sec par cobroyage avant la formation d'un hydrogel. Les éponges obtenues ont été imprégnées de ciprofloxacine pour une libération locale. Ce nouveau matériau a le potentiel d'être utilisé dans différentes applications médicales telles que le traitement des plaies<sup>(248)</sup> ou la régénération osseuse. Il convient de souligner que toutes les études précédentes sur le complexe CHT-PCD ont été réalisées uniquement avec un PCD soluble (PCDs). Notre travail va consister à poursuivre et approfondir ces travaux.

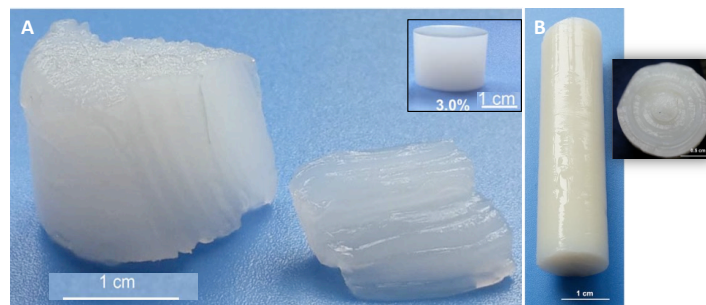
### 3.6. Applications des hydrogels de CHT pour l'ingénierie tissulaire

Dans la littérature, il existe de nombreuses études sur l'utilisation du CHT en tant que scaffold pour l'IT. Différents travaux seront discutés en se focalisant sur les hydrogels injectables et les éponges à base de CHT.

Les hydrogels multi-membranes (structure semblable à l'oignon) de CHT ont été étudiés dans la littérature pour leur utilisation dans le domaine biomédical. A titre d'exemple,

Ladet *et al.*<sup>(249)</sup> ont évalué la bio-activité des hydrogels multi-membranes de CHT obtenus par une solution hydro-alcoolique (sans utilisation d'un agent réticulant externe). Les hydrogels multi-membrane ont été ensemencés avec des chondrocytes de lapin pendant 45 jours. Les résultats ont démontré que les chondrocytes ont proliféré, maintenu leur phénotype et produit des protéines matricielles comme le collagène type II. Enfin, cet hydrogel était capable d'agir comme un bioréacteur pour les chondrocytes<sup>(249)</sup>.

Nie *et al.*<sup>(250)</sup> ont évalué la faisabilité de fabriquer des hydrogels de CHT « hiérarchiques » et sous différentes formes. Ils ont donc préparé les hydrogels multi-membranes de CHT (Figure 39) par coagulation dans un bain de NaOH. Ils ont obtenu 2 types d'hydrogels : un préparé par un moule à ouverture unique (Figure 39A) et l'autre par un moule cylindrique (Figure 39B). Les résultats obtenus ont révélé que l'orientation de chaque membrane a un impact sur les propriétés mécaniques de l'hydrogel. Par conséquent, le sens d'orientation dans les hydrogels « hiérarchiques » joue un rôle très important dans la conception et l'application de l'hydrogel, *e.g.* dans la migration cellulaire<sup>(250)</sup>.

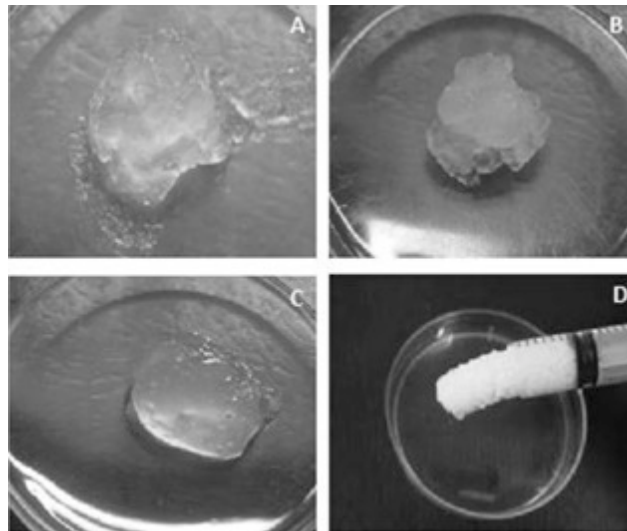


**Figure 39.** Hydrogels multi-membranes à base de CHT rapportés par Nie *et al.*<sup>(250)</sup> (A) Coupe longitudinale de l'hydrogel préparé par un moule à ouverture unique et (B) l'hydrogel préparé par un moule cylindrique, vue d'ensemble et coupe transversale.

Dans le cas des hydrogels injectables de CHT, l'exemple le plus représentatif est l'hydrogel CHT/ $\beta$ -glycérophosphate qui a été rapporté pour la première fois par Chenite *et al.*<sup>(251)</sup>. Il s'agit d'un hydrogel thermosensible qui gélifie à une température de 37°C. Naderi *et al.*<sup>(252)</sup> ont développé un hydrogel injectable thermosensible à base de CHT,  $\beta$ -glycérophosphate et hydroxyéthylcellulose. Dans cette recherche, les cellules souches mésenchymateuses (CSM) ont été encapsulées à l'intérieur de l'hydrogel, et une excellente survie cellulaire et prolifération ont été observées. De plus, la délivrance d'insuline recombinante a été étudiée pour une période de 8 jours. Un autre exemple concerne un hydrogel de CHT réticulé chimiquement avec la genipine. Moura *et al.*<sup>(253)</sup> ont démontré la gélification *in situ* d'un mélange de CHT et de genipine. L'injection *in vivo* a montré une gélification rapide *in situ* et l'hydrogel formé restait en place pendant au moins une semaine<sup>(253)</sup>. Liu et Yao ont développé un système d'auto-assemblage supramoléculaire en utilisant le copolymère Pluronic® et le CHT pour d'abord former des micelles, l'ajout de  $\alpha$ -CD

au mélange permet la formation d'un hydrogel supramoléculaires injectables à température ambiante<sup>(254)</sup>.

Dans le domaine de l'ITO, les hydrogels injectables du CHT ont été évalués dans différentes recherches pour combler les défauts osseux qui ne nécessitent pas une résistance mécanique élevée<sup>(33,112,132,255)</sup>. Ils sont également utilisés pour renforcer le tissu osseux lésé<sup>(132)</sup>. Les hydrogels injectables de CHT sont aussi utilisés avec des biocéramiques (hydrogel composites) pour améliorer leur résistance mécanique et leur bio-activité. Morais *et al.*<sup>(256)</sup> ont comparé différentes formulations d'hydrogels d'alginate, de CHT et d'acide hyaluronique en ajoutant l'hydroxyapatite renforcée avec un bioverre au phosphate (GR-HAp) (Figure 40). Ils ont démontré que tous les hydrogels avaient un caractère rhéofluidifiant et des forces d'extrusion faibles (facile à gérer pour le clinicien)<sup>(256)</sup>.



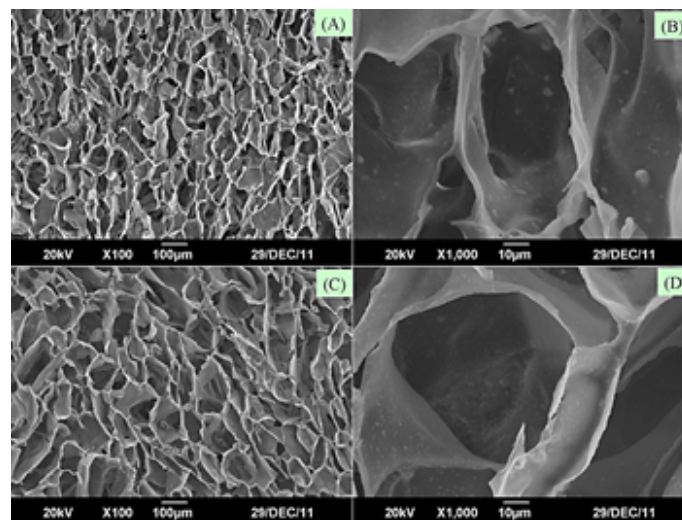
**Figure 40.** Aspect macroscopique des trois hydrogels développés par Morais *et al.*<sup>(256)</sup> : **(A)** hydrogel d'alginate ; **(B)** hydrogel d'alginate/CHT; **(C)** hydrogel d'alginate/acide hyaluronique et **(D)** hydrogel alginate/GR-HAp.

Ressler *et al.*<sup>(257)</sup> ont développé un hydrogel injectable sensible au pH de CHT/HAp à partir d'un procédé de précipitation humide *in situ* suivi d'une réticulation physique à 37°C avec le bicarbonate de sodium. Ils ont démontré que l'hydrogel injectable CHT/HAp a permis la prolifération et la différenciation ostéogénique des CSM après 14 jours de culture<sup>(257)</sup>.

En raison de leurs propriétés, les éponges de CHT peuvent être utilisés pour l'ITO en tant que matériau de comblement osseux avec en plus leur capacité à accueillir des cellules. Seol *et al.*<sup>(258)</sup> ont étudié la régénération osseuse *in vitro* en utilisant des éponges de CHT à 3% réticulées par le TPP. Les cellules primaires d'ostéoblastes de souris ont étéensemencées à l'intérieur de l'éponge de CHT, elles ont proliféré et formé des dépôts de calcium pendant les 56 jours de culture. Cette étude a démontré que les éponges de CHT favorisent la prolifération et la différenciation des cellules ostéoblastiques<sup>(258)</sup>.

Les éponges servent aussi de réservoir de principes actifs, tels que les FCs ou les petites molécules, pour une libération contrôlée. De la Riva *et al.*<sup>(94)</sup> ont développé une éponge de CHT/Alginate/PLA-H pour la libération de VEGF, où le FC a été incorporé dans des microsphères lors de la préparation du scaffold. La libération du VEGF a été observée pendant 5 semaines<sup>(94)</sup>.

Afin d'augmenter la propriété ostéoconductive du CHT et d'améliorer ses propriétés mécaniques, les éponges composites peuvent être également conçues en ajoutant des biocéramiques tels que l'HAp<sup>(170,259)</sup>. Ces deux composants ont été utilisés ensemble dans plusieurs études où il a été démontré que l'ajout de l'HAp modifie les propriétés de gonflement, augmente les propriétés mécaniques et réduit la vitesse de dégradation<sup>(260,261)</sup>. A titre d'exemple, Lee *et al.*<sup>(262)</sup> ont comparé les propriétés des éponges de CHT avec la micro-HAp et la nano-HAp dans une étude *in vivo*. Les deux scaffolds étaient cytocompatibles et montraient une microstructure poreuse (Figure 41). Les résultats obtenus après 2 semaines d'implantation chez les lapins ont révélé que les éponges CHT/nano-HAp étaient meilleures comparées à celles contenant la micro-HAp<sup>(262)</sup>.



**Figure 41.** Images MEB des éponges CHT/micro-HAp (A et B) et des éponges CHT/nano-HAp (C et D) obtenues par Lee *et al.*<sup>(262)</sup>.

#### **4. Conclusion**

Les hydrogels sont des biomatériaux adaptés pour l'ITO en raison de leur ressemblance avec la MEC et de leur capacité à piéger des principes actifs tels que les petites molécules ou les FC, mais aussi des cellules. En plus, les hydrogels peuvent être utilisés sous différentes formes physiques. Ainsi, les hydrogels injectables et les éponges (hydrogels macroporeuses) nous ont particulièrement intéressés en raison de leur potentiel en chirurgie mini-invasive et comme comblement osseux. Ces deux types d'hydrogels sont soumis à des critères spécifiques comme les propriétés rhéofluidifiantes et autoréparantes pour l'hydrogel injectable ; et l'obtention de scaffolds poreux interconnectés avec des propriétés mécaniques appropriées, pour l'éponge.

Parmi la large gamme de polymères naturels utilisés pour élaborer des hydrogels ou des éponges, le CHT présente des propriétés chimiques et biologiques intéressantes. Ce polysaccharide naturel cationique est capable de former des hydrogels physiques en évitant l'utilisation d'agents réticulants cytotoxiques, en comparaison aux hydrogels chimiques. Particulièrement, la formation d'hydrogels à base de complexes polyélectrolytes (PEC) en combinant le CHT à un deuxième polymère anionique nous est apparue intéressante. Dans les travaux précédents du laboratoire, les polymères de cyclodextrine anioniques hydrosolubles (PCDs) ont montré leur capacité à former des PEC avec le CHT. Des applications en tant que revêtements multicouches, nanofibres et hydrogels ont été développées. Dans ce contexte, nous allons étudier de manière plus approfondie l'obtention des hydrogels CHT/PCD sous sa forme injectable et d'éponge pour une application dans l'ITO.

---

## Synthèse bibliographique, objectifs de la thèse et cahier de charges

---

L'os est un tissu hautement vascularisé qui est constamment renouvelé. Pendant la consolidation ou la réparation osseuse, différentes biomolécules, telles que les facteurs de croissance (FC) ostéogéniques et angiogéniques, ou encore les hormones, sont impliqués. Cependant si l'os présente des défauts osseux importants, sa capacité d'auto-guérison n'est plus assurée. Les greffes naturelles (autogreffes ou allogreffes) sont donc utilisées par les cliniciens. Bien que l'autogreffe soit considérée comme le « gold-standard », la technique présente beaucoup des inconvénients notamment la morbidité au site du donneur et la disponibilité limitée des tissus à utiliser.

Pour surmonter ces inconvénients, différents types de biomatériaux (e.g. biocéramiques, polymères, etc.) sont utilisés. Cependant, le biomatériau seul manque de bio-activité pour stimuler les réponses cellulaires spécifiques. De ce fait, la réparation des défauts osseux en utilisant l'approche de l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) est considérée comme une alternative aux greffes osseuses conventionnelles. La technique d'IT *in vitro* englobe la combinaison de scaffolds (biomatériaux), de cellules et de molécules bioactives. Néanmoins, l'utilisation de cellules *ex vivo* demande des conditions expérimentales spécifiques et entraîne des obstacles techniques, réglementaires et éthiques avant l'implantation chez les patients. Ainsi, l'IT *in situ* peut surmonter ces limites, car elle utilise le corps humain comme bioréacteur. Dans ce cas, les molécules bioactives sont incorporées dans le scaffold, sans utiliser de cellules. Les agents chimiques ou des FCs seront libérés à des vitesses contrôlées lesquels vont activer les cellules en contact. Les cellules produiront donc des FCs supplémentaires, qui stimuleront les différents types de cellules à s'auto-assembler pour former des tissus *in situ*.

Dans ce contexte, les scaffolds ont une grande importance car ils sont capables de fournir un environnement approprié aux cellules. Le scaffold idéal pour l'ITO aura donc les propriétés comme la biocompatibilité, la biodégradabilité et la bio-activité (telles que l'ostéoconductivité et l'ostéoinduction), ainsi qu'une porosité supérieure à 60% et des pores interconnectés de taille entre 150 et 400  $\mu\text{m}$ . Lors du développement de nouveaux scaffolds pour la régénération tissulaire des défauts osseux larges, il faut prendre en compte certaines propriétés tels que la porosité et la rigidité du matériau pour favoriser la vascularisation. Ceci reste encore une des problématiques majeures lors de la régénération de défauts osseux larges.

L'incorporation de signaux biologiques (e.g. les FCs ostéogéniques ou angiogéniques) pour rendre les scaffolds bioactifs reste essentielle. Cette dernière approche a démontré une bio-activité importante lors de la vascularisation *in situ* du scaffold et donc dans la régénération osseuse. A cet effet, le FC angiogénique le plus utilisé est le facteur de croissance de



l'endothélium vasculaire (VEGF) dû à ses propriétés dans la régulation de l'angiogenèse et à sa participation dans plusieurs étapes de la réparation osseuse. Plusieurs études ont mis en évidence la libération continue et la bio-activité pro-angiogenèse du VEGF à partir de différents scaffolds. Une fois de plus, le choix du biomatériau et la technique d'incorporation des FC dans le support devient donc très importante.

Dans ce cadre, les hydrogels sont des biomatériaux de choix pour la réparation osseuse. Non seulement pour leurs propriétés (*c.à.d.* ressemblance à la MEC, support pour les cellules, véhicule pour la délivrance des biomolécules, *etc.*), mais aussi par leur capacité d'être utilisés sous différentes formes physiques, par exemple les hydrogels injectables et les éponges (hydrogels macroporeux), en fonction des caractéristiques du défaut osseux (taille, emplacement, *etc.*). Les hydrogels injectables sont devenus très intéressants car ils sont utilisés pour la chirurgie mini-invasive, pour combler des défauts relativement petits et irréguliers, et renforcer le tissu osseux lésé. Les exigences pour l'application des hydrogels préformés restent sur leurs propriétés rhéofluidifiante et autoréparante. D'un autre côté, les hydrogels peuvent être transformés en éponges par différentes méthodes dont la lyophilisation. Les éponges sont souples et flexibles mais plus stables mécaniquement qu'un hydrogel ; et elles sont capables de combler des défauts osseux relativement larges pour lesquelles il est nécessaire d'avoir une porosité et des propriétés mécaniques adaptées. Les deux structures permettent le chargement et la délivrance de FCs ou de médicaments et agissent directement pour soutenir le développement et la différenciation des cellules dans les tissus nouvellement formés. Les hydrogels peuvent être classifiés selon différents critères tels que la nature des polymères utilisés, la méthode de réticulation, *etc.* C'est vers les hydrogels à base de polymères naturels que nous nous sommes orientés en raison de leur biocompatibilité. Parmi eux, le chitosane (CHT) a été largement étudié en raison de ses propriétés physicochimiques (maniable pour produire une variété de structures) et biologiques (biocompatibilité, bio-activité, biodégradabilité, *etc.*) intéressantes.

Le CHT, un polysaccharide cationique obtenu de la chitine, est très adapté pour la formation d'hydrogels. Les paramètres de masse molaire et de degré de désacétylation (DD) impactent directement les propriétés du CHT. Les hydrogels à base de CHT peuvent être obtenus par réticulation chimique ou physique. Le caractère cationique de CHT lui permet de former des hydrogels physiques par complexes polyélectrolytes (PEC) avec d'autres polymères synthétiques ou naturels anioniques. Ceci permet d'éviter l'utilisation d'agents réticulants chimiques, et assurer une meilleure biocompatibilité pour l'application médicale. Les polymères de cyclodextrine anioniques (PCD) obtenus à partir de la réticulation de la CD et l'acide citrique ont été sujet à différentes études au sein du laboratoire. Lors de la synthèse, deux polymères sont obtenus : le PCD soluble (PCDs) et le PCD insoluble (PCDi) dans l'eau,

ayant différentes propriétés physicochimiques, mais la même structure chimique. En raison de son caractère anionique, le PCDs a été utilisé pour la formation de systèmes de CHT-PCD comme la formation de revêtements multicouches (« layer-by-layer ») sur des textiles et des supports métalliques, l'obtention de nanofibres par électrospinning et la formation des hydrogels.

### **1. Objectifs de la thèse**

Dans ce contexte, l'objectif principal de ce projet de thèse est de développer et de caractériser des matériaux destinés à servir de scaffolds pour le comblement et la régénération osseuse. Ainsi, deux matériaux seront mis au point : le premier sera sous la forme d'éponge (hydrogel macroporeux) pour le remplacement de défauts osseux larges nécessitant une vascularisation et le deuxième sous la forme d'hydrogel injectable pour le comblement de petit défauts osseux en chirurgie mini invasive. Ces deux matériaux seront obtenus par le mélange de chitosane (CHT, cationique), et de polymère de cyclodextrine (PCD, anionique), formant des complexes polyélectrolytes (PEC) (Figure 42).

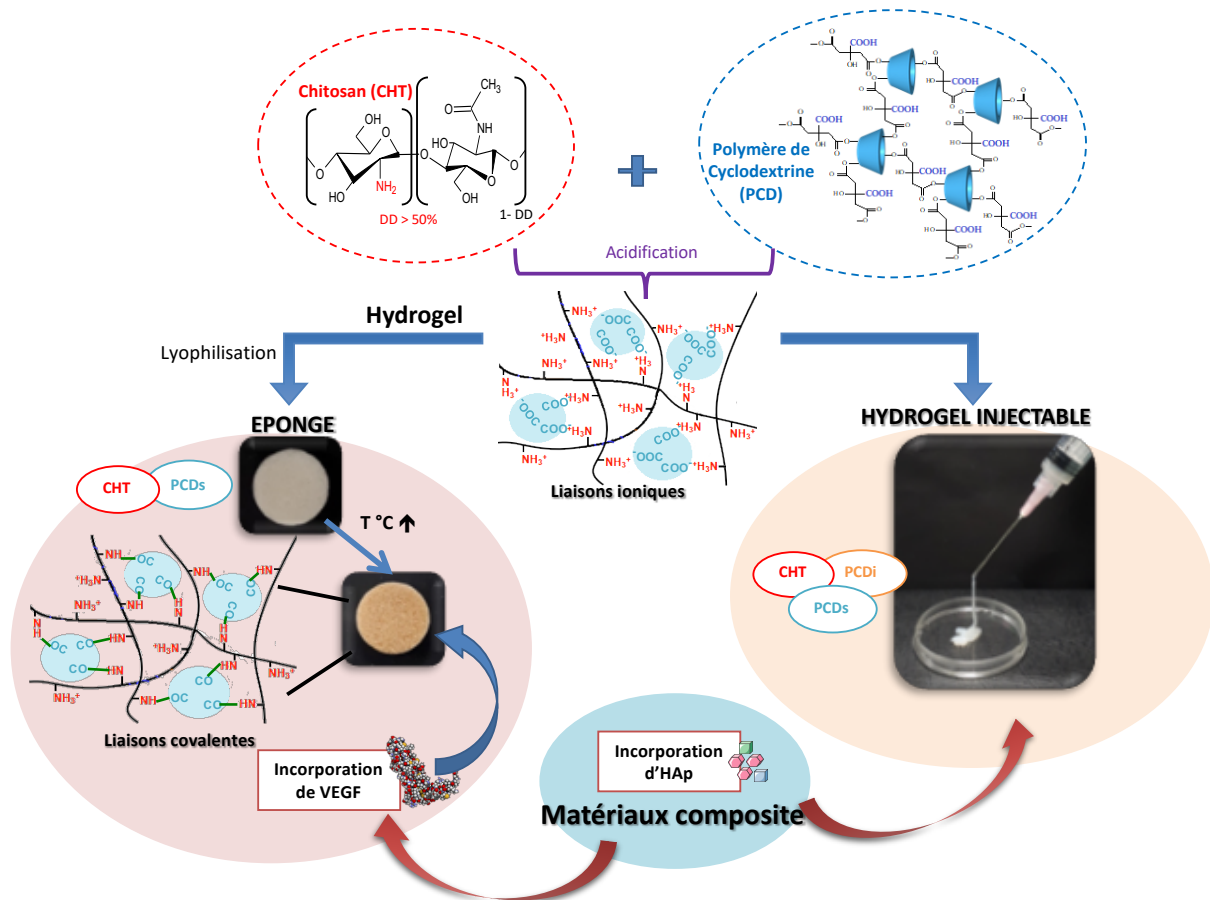
Le premier volet de cette thèse sera consacré à l'obtention des éponges par lyophilisation des hydrogels CHT/PCDs. Les éponges seront optimisées et caractérisées par leurs propriétés physicochimiques et mécaniques, et par leur microstructure. La cytocompatibilité de l'éponge sélectionnée sera ensuite évaluée avec des cellules pré-ostéoblastes et endothéliales. De plus, la problématique de la vascularisation des scaffolds qui constitue une des limites des stratégies de ITO classique sera abordée en incorporant le VEGF dans l'éponge. La libération *in vitro* de VEGF et sa bio-activité seront ensuite évaluées avec des cellules endothéliales.

Le deuxième volet sera consacré à l'optimisation de la formulation des hydrogels injectables. Pour ce faire, le PCD sous sa forme soluble (PCDs) et insoluble (PCDi) seront mélangés dans la formulation de l'hydrogel CS/PCD afin de voir son impact sur les propriétés physicochimiques des hydrogels. Ainsi, les hydrogels CS/PCDi/PCDs préparés à trois différents ratios seront caractérisés par ses propriétés viscoélastiques (caractère rhéofluidifiant et autoréparant), d'injectabilité et de cytocompatibilité avec des cellules pré-ostéoblastes.

Enfin, une étude prospective sera développée en évaluant la faisabilité d'incorporer l'hydroxyapatite (HAp) dans la formation de l'hydrogel pour favoriser le potentiel ostéoconducteur.

### **2. Cahier des charges**

Bien que les deux types de biomatériaux doivent posséder les caractéristiques communes comme la biodégradabilité et la biocompatibilité, il existe des caractéristiques souhaitables spécifiques pour chacun d'eux, comme illustré ci-dessous (Tableau 11).



**Figure 42.** Schéma de la stratégie pour la formation d'un hydrogel via PEC en utilisant le CHT et le PCD. La première étape est la formation d'une éponge CHT/PCDs pour les défauts osseux larges, la deuxième étape est l'optimisation des hydrogels injectables CHT/PCDi/PCDs pour la chirurgie mini-invasive.

Tableau 11. Cahier de charges spécifique pour l'éponge et l'hydrogel injectable.

<b>ÉPONGE</b>		
<b>PROPRIETE</b>	<b>Objectif</b>	<b>Méthode d'évaluation</b>
<b>1. Porosité interconnectée supérieure à 60% - taille de pores <math>\geq 100 \mu\text{m}</math>.</b>	Permettre le transport des nutriments, l'invasion des cellules et la vascularisation du biomatériau.	Microscopie électronique à balayage (MEB)/ microtomographie ( $\mu\text{CT}$ ).
<b>2. Absorption d'eau (gonflement)</b>	Permettre la souplesse du biomatériau et la diffusion des principes actifs.	Mise en contact avec un tampon physiologique. Mesure du gain de masse.
<b>3. Module de compression</b>	Favoriser la manipulation chirurgicale facile et l'intégration du biomatériau lors de la chirurgie	Test mécanique de compression
<b>4. Bio-activité par incorporation du VEGF</b>	Favoriser la vascularisation et donc la régénération du tissu osseux.	Profil de libération de VEGF. Test de prolifération et de migration des cellules endothéliales.
<b>HYDROGEL INJECTABLE</b>		
<b>PROPRIETE</b>	<b>Objectif</b>	<b>Méthode d'évaluation</b>
<b>1. Rhéofluidifiante et autoréparante</b>	Déterminer la faisabilité d'injection avec les propriétés viscoélastiques.	Analyses rhéologiques
<b>2. Injectabilité sans difficulté</b>	Démontrer sa capacité d'utilisation pour la chirurgie mini-invasive.	Test d'injectabilité en utilisant une machine d'essais universelle.
<b>3. Stabilité structurelle des hydrogels après injection</b>	Déterminer si les hydrogels reprennent leur forme et s'ils gardent leur structure.	Injection dans un tampon physiologique, observation de la structure des hydrogels



## **PARTIE 2. MATERIELS ET METHODES**

---



## 1. Matériels

### 1.1. Les composants

#### 1.1.1. Le chitosane (CHT)

Le CHT, obtenu à partir de crustacés, a été acheté chez Sigma-Aldrich (lot STBG1894V, France). Le CHT a été caractérisé par son degré de desacétylation (DD), sa masse molaire et sa viscosité ( $\eta$ ). Le DD a été déterminé par spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF) et par résonance magnétique nucléaire (RMN- $H^1$ ) (Annexe 1). La masse molaire a été déterminé par viscosimétrie capillaire, et par chromatographie par perméation de gel (GPC) (Annexe 2). La GPC a permis de déterminer l'index de polymolécularité (IP). La viscosité a été obtenue par rhéologie à partir d'une solution de 1%<sub>w/v</sub> du CHT dans 1%<sub>v/v</sub> d'acide acétique. Tous les résultats obtenus sont montrés dans le Tableau 12.

**Tableau 12.** Propriétés physico-chimiques du CHT (lot STBG1894V) obtenues après caractérisation.

Propriété	Technique	Valeurs
DD, %	IR	74,62
	RMN- $H^1$	73,31
Masse molaire, kDa	Viscosimétrie capillaire	150
	GPC	190 (IP : 1,7)
$\eta$ , cps	Rhéologie	277

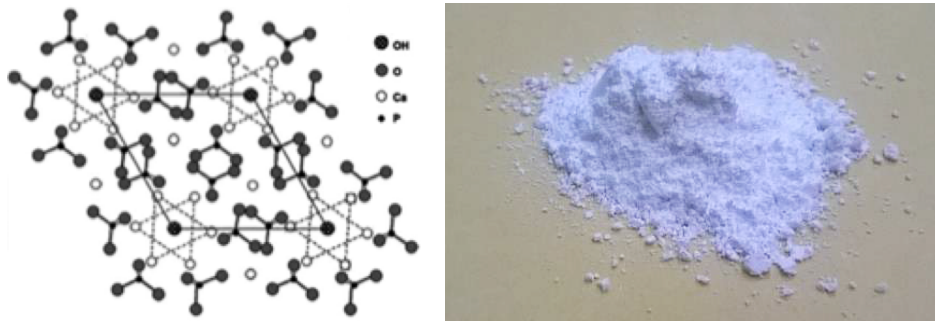
#### 1.1.2. Les polymères de $\beta$ -cyclodextrine (PCD)

Le PCD soluble (PCDs) et insoluble (PCDi) ont été synthétisés par l'Unité Matériaux et Transformations (UMET, UMR CNRS 8207, Université de Lille) en utilisant la méthode développée par Martel *et al.*<sup>(241)</sup>. Le PCDs et le PCDi ont été obtenus à partir d'une seule réaction d'estérification entre la  $\beta$ -cyclodextrine (Kleptose<sup>®</sup>, Roquette, France), l'acide citrique (Sigma-Aldrich, France), comme agent réticulant, et l'hypophosphite de sodium qui a joué le rôle de catalyseur. Après réaction, l'eau a été éliminée dans un évaporateur rotatif Rotavapor<sup>®</sup> (Büchi, Suisse) et la partie solide a été récupéré et traité à 140°C pendant 90 min sous vide. Ensuite, ce mélange solide a été dispersé dans l'eau et filtré à l'aide d'un entonnoir en verre fritté. La fraction insoluble (PCDi) a finalement été obtenue après séchage à 90°C pendant une nuit, tandis que la fraction soluble (PCDs) a été concentrée, purifiée par dialyse (Spectra/Por<sup>®</sup>, MWCO 20 kDa, France) et lyophilisée (Alpha 1–2 Christ<sup>®</sup>, Allemagne)<sup>(241)</sup>. Après la réaction de synthèse, le rendement de PCDs et de PCDi était respectivement de 41% et 59%. La masse molaire du PCDs a été déterminée par chromatographie d'exclusion de taille (SEC) et cela a donné une valeur de 20 kDa. Dans le cas du PCDi, son réseau polymère est infini et il est donc impossible de déterminer sa masse molaire. Le pourcentage en masse de cyclodextrine dans PCDs, déterminé par RMN- $H^1$ , était de 58% et il était identique pour le PCDi.



### 1.1.3. L'hydroxyapatite (HAp)

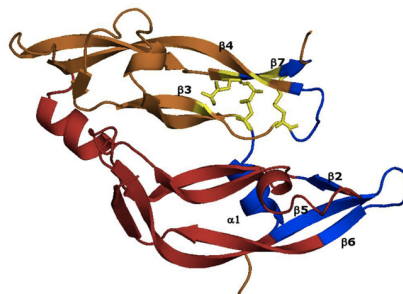
L'HAp a été produite par le Laboratoire des Matériaux Céramiques et Procédés Associés (LMCPA, Université Polytechnique Hauts-de-France). L'HAp est une biocéramique hautement cristalline (Figure 43a) qui a été synthétisé par précipitation de  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  et  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ . La formule chimique de l'HAp est  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  et son rapport Ca/P est de 1,67, sa pureté a été évalué par IRTF et par diffraction des rayons X (XRD) . L'HAp a été fournie sous forme de poudre (Figure 43b).



**Figure 43.** L'hydroxyapatite : à gauche, sa structure cristalline<sup>(263)</sup> et à droite, sous la forme de poudre prête l'emploi<sup>(38)</sup>.

### 1.2. La biomolécule : facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEGF)

Le VEGF-165 (humain recombinant, dérivé d'*E. coli*, C-64420, PromoKine, Allemagne) est une protéine homodimère de 38,2 kDa constituée de deux chaînes polypeptidiques de 165 acides aminés (Figure 44). Cette molécule est sécrétée et exprimée par des tissus vascularisés<sup>(264)</sup>. Les principales fonctions du VEGF sont la stimulation de la croissance des cellules endothéliales, l'angiogenèse et la perméabilité vasculaire<sup>(265)</sup>.



**Figure 44.** Représentation de la structure moléculaire du VEGF. Deux chaînes de monomères sont représenté en orange et en rouge<sup>(92)</sup> respectivement.

### 1.3. Les cellules

#### 1.3.1. Les cellules pré-ostéoblastes : MC3T3-E1

La lignée cellulaire immortalisé MC3T3-E1 (CRL-2594™, ATCC®, États-Unis) a été obtenue à partir du tissu du crâne (calvaria) de souris nouveau-nées. Les cellules MC3T3-E1 sont un modèle ostéogénique bien connu largement utilisées pour les test *in vitro* sur les

scaffolds pour remplacer l'os et dans la recherche liée à l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO)<sup>(266)</sup>.

### 1.3.2. Les cellules endothéliales : HUVECs

Les cellules primaires HUVECs (C-122000, PromoCell GmbH, Allemagne) sont isolées de la veine du cordon ombilical provenant de donneurs uniques<sup>(267)</sup>. Les cellules HUVECs sont largement utilisées comme cellules modèles pour étudier nombreuses fonctions et maladies liées au tissu endothélial, telles que l'angiogenèse, et les voies liées à l'hypoxie et à l'inflammation. De plus, ces cellules sont utilisées pour la vascularisation via la formation de capillaires ou microvaisseaux dans les scaffolds pour l'ingénierie tissulaire (IT)<sup>(72)</sup>.

## 2. Méthodes

### 2.1. Développement, optimisation et caractérisation des éponges CHT/PCDs

#### 2.1.1. Préparation des poudres de CHT et PCDs

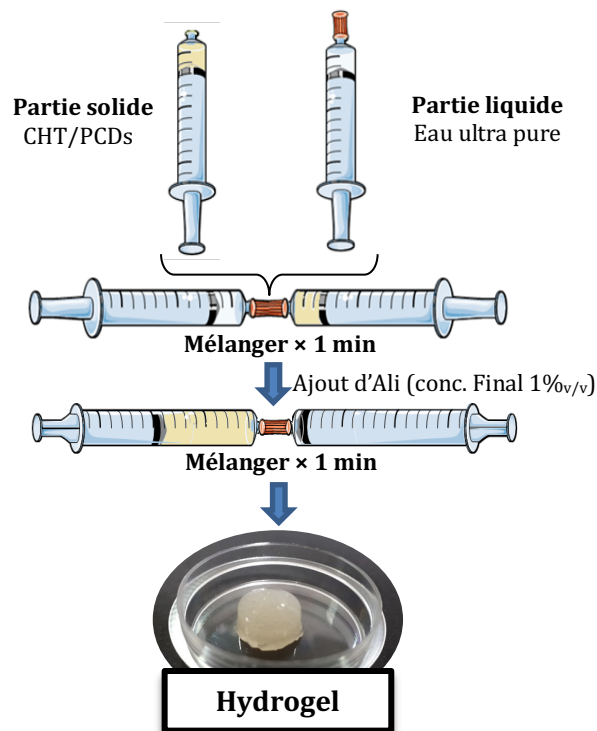
Tout d'abord, le CHT et le PCDs ont été broyées séparément afin d'obtenir des particules avec une taille identique. Le CHT a été broyé en utilisant un broyeur rapide à rotor Pulverisette 14 (Fritsch, Allemagne) pendant 2 min à 8000 rpm. D'un autre côté, le PCDs a été broyé à l'aide d'un mortier. Ensuite, les poudres de CHT et PCDs ont été tamisées séparément en utilisant un tamis d'une taille de maille de 125 µm. Par la suite, le CHT et le PCDs ont été mélangés avec différents ratios et cobroyés en utilisant un vibro-broyeur MM-400 (Retsch, Allemagne) à 10 Hz pendant 3 min.

#### 2.1.2. Formation des hydrogels CHT/PCDs

Pour la formation de l'hydrogel, un système de deux seringues interconnectées a été utilisé comme illustré dans la Figure 45. Les quantités de poudre cobroyée CHT:PCDs et d'eau ultra pure ont été déposées respectivement dans deux seringues. Puis, les deux seringues ont été connectées avec un connecteur femelle-femelle luer-lock (Vygon®, France) et le mélange poudre/eau a été soigneusement mélangé en appuyant alternativement sur chacun des pistons pendant 1 minute (environ 80 – 90 répétitions). Ensuite, l'acide lactique (Ali, >85%, Sigma-Aldrich, France) a été ajouté au mélange (concentration finale de 1%). Finalement, tout a été ré-mélangé pendant 1 minute afin d'obtenir un hydrogel. Le Tableau 13 montre la formulation utilisée.

**Tableau 13.** Formulations pour la préparation des hydrogels CHT/PCDs<sup>(248)</sup>.

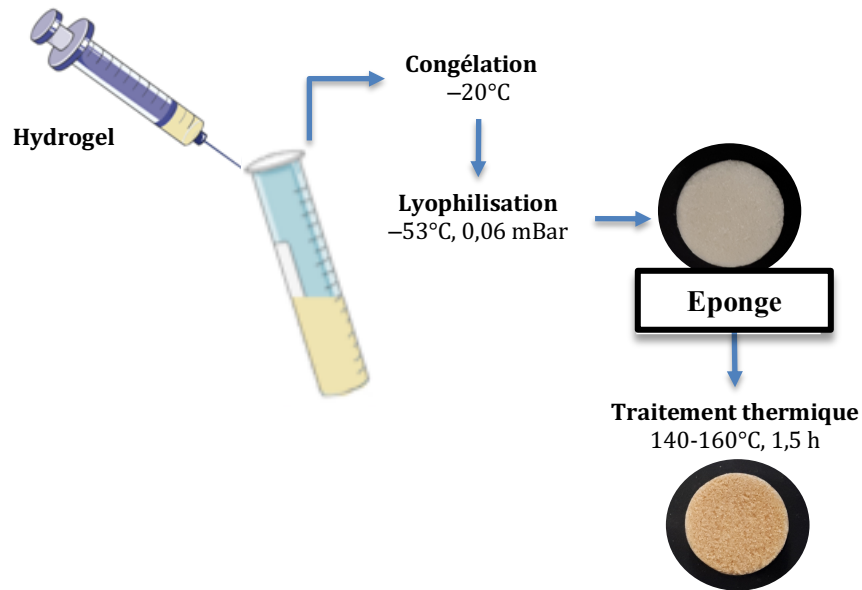
CHT:PCDs	CHT, % w/v	PCDs, % w/v	Eau ultra pure, % v/v	Ali, % v/v
3:3	3	3	93	1



**Figure 45.** Schéma illustrant le procédé d'obtention des hydrogels CHT/PCDs. Le système de deux seringues interconnectées a été utilisé pour la préparation des hydrogels. D'abord la phase de suspension a été faite, suivie de la phase d'acidification en ajoutant l'acide lactique (Ali) pour finalement obtenir l'hydrogel.

### 2.1.3. Formation des éponges CHT/PCDs

Les éponges CHT/PCDs 3:3 ont été obtenues par la lyophilisation des hydrogels (section 2.1.2) (Figure 46). Pour cela, l'hydrogel a été injecté dans un tube de 12 mm de diamètre et 50 mm de longueur. Puis, celui-ci a été congelé pendant une nuit à  $-20^{\circ}\text{C}$ , et finalement lyophilisé pendant 24 h à 0,06 mbar et  $-53^{\circ}\text{C}$  en utilisant le lyophilisateur Alpha 1-2 (Christ<sup>®</sup>, Allemagne). Enfin, les éponges obtenues ont été coupées en disques de différents diamètres et hauteurs selon le besoin de l'étude à effectuer. Un poinçon à biopsie (Kai Medical, France) a été utilisé si nécessaire.



**Figure 46.** Schéma illustrant la formation des éponges CHT/PCDs. L'hydrogel fraîchement préparé a été injecté dans un tube, puis congelé et lyophilisé afin d'obtenir une éponge. Ensuite, l'éponge découpée a suivi un traitement thermique (TT).

#### 2.1.4. Stabilisation des éponges par traitement thermique

Afin de donner plus de stabilité aux éponges par la formation de liaisons covalentes entre le CHT et le PCDs, celles-ci ont reçu un traitement thermique (TT) pendant 90 minutes dans une étuve universelle ventilée UFP600 (Memmert GmbH, France). Trois températures  $140$ ,  $150$  et  $160^{\circ}\text{C}$  ont été évaluées pour l'éponges CS/PCDs 3:3.

#### 2.1.5. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les éponges CHT/PCDs avec et sans TT ont été caractérisées par IRTF en utilisant l'ATR-FTIR Spectrum100 (Perkin-Elmer, France). Le spectre des échantillons a été enregistré en utilisant une résolution de  $4\text{ cm}^{-1}$  avec 32 scans dans une gamme spectrale de  $4000$  à  $650\text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.1.6. Étude de la propriété d'absorption et d'adsorption d'eau des éponges

La propriété d'absorption et d'adsorption d'eau des éponges avec et sans TT ont été analysées en utilisant deux méthodes : l'absorption d'eau en batch en utilisant une solution tamponnée, dit gonflement ; et l'adsorption d'eau vapeur par la méthode de sorption dynamique de vapeur (DVS). Pour ces deux méthodes, la taille des éponges a été fixée à  $6\text{ mm}$  de diamètre et  $5\text{ mm}$  d'épaisseur.

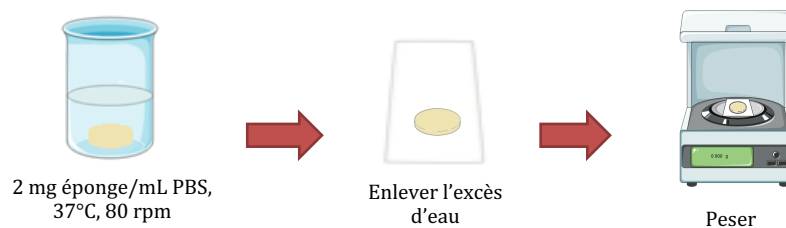
##### 2.1.6.1. Test de gonflement par batch

Pour analyser le gonflement, les éponges ont été pesées et mises dans un flacon, puis une solution de PBS (solution saline tamponnée au phosphate, Sigma-Aldrich, France), pH  $7,4$ , a été ajoutée dans un ratio de  $2\text{ mg}$  d'éponge/ $1\text{ mL}$ . Le flacon a été incubé à  $37^{\circ}\text{C}$  sous agitation orbitale à  $80\text{ rpm}$  pendant  $24\text{ h}$ . L'éponge gonflée a été retirée du PBS à la première

deux heures, puis chaque heure pendant 6 h, et finalement à 24 h afin d'être pesée (Figure 47). La masse humide a été obtenue immédiatement après avoir enlevé l'eau en excès avec un papier absorbant. Le taux de gonflement a été déterminé selon la formule suivante :

$$\% \text{ Gonflement} = \left( \frac{W_g - W_o}{W_o} \right) \times 100\% \quad (5)$$

Soit  $W_g$  la masse humide (éponge gonflée) et  $W_o$  la masse sèche initiale de l'éponge. Toutes les analyses ont été faites en triplicata ( $n=3$ ).



**Figure 47.** Schéma illustrant la méthode de gonflement dans PBS (pH 7,4) à 37°C. L'éponge immergée dans PBS est retirée chaque heure, l'eau excédant est enlevée avec un papier absorbant et l'éponge est pesée.

#### 2.1.6.2. Sorption Dynamique de Vapeur (DVS)

Les isothermes d'adsorption-désorption d'eau des éponges CHT/PCDs ont été mesurés avec un analyseur thermogravimétrique Q5000 SA (TA Instruments, France) sur des échantillons d'environ 9 mg. L'appareil est composé d'une microbalance dans une chambre à température et à humidité réglées. L'humidité relative (HR) est contrôlée avec un flux de gaz porteur, dans notre cas l'azote. Elle est donc générée par le mélange des flux du gaz sec (HR = 0%) avec un flux de gaz saturé en vapeur d'eau (HR = 100%). Le flux global est de 200 mL/min<sup>(242)</sup>.

L'isotherme d'absorption a été obtenu comme suit. L'éponge a été placée dans la chambre du système et elle a été desséchée à 60°C avec 0% de HR pendant 1 h. Ensuite, la température a été réduite et fixée à 25°C, et l'humidité a été augmentée par paliers de 5% jusqu'à atteindre une humidité de 95%. La stabilité du système a été vérifiée par une variation de masse inférieure à 0,01% pendant 5 min lors de chaque palier de 3 h. Puis, l'isotherme de désorption a été déterminé par la diminution de HR jusqu'à 0%. Sur chaque palier la stabilité en masse est atteinte avant le temps maximum, ce qui permet de valider les résultats obtenus.

#### 2.1.7. Dégradation des éponges

La dégradation des éponges avec et sans TT ont été analysées en utilisant deux solvants : PBS et PBS enrichi avec lysozyme. Pour les deux, la taille des éponges a été fixée à 6 mm de diamètre et 5 mm d'épaisseur.

### 2.1.7.1. Dégradation dans le PBS

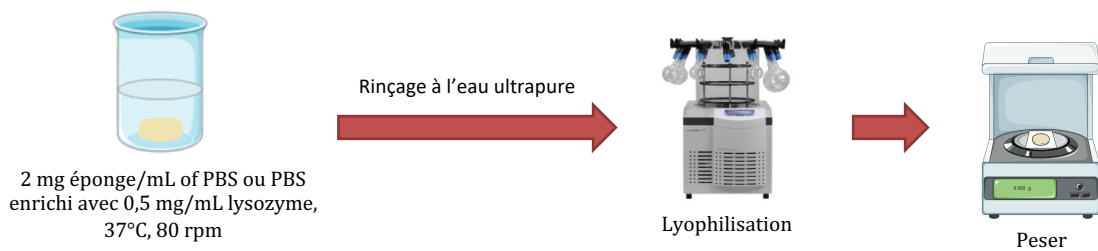
Afin de connaître le profil de dégradation, les éponges ont été immergées dans le PBS, pH 7,4 avec un ratio de 2 mg d'éponge/1 mL à 37°C et sous agitation orbitale à 80 rpm. Après 2, 24, 48 et 120 h d'immersion, les éponges ont été retirées du PBS rincées à l'eau ultra pure pour éliminer trace de sel, congelées et séchées par lyophilisation (0,06 mbar, -53°C) (Figure 48). Le pourcentage de dégradation a été déterminé par la perte de masse en utilisant la formule suivante :

$$\% \text{ Dégradation} = \frac{(W_f - W_o)}{W_o} \times 100\% \quad (6)$$

Soit  $W_f$  la masse sèche après lyophilisation et  $W_o$  la masse sèche initiale de l'éponge.

### 2.1.7.2. Dégradation dans PBS enrichi par lysozyme

Afin de s'approcher du vivant, la dégradation des éponges a été effectuée en présence du lysozyme qui est la principale enzyme qui dégrade le CHT dans le corps humain<sup>(180)</sup>. Pour cela, une solution de lysozyme (Sigma-Aldrich, France) à 0,5 mg/mL dans PBS a été préparée ; et de l'azide de sodium (Sigma-Aldrich, France) a été ajouté dans la solution à 0,5 mg/mL afin d'éviter une contamination microbienne. Ensuite les éponges ont été immergées dans la solution de lysozyme avec un ratio de 2 mg d'éponge/1 mL solution, et ont été incubées à 37°C sous agitation orbitale à 80 rpm. Après 2 h, 1, 5, 7, 14 et 21 jours, les éponges ont été récupérées et la dégradation de l'éponge a été évaluée comme décrit ci-dessus dans le test PBS.



**Figure 48.** Schéma illustrant la méthode de dégradation des éponges CHT/PCDs dans PBS ou PBS enrichi avec 0,5 mg/mL de lysozyme à 37°C.

## 2.1.8. Étude de la microstructure et de la porosité de l'éponge CHT/PCDs

### 2.1.8.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

La microstructure des éponges a été évaluée d'abord en utilisant le MEB. A cet effet, l'éponge a été découpée et placée sur le porte-échantillon. Avant toute observation, les éponges ont été métallisées par du platine (Model 682 PECS, ADL, États-Unis), et observées finalement par MEB (Hitachi S-4700, Allemagne) en utilisant une tension d'accélération de 5 kV et à un courant d'émission de 10  $\mu$ A.

### 2.1.8.2. Microtomographie par rayons X ( $\mu$ CT)

Pour cet essai, une éponge CHT/PCDs (12 mm de diamètre et 5 mm d'épaisseur) a été scannée par un scanner SkyScan1172 (Skyscan, Bruker, Belgique). L'acquisition a été faite avec une source de rayons X fixée à 40 kV et 250  $\mu$ A et les images en haute résolution ont été prises avec une taille de pixel de 9,03  $\mu$ m. La reconstruction en 3D des images acquises a été faite à l'aide du logiciel NRecon<sup>®</sup> (Skyscan, Bruker, Belgique). Toutes les images ont été ensuite analysées avec le logiciel CTAn (Skyscan, Bruker, Belgique) afin d'obtenir les paramètres morphométriques (tels que la porosité, l'interconnectivité et la taille des pores) en suivant le protocole proposé par Lopez-Heredia *et al.*<sup>(268)</sup>. Brièvement, la région d'intérêt (l'éponge) a été sélectionnée et limitée. Puis, le seuillage adaptatif a été appliqué afin de minimiser l'effet de volume partiel et le biais d'épaisseur. La méthode des « doubles cubes temporels » a été utilisée pour la construction du modèle. Dans le cas de l'interconnectivité, la méthode dite « shrink-wrap » a été développée. Il s'agit de limiter la région d'intérêt avec un objet de taille spécifique (vox), par exemple, 0, 30, 60, 120 ou 240  $\mu$ m, et de mesurer le volume occupé par ces objets en fonction de la porosité totale disponible. Finalement, la porosité fermée et ouverte ont été déterminées lors de l'analyse de la porosité totale<sup>(268)</sup>.

### 2.1.9. Test mécanique de compression

La résistance mécanique à la compression des éponges CHT/PCDs avec et sans TT (n=3) a été évalué en utilisant un appareil d'essai mécanique Univert<sup>®</sup> (CellScale, Canada). A cet effet, les éponges ont été coupées en cylindres de 12 mm de diamètre et 11 mm de hauteur. Puis, les éponges ont été réhydratées par plongées dans une solution de PBS pendant 2 h avant le test. Le système a été équipé d'une cellule chargée à 10 N, et le test a été pratiqué jusqu'à 50% de déformation. Le module élastique de compression ( $E$ ) a été calculé en utilisant la région linéale de la courbe contrainte-déformation.

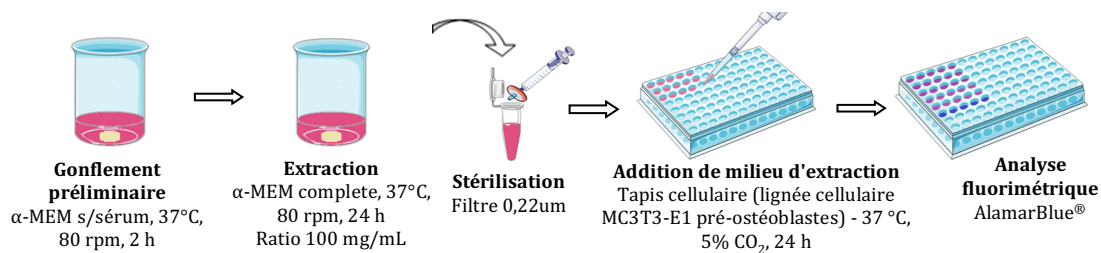
## 2.2. Étude des propriétés biologiques de l'éponge CHT/PCDs.

### 2.2.1. Cytotoxicité – Méthode de contact indirect

La cytotoxicité des éponges a été évaluée par la méthode d'extraction (contact indirect) selon la norme ISO 10993-5 en utilisant la lignée cellulaire de cellules pré-ostéoblastes MC3T3-E1 (Figure 49). Les éponges ont été préalablement réhydratées dans le milieu de culture MEM- $\alpha$  (Gibco<sup>®</sup>, ThermoFischer Scientific, France) en respectant la ratio 2 mg d'éponge/1 mL milieu à 37°C et 80 rpm (Innova 40, New Brunswick Scientific, France) pendant 2 h. L'éponge réhydratée a été retirée du milieu de culture et l'excès a été enlevé avec un papier absorbant, puis l'éponge a été immédiatement pesée. L'extrait de l'éponge a été obtenu en les immergeant dans 1 mL de milieu de culture MEM- $\alpha$  enrichi avec 10% de SVF (sérum de veau foetal, Gibco<sup>®</sup>, Thermo Fisher Scientific, France), respectant la ratio 100 mg d'éponge/1 mL milieu à 37°C sous agitation 80 rpm pendant 24 h. Le milieu complet (MEM- $\alpha$  avec 10% SVF)

sans éponge a été aussi incubé en tant que contrôle. D'un autre côté, les cellules MC3T3-E1 ont étéensemencées dans une plaque polystyrène de culture cellulaire (TCPS) de 96-puits (Falcon®, France) afin de former un tapis cellulaire. Le nombre de cellulesensemencées a été de  $4 \times 10^3$  cellules par puits dans 100  $\mu\text{L}$  du milieu complet et incubées à 37°C sous atmosphère de 5% de  $\text{CO}_2$  pendant 24 h.

Après incubation, chaque milieu d'extraction ( $n=3$ ) a été stérilisé en utilisant un filtre de 0,2  $\mu\text{m}$  (Acrodisc®, Pall corporation, France). Ensuite, le milieu de culture du tapis cellulaire a été remplacé par 100  $\mu\text{L}$  du milieu d'extraction stérile. Les cellules ont été incubées pendant 24 h supplémentaires, à 37°C sous atmosphère de 5% de  $\text{CO}_2$ . Finalement, la viabilité cellulaire a été évaluée par l'utilisation d'un essai fluorométrique avec le réactif d'AlamarBlue® (Uptima, Interchim, France). L'AlamarBlue® est un indicateur redox qui change de couleur et devient fluorescent lors de la réduction chimique du milieu de culture liée à l'activité métabolique des cellules. Ce test est donc basé sur la mesure du taux d'oxydoréduction de ce colorant<sup>(269)</sup>. Cette réponse, qui ne peut avoir lieu qu'avec des cellules vivantes, est proportionnelle à l'activité métabolique cellulaire. Suite à l'incubation supplémentaire de 24 h, le milieu de chaque puits a été remplacé par 200  $\mu\text{L}$  de solution de 10% de AlamarBlue® dans milieu de culture complet et la plaque a été incubée à 37°C sous atmosphère de 5% de  $\text{CO}_2$  pendant 2 h. Puis, 150  $\mu\text{L}$  de cette solution ont été transférés dans une plaque de 96-puits Fluoro-LumiNunc™ (ThermoScientific, France). La lecture par fluorescence a été mesurée en utilisant le fluoromètre Twinkle LB 970 (Berthold, Allemagne) à 530 nm comme longueur d'onde d'excitation et à 590 nm comme longueur d'onde d'émission. L'activité métabolique cellulaire a été exprimée par le pourcentage d'intensité de la fluorescence par rapport à la valeur du contrôle.



**Figure 49.** Schéma illustrant la méthode d'extraction (ISO 10993-5) pour déterminer la cytotoxicité des éponges. Le milieu d'extraction a été obtenu après 24 h d'incubation, puis ce milieu a été stérilisé et a été mis en contact avec le tapis cellulaire. Après 24 h d'incubation supplémentaire, la viabilité cellulaire a été mesurée en utilisant le réactif d'AlamarBlue®.

### 2.2.2. Cytocompatibilité et adhésion cellulaire - Méthode de contact direct

La cytocompatibilité et l'adhésion cellulaire sont ensuite évaluées selon la méthode de contact directe en considérant l'impact de la propriété de surface de l'éponge. L'évaluation a été réalisée avec deux types de cellules : les cellules formant des os (pré-ostéoblastes) et les



cellules formant des vaisseaux sanguins (cellules endothéliales). La taille des éponges pour le test de contact direct été 6 mm de diamètre et 2-2,5 mm d'épaisseur.

#### 2.2.2.1. Culture direct avec cellules pré-ostéoblastes (MC3T3-E1)

Tout d'abord chaque éponge a été stérilisé par immersion dans 1 mL d'éthanol 70% pendant 1 h à température ambiante sous agitation à 80 rpm. Ensuite, l'éponge a été rincée avec une solution stérile de HBSS (Solution saline équilibrée de Hanks, Gibco®, Thermo Fischer Scientific, France) avec un ratio de 20 mg d'éponge/10 mL, pendant 1,5 h à 37°C et 80 rpm. Finalement, l'éponge a été conditionnée en l'immergeant dans le milieu de culture MEM- $\alpha$  complet, avec le même ratio utilisé pour l'HBSS, pendant la nuit, à 37°C et 80 rpm. Après le conditionnement, l'éponge a été mise dans une boîte de Pétri stérile, prête pour ensemençer les cellules.

D'un autre côté, les cellules pré-ostéoblastes (MC3T3-E1) ont été récupérées par trypsinisation à partir d'une boîte de culture cellulaire et ont été centrifugées. Puis, les cellules ont été ensemençées à une densité de  $3,5 \times 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> d'éponge goutte par goutte (30  $\mu$ L) sur toute la surface de l'éponge.

Les éponges ensemençées dans la boîte de Petri ont été incubées pendant 2 h à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> afin de permettre l'adhésion cellulaire. Chaque éponge a, ensuite, été déplacée dans une plaque de culture cellulaire de 12-puits et 3,5 mL/puits du milieu de culture MEM- $\alpha$  complet a été ajouté. Les éponges ensemençées ont été remises à incuber à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant 3 et 6 jours. Le renouvellement du milieu de culture a été fait chaque 3 jours. L'adhésion cellulaire et la viabilité cellulaire dans l'éponge ont été évalués par observation MEB et par le test LIVE/DEAD®, respectivement.

##### 2.2.2.1.1. Observation de l'adhésion cellulaire par MEB

Après la période d'incubation, les éponges ont été mises dans une plaque de culture cellulaire de 48-puits. Afin de fixer les cellules, 700  $\mu$ L/puits d'une solution de glutaraldehyde à 2,5% (Sigma-Aldrich, France) a été ajouté sur chaque éponge et laissée en contact pour 1 h à 4°C (Annexe 3). Ensuite, les éponges ont été rincées 2 fois avec 700  $\mu$ L de tampon Millionig (Annexe 3) pendant 40 min à 4°C. Après fixation, un processus de déshydratation progressive à température ambiante a été effectué dans des bains successifs d'éthanol à concentrations croissantes de 50%, 70%, 80%, 90%, 95% et 100%<sub>v/v</sub>. Puis, les éponges ont suivi un processus de dessiccation en utilisant une solution de HMDS (hexamethyl disilazane, Sigma-Aldrich, France) et d'éthanol absolu à différents ratios (1:2 et 2:1) pendant 20 min. Enfin, les éponges ont été couvertes d'HMDS et laissées sous la hotte pendant la nuit afin de permettre l'évaporation du solvant. La méthode d'observation par MEB de la section 2.1.8.1 a été suivie.

#### 2.2.2.1.2. Test de viabilité cellulaire par kit LIVE/DEAD®

Le kit LIVE/DEAD® (Thermo Fischer Scientific, France) est composé de l'acétoxyméthyl calcéine (4 mM) et de l'homodimère-1 d'éthidium (2 mM). La calcéine est capable de pénétrer dans la membrane plasmique que des cellules viables, où elle est clivée par les estérases intracellulaires et donne une fluorescence verte. D'un autre côté, l'homodimère d'éthidium colore les cellules mortes car il se lie à l'acide désoxyribonucléique (ADN) fragmenté présente dans les cellules sans membrane plasmique intacte, et il émet une fluorescence rouge<sup>(270)</sup>. Les instructions du fournisseur ont été suivies pour l'utilisation de ce kit. Brièvement, les échantillons ont été transférés dans une plaque de culture cellulaire de 48-puits contenant 500 µL/puits de HBSS (rinçage 3 min à 37°C). Ensuite, 500 µL d'une solution Calcéine 2 µM/Ethidium 1 µM a été ajoutée sur chaque éponge, suivi par 30 min d'incubation à température ambiante et à l'abri de la lumière. Ensuite, les éponges ont été placées dans une boîte de Petri à fond en verre µ-Dish 35mm (Ibidi GmbH, France) et ont été observées par microscopie confocale à balayage laser LSM 710 (Zeiss, Allemagne). Les longueurs d'onde utilisées étaient de 494/517 nm pour la calcéine et de 528/617 nm pour l'homodimère d'éthidium.

#### 2.2.2.2. *Culture directe avec cellules endothéliales (HUVECs)*

Le test de contact directe a aussi été fait aussi avec les cellules primaires HUVECs, afin d'observer la cytocompatibilité de l'éponge avec des cellules endothéliales, qui sont des acteurs centraux de la néovascularisation. Le milieu de culture utilisé pour ces cellules a été le milieu ECM (Milieu de culture pour des cellules endothéliales, PromoCell, France) enrichi par le supplément fourni avec le milieu de culture. Brièvement, les éponges ont étéensemencées avec  $5,3 \times 10^3$  cellules/mm<sup>3</sup> et ont suivi la même méthode décrite dans la section 2.2.2.1 pendant 3 et 6 jours de culture. Enfin, la viabilité cellulaire et l'adhésion cellulaire ont respectivement été évaluées en utilisant kit LIVE/DEAD® et le MEB.

### **2.3. Chargement des éponges avec VEGF : Évaluation de la libération du VEGF et leur bio-activité**

#### **2.3.1. Chargement des éponges CHT/PCDs avec VEGF**

Les éponges CHT/PCDs stériles (6 mm de diamètre × 2–2,5 mm d'épaisseur) ont suivi un conditionnement en les immergeant dans une solution saline (NaCl 0,9%) stérile pendant la nuit, et puis rincé avec l'eau ultra pure stérile pendant 2 h, à 37°C et 80 rpm. Ensuite, les éponges ont été congelées et séchées par lyophilisation (0,06 mbar, -53°C).

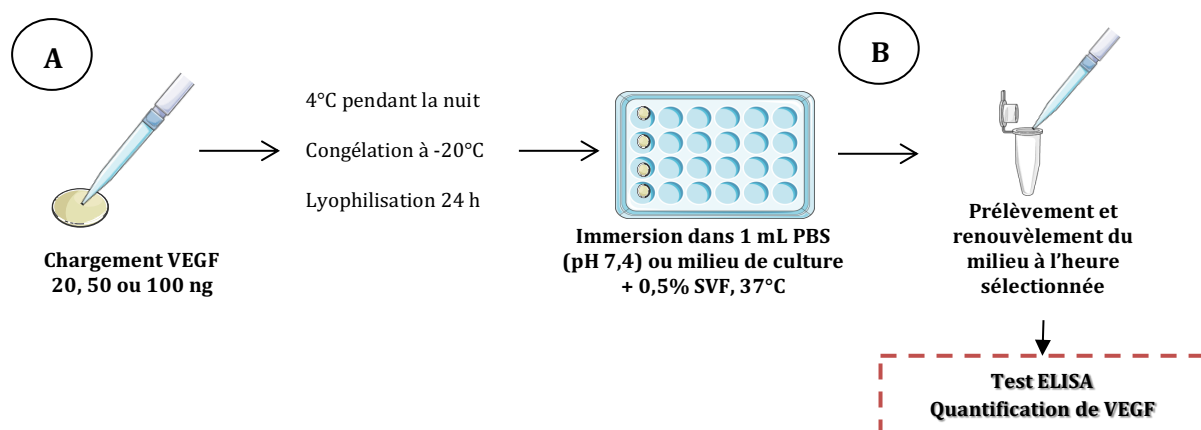
Une solution aqueuse concentrée de VEGF a été diluée dans du PBS avec 0,1% d'ABS (Albumine de sérum bovine, Sigma-Aldrich, France) à différentes concentrations. Une quantité de VEGF finale de 20, 50 et 100 ng par éponge a été ajouté dans 30 µL de solution goutte à

goutte sur l'éponge pour éviter tout débordement. Puis, les éponges chargées de VEGF ont été incubées à 4°C pendant la nuit pour assurer un maximum d'adsorption de VEGF sur l'éponge. Ensuite, les éponges ont été congelées à -20°C pendant 24 h et séchées par lyophilisation (0,06 mbar, -53°C) pendant 24 h (Figure 50A). Après lyophilisation, les éponges chargées ont été stockées à -20°C jusqu'au moment de l'utilisation.

### 2.3.2. Libération du VEGF

Pour évaluer la libération statique du VEGF, les éponges chargées ont été déposées dans une plaque de culture cellulaire de 24-puits. Puis, 1 mL de PBS stérile ou de milieu ECM enrichi par 0,5% de SVF a été ajouté à chaque puits et la plaque a été incubée à 37°C sans agitation. Le milieu de libération a été collecté et remplacé par du PBS ou milieu ECM enrichi avec 0,5% de SVF à 1, 2, 3, 5 et 7 jours (Figure 50B). La quantité de VEGF a été déterminé par la méthode immuno-enzymatique ELISA en « sandwich » (Peprotech, France). Cette méthode permet la détection des antigènes (*i.e.* facteurs de croissance) en utilisant des anticorps spécifiques dans plusieurs étapes. Premièrement, l'anticorps de capture est fixé sur un support, puis le milieu de libération est ajouté et l'antigène présent est liée à l'anticorps de capture. Ensuite, un deuxième anticorps (dit de détection) est ajouté pour se lier aussi à l'antigène. Puis, un anticorps secondaire marqué avec une enzyme est additionné et il se lie à l'anticorps de détection. Enfin, un substrat convertible par l'enzyme en signal colorée est ajouté<sup>(271)</sup>. La lecture de l'absorbance a été faite dans un spectromètre pour microplaques Multiskan™ FC (Thermo Scientific™, France) à une longueur d'onde de 405 nm.

L'effet de « burst » de libération du VEGF a été étudié avec des prélèvements plus fréquents à 30 min, puis chaque heure pendant 8 h et finalement à 24 h dans le milieu ECM enrichi par 0,5% de SVF.



**Figure 50.** Schéma illustrant le chargement des éponges CHT/PCDs avec VEGF et l'étude libération. **(A)** Processus de chargement en utilisant la méthode goutte à goutte, suivi d'une incubation à 4°C, une congélation et finalement la lyophilisation et **(B)** La libération de VEGF dans différents milieux. Les prélèvements ont été quantifiés en utilisant le test ELISA.

### 2.3.3. Évaluation de la bio-activité du VEGF libéré

Il est bien connu que le VEGF régule étroitement l'angiogenèse en stimulant la migration, la prolifération et la différenciation des cellules endothéliales pour former de nouveaux vaisseaux sanguins. Cependant, il est connu que l'activité du VEGF (au même titre que les autres FCs) est dépendante de sa concentration. Par conséquent, il est donc nécessaire d'évaluer si le VEGF libéré par les scaffolds est toujours bioactif. A cet effet, la bio-activité du VEGF libérée à partir des éponges a été évaluée sur les fonctions des cellules endothéliales liées à l'angiogenèse. Différentes techniques *in vitro* sont largement décrites dans la littérature pour évaluer les propriétés angiogéniques des scaffolds<sup>(255,272,273)</sup>. Nous nous sommes concentrés donc sur l'évaluation de la prolifération et de la migration des cellules HUVECs induites par le VEGF.

#### 2.3.3.1. Prolifération cellulaire

Dans le but d'évaluer l'impact de VEGF libéré sur la prolifération cellulaire, d'abord la libération de VEGF des éponges (n=2) avec et sans VEGF (0 ng/mL) a été fait dans le milieu ECM enrichi avec 0,1% de SVF pendant 7 jours. Le milieu de libération a été prélevé et renouvelé 100% à 1, 2, 3 et 7 jours, et le milieu prélevé ont été stockés à 4°C jusqu'au jour du test. Tout d'abord, les cellules ont été cultivées à une densité de  $3,5 \times 10^3$  cellules/puits dans une plaque 96-puits et incubées pendant 6 h. Puis, le milieu de culture a été remplacé par le milieu ECM enrichi de 0,1% SVF pour priver les cellules en nutriments, et la plaque a été incubée pendant la nuit à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Après incubation, le milieu manquant de nutriments a été remplacé par le milieu de libération prélevé à 1, 2, 3 et 7 jours, et la plaque a été incubé pendant 48 h. Un contrôle positif (50 ng/mL VEGF) et un contrôle négatif (milieu ECM enrichi avec 0,1% SVF) ont été aussi testés. La prolifération des cellules a été finalement quantifié par un dosage fluorométrique avec le réactif d'AlamarBlue® (décrit à la section 2.2.1).

#### 2.3.3.2. Migration cellulaire

Afin d'évaluer la migration cellulaire, deux techniques ont été utilisés : le test de migration « Transwell® » et la technique de blessure/cicatrisation (« scratch »). Pour cela, la libération des éponges avec et sans VEGF (0 ng/mL) a été faite dans le milieu ECM avec 0,5% de SVF et 0,1% de SVF, respectivement, selon le besoin du protocole expérimental. Un prélèvement journalier pendant 3 jours été réalisé, puis stocké à 4°C jusqu'à le jour du test de migration.

##### 2.3.3.2.1. Technique de blessure/cicatrisation

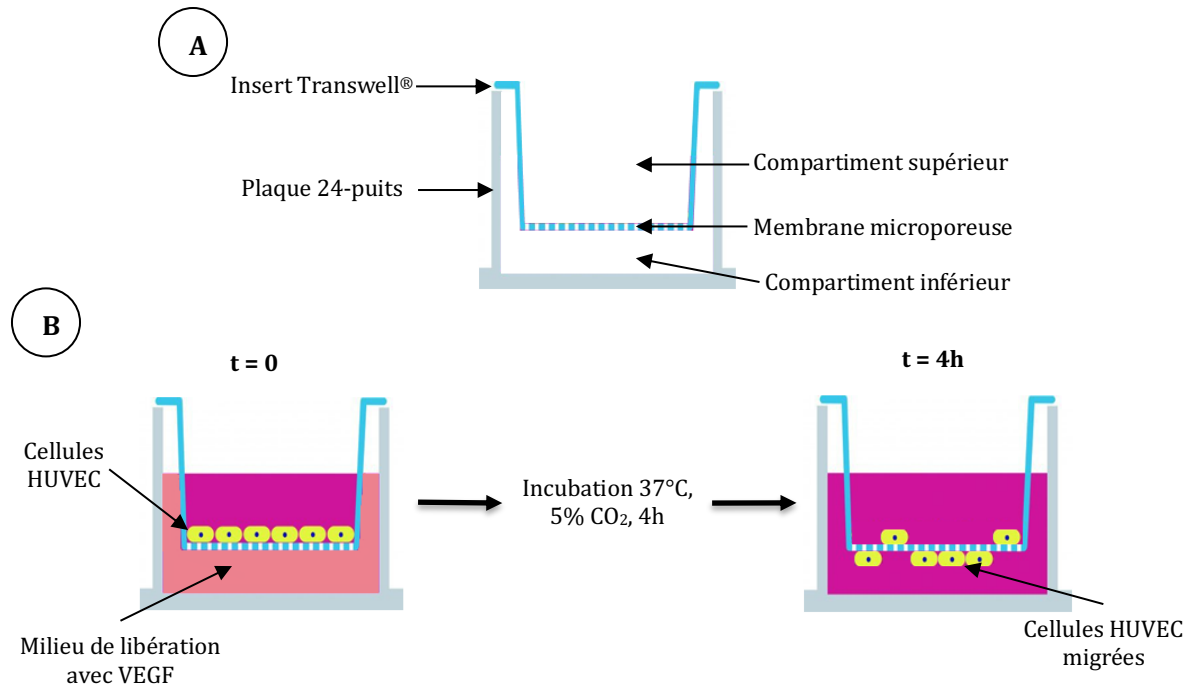
Pour cette technique, les cellules HUVECs ont étéensemencées ( $5 \times 10^4$  cellules/puits) dans une plaque de 4-puits Nunc™ (Thermo Fischer Scientific, France) jusqu'à ce qu'elles soient confluentes. Puis, une plaie est formée en grattant une zone de la monocouche à l'aide d'un cône de micropipette stérile. Ensuite, chaque puit a été rincé avec le milieu ECM enrichi

de 0,1% SVF afin d'enlever les cellules détachées et les débris cellulaires. Toute de suite, le milieu de libération de chaque éponge (500  $\mu$ L) a été ajouté délicatement sur la monocouche et l'image à temps 0 a été prise sous le microscope inversé (DM IL LED, Leica, Allemagne). Finalement la plaque a été incubé à 37°C et 5% CO<sub>2</sub> pendant 24 h. Un contrôle positif (50 ng/mL VEGF) et un contrôle négatif (le milieu ECM avec 0,1% SVF) ont été utilisées. Après incubation, le milieu de chaque puit a été prélevé et les cellules ont été fixées et colorées avec une solution 0,2% de Crystal-violet.

La migration des cellules a été vérifiée par le remplissage de la zone vide de la monocouche cellulaire (blessure) en prenant des images sous le microscope (temps 24 h) pour l'analyse qualitative de la migration. Les images ont été traitées et les pourcentages de réduction de la largeur de la blessure sont mesurés et calculés avec le logiciel Image J (Version 1.50 26)<sup>(274)</sup>.

#### 2.3.3.2.2. Test de migration « Transwell »

Ce test consiste en l'utilisation des inserts de culture Transwell® (Corning® Costar, États-Unis) avec une membrane de polycarbonate avec une taille de pores de 8  $\mu$ m insérés dans une plaque 24-puits (Figure 51A). Tout d'abord, les cellules HUVECs ont été remises en suspension dans ECM avec 0,5% de SVF et ont étéensemencées sur la membrane de l'insert ( $5 \times 10^4$  cellules/insert). Ensuite, le milieu de libération VEGF (600  $\mu$ L) a été placé soigneusement dans le compartiment inférieur et finalement la plaque a été incubée à 37°C dans 5% de CO<sub>2</sub> pendant 4 h (Figure 51B). Un contrôle positif (20 ng/mL VEGF) et un contrôle négatif (milieu ECM avec 0,5% de SVF) ont été utilisés. Après incubation, les cellules non migrées ont été enlevées du côté supérieur de la membrane à l'aide d'un coton tige. Puis, les cellules migrées du côté inférieur de la membrane ont été fixées avec 70% d'éthanol et colorées avec 0,2% de Crystal-violet. Les membranes avec les cellules ont été regardées sous microscope inversé pour observer la quantité de cellules migrées.



**Figure 51.** Configuration expérimentale du test de migration. **(A)** Matériels à utiliser pour le test : l'insert de culture avec une membrane de polycarbonate et la plaque de culture cellulaire de 24-puits et **(B)** la procédure du test de migration : à temps 0 les cellules sont mises en contact avec le milieu de libération contenant VEGF, après 4 h d'incubation les cellules ont migré à travers la membrane de l'insert.

## 2.4. Développement et optimisation des hydrogels injectables CHT/PCDi/PCDs

### 2.4.1. Formation des hydrogels CHT/PCDi/PCDs

La formation des hydrogels avec différents ratios de polymère de cyclodextrine soluble (PCDs) et insoluble (PCDi) a été étudiée afin de trouver un bon compromis entre les propriétés des hydrogels pour améliorer leur stabilité et pouvoir les utiliser en tant que hydrogels injectables. La formation des hydrogels CHT/PCDi/PCDs (Tableau 14) a été faite selon la méthode décrite dans la section 2.1.2.

**Tableau 14.** Formulations pour la préparation des hydrogels injectables CHT/PCDi/PCDs.

CHT:PCDi:PCDs	CHT, % w/v	PCDi, % w/v	PCDs, % w/v	Eau ultrapure, % v/v	Ali, % v/v
3:3:0	3	3	0	93	1
3:1,5:1,5	3	1,5	1,5	93	1
3:0:3	3	0	3	93	1

### 2.4.2. Test du flacon retourné pour la formation des gels

La gélification et la stabilité des hydrogels choisis ont été évalués par le test du flacon inversé<sup>(275)</sup>. Immédiatement après l'acidification et le mélange finale de la suspension CHT/PCDi/PCDs, 1,5 mL du mélange a été extrudé dans des flacons en verre de 10 mL et incubée à 37°C pendant 24 h. Les flacons ont été retournés (pendant 3 min) au temps 0, 1 et 24 h, et les photos des hydrogels ont été prises.

### 2.4.3. Étude rhéologique des hydrogels CHT/PCDi/PCDs

Les hydrogels CHT/PCDi/PCDs ont été caractérisés par ses propriétés rhéologiques afin de comprendre les interactions des PCDi et PCDs dans les propriétés viscoélastiques, et afin d'évaluer leur possible application en tant qu'hydrogels injectables. Le rhéomètre MCR 301 (Anton Paar, France) équipé d'une géométrie des plateaux parallèles (plan-plan, PP25) de diamètre 25 mm et d'une base Peltier qui contrôle la température de la plaque, a été utilisé. Le Tableau 15 présente les paramètres utilisés.

**Tableau 15.** Paramètres à utiliser dans le rhéomètre pour l'analyse rhéologique.

Paramètres	
Mode de travail	Oscillation/Rotation selon l'analyse
Géométrie	PP25
Taux de cisaillement	1,308 min/s
Contrainte de cisaillement	327,04 Pa/mNm
Entrefer	1 mm
Température	37°C/25°C selon l'analyse

Avant toute analyse, la région viscoélastique (RVE) des hydrogels a été déterminée lors du balayage d'amplitude (entre 0 et 100%) à une fréquence constante de 1 Hz. Ensuite, différents test rhéologiques, tels que le balayage au cours de temps, la déformation cyclique, *etc.* comme décrit ci-dessous. Tous les analyses ont été effectuée en triplicata.

#### 2.4.3.1. Balayage au cours du temps

Le comportement du module d'élasticité ( $G'$ ) et du module visqueux ( $G''$ ) de tous les hydrogels a été évalué en fonction du temps à une température fixe de 37°C dans le mode oscillatoire. Une fréquence de 1 Hz et une amplitude de 1% ont été choisies pour s'intégrer dans le RVE. Pour éviter le séchage de l'échantillon, de petits bols d'eau ont été placés autour de l'échantillon.

#### 2.4.3.2. Balayage de fréquence

De la même manière, les modules  $G'$  et  $G''$  ont été évalués lors d'un balayage de fréquence. La gamme utilisée était de 1 à 100 rad/s à une amplitude de 1% et à température ambiante.

#### 2.4.3.3. Balayage de taux de cisaillement

Afin d'évaluer le comportement rhéofluidifiant des hydrogels, la fluidité des ceux-ci a été évaluée. A cet effet, un programme de balayage de taux de cisaillement ( $0-10^2 \text{ s}^{-1}$ ) a été fait en mesurant la viscosité à température ambiante.

#### 2.4.3.4. Analyse en mode déformation cyclique

Enfin, la propriété autoréparante des hydrogels a été évaluée afin de compléter l'étude précédent, et de simuler la procédure d'injection clinique. Ainsi, les modules élastique et visqueux ( $G'$  et  $G''$ ) ont été mesurés en fonction du temps, en appliquant alternativement une condition de cisaillement faible (contrainte de 1%) pendant 3 min et une condition de cisaillement élevé (contrainte de 500%) pendant 2 min<sup>(134,147,276)</sup>. Cinq cycles successifs de cisaillement faible/élevé ont été appliqués à température ambiante.

### 2.4.4. Injectabilité

#### 2.4.4.1. Profil de force d'injection

La force appliquée sur le piston de la seringue pour injecter les hydrogels a été évaluée par un système de test électromécanique (MTS Insight 100, États-Unis) avec une cellule chargée de 100 kN. Brièvement, 1,5 mL de chaque hydrogel a été préparé comme mentionné ci-dessus dans une seringue de 5-mL (12 mm de diamètre, Medicina<sup>®</sup>, Royaume-Uni). Immédiatement après le mélange, la seringue a été équipée d'une aiguille de 18G (1,2 mm de diamètre × 40 mm de longueur, BD<sup>®</sup> Microlance, France) et a été placée sur une éprouvette vide. La cellule chargée a été déplacée vers le bas jusqu'au contact du piston de la seringue. Ensuite, la force de compression a été appliquée à une vitesse transversale de 10 mm/min sur la seringue jusqu'au moment où l'hydrogel a été complètement éjecté. La courbe force-déplacement a été donc obtenue.

#### 2.4.4.2. Intégrité structurelle dans PBS après injection

Les hydrogels ont été injectés à travers une aiguille 18G (BD Microlance<sup>™</sup>, France) dans un flacon rempli de PBS (37°C, pH 7,4). La morphologie et la stabilité structurelle des hydrogels ont été évaluées. Les caractéristiques de l'hydrogel telles que la formation de « cordons », leur stabilité (sans changement de forme comme gonflement ou rétrécissement) et leur désintégration ont été observées après injection puis à différents intervalles de temps, jusqu'à 7 jours.

### 2.4.5. Cytotoxicité- Méthode de contact indirect

Pour cet essai, la cytotoxicité des meilleurs hydrogels a été évaluée par la méthode d'extraction (ISO 10993-5), en utilisant les cellules pré-ostéoblastes MC3T3-E1. La méthode suivie était la même que dans la section 2.2.1 avec quelques modifications. Dans ce cas, les hydrogels ont suivi une étape de pré-conditionnement pendant 24 h dans milieux de culture MEM- $\alpha$  sans sérum. Également, les extraits des hydrogels ont été préparés à deux intervalles de temps : 24 et 72 h.



## 2.5. Étude prospective : Formation des hydrogels composites avec HAp

Le meilleur hydrogel a été sélectionné pour évaluer la faisabilité d'élaborer des hydrogels composites avec une phase minérale d'hydroxyapatite (HAp). Les hydrogels CHT/PCDi/PCDs/HAp ont été préparés selon la méthode décrite dans la section 2.1.2. Les concentrations d'HAp évaluées dans un premier temps ont été 1, 3 et 5% (Tableau 16). Notamment, la poudre d'HAp (possédant une taille de particule inférieure à 125  $\mu\text{m}$ ) a été mélangée aux poudres cobroyées du CHT/PCDi/PCDs dans la première seringue (Figure 45).

**Tableau 16.** Formulations pour la préparation des hydrogels composites CHT/PCDi/PCDs/HAp.

CHT:PCDi:PCDs:HAp	CHT, % <sub>w/v</sub>	PCDi, % <sub>w/v</sub>	PCDs, % <sub>w/v</sub>	HAp, % <sub>w/v</sub>	Eau ultrapure, % <sub>v/v</sub>	Ali, % <sub>v/v</sub>
3:1,5:1,5:1	3	1,5	1,5	1	92	1
3:1,5:1,5:3	3	1,5	1,5	3	90	1
3:1,5:1,5:5	3	1,5	1,5	5	88	1

Ensuite, les hydrogels composites ont été caractérisés par ses propriétés viscoélastiques. Les méthodes de balayage d'amplitude et de balayage de temps dans le rhéomètre ont été faites. La morphologie et l'intégrité structurale dans PBS ont été évaluées. Les hydrogels ont été lyophilisés pour former des éponges composites lesquels ont été caractérisés par IRTF et sa microstructure a été évaluée par MEB.

## 2.6. Analyses statistiques

La moyenne et l'écart-type des données quantitatives ont été calculés pour toutes les manipulations. Les résultats ont été comparés en utilisant le test *t*-student, l'analyse de variance unidirectionnelle (ANOVA) et le test Post-Hoc de Tukey afin d'évaluer les différences significatives. Les différences ont été considérées comme statistiquement significatives par  $p < 0,05$ .

## **PARTIE 3. RESULTATS ET DISCUSSION**

---



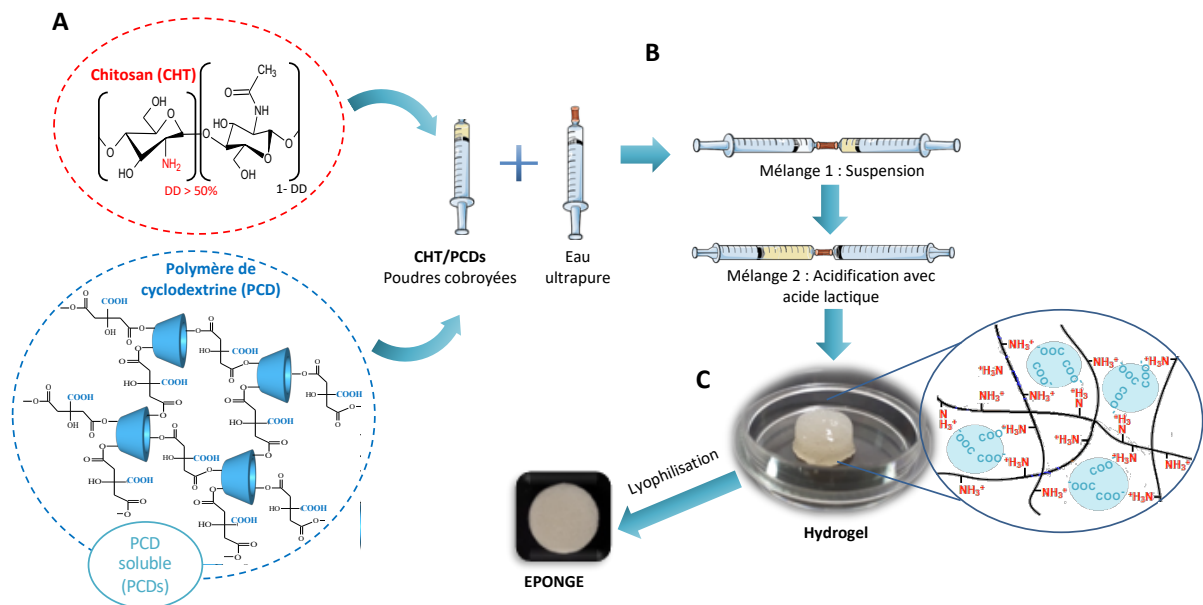
# **Chapitre 1. Développement, optimisation et caractérisation des éponges CHT/PCDs**

---



## 1. Formation et caractérisation des hydrogels CHT/PCDs

Afin d'obtenir des éponges, la première étape est la mise au point des hydrogels CHT/PCDs en utilisant la concentration et le ratio adéquat pour former le complexe polyélectrolyte (PEC). Ainsi, le ratio CHT/PCDs optimal a été sélectionné selon l'étude précédemment effectuée par le Dr. Claudia Flores au cours de ses travaux de thèse<sup>(38)</sup>. L'hydrogel CHT/PCDs avec le ratio 3:3 a donc été sélectionné pour cette étude. Il est important de noter que la thèse précédente a permis de fixer certains paramètres tels que la concentration minimale de CHT (3%<sub>w/v</sub>), la granulométrie de poudres (<125 µm), le cobroyage à sec des poudres de CHT et de PCDs, et l'ordre des étapes de la préparation des hydrogels (suspension des poudres dans l'eau et puis acidification). Dans le cadre de ce travail de thèse, la méthode de formation des hydrogels au vortex, développée auparavant, a été remplacée par un système de deux seringues interconnectées comme illustré sur la Figure 52. L'utilisation de ce système a permis d'obtenir des hydrogels plus homogènes et de s'adapter à une utilisation en clinique car ils pourront être injectés directement après avoir été préparés dans la seringue contenant les poudres cobroyées.

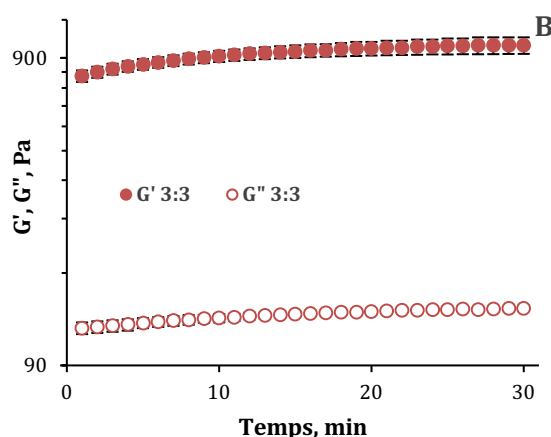


**Figure 52.** Schéma de la formation de l'hydrogel CHT/PCDs 3:3. **(A)** Les composantes : le CHT et le PCDs. **(B)** Système de deux seringues interconnectées pour l'obtention de l'hydrogel. **(C)** Observation macroscopique de l'hydrogel CHT/PCDs 3:3 et schématisation des interactions ioniques entre le CHT et le PCD pour la formation de l'hydrogel.

Les poudres de CHT 3%<sub>w/v</sub> et PCDs 3%<sub>w/v</sub> ont été préalablement cobroyées a sec ; après mise en suspension dans l'eau et acidification, un hydrogel est immédiatement obtenu dans les seringues interconnectées. Les hydrogels ont une couleur jaune pâle avec une consistance homogène sans séparation de phase (Figure 52C). Le processus de gélification de l'hydrogel CHT/PCDs a commencé lors de l'acidification de la suspension aqueuse contenant la poudre finement cobroyée de CHT et PCDs. L'ajout d'acide lactique au mélange a provoqué la

dissolution des particules de CHT grâce à la protonation de ses groupes amines (*i.e.*  $\text{NH}_2 \rightarrow \text{NH}_3^+$ ). Lors de la dissolution, les chaînes de CHT solvatées ont adopté une conformation étendue induisant une augmentation de la viscosité, et les groupes  $\text{NH}_3^+$  disponibles interagissent avec les groupes carboxylate ( $\text{COO}^-$ ) du PCDs dissout. Ces interactions physiques ont ainsi permis d'obtenir un hydrogel par la formation de complexes de polyélectrolytes (PEC) (Figure 52C).

Par la suite, une analyse rhéologique préliminaire a été réalisée dans le but de caractériser l'hydrogel obtenu et de connaître ses propriétés viscoélastiques, surtout sous le nouveau processus de préparation.

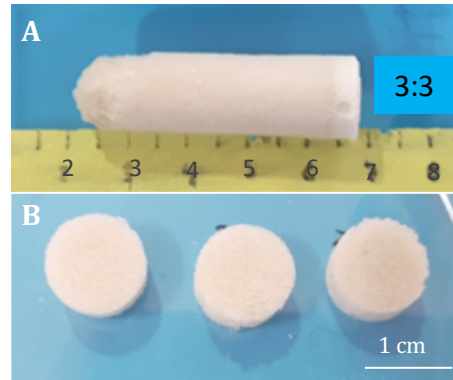


**Figure 53.** Évolution des modules élastiques ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) en fonction du temps pour l'hydrogel CHT/PCDs,  $\nu = 1$  Hz,  $\gamma = 1\%$ ,  $37^\circ\text{C}$  ( $n=3$ ).

L'évolution des modules viscoélastiques a été mesurée en fonction du temps dans le mode oscillatoire, en utilisant une amplitude de déformation de 1%. La Figure 53 montre les modules élastiques ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) de l'hydrogel. Le module  $G'$  était supérieur au module  $G''$  pendant tout le temps d'analyse. Cela signifie la formation d'un hydrogel immédiatement pendant la phase de mélange dans le système de seringues interconnectées (avant l'analyse rhéologique). Anraku *et al.*<sup>(277)</sup> ont également démontré ce phénomène en mélangeant la chitine désacétylée (DD 19%) avec la sulfobutyléther  $\beta$ -cyclodextrine. La formation instantanée d'un hydrogel résistant et élastique était le résultat des interactions électrostatiques entre les groupes amines (cationique) et sulfate (anionique) des deux composés, respectivement<sup>(277)</sup>.

## 2. Formation et caractérisations physicochimiques des éponges CHT/PCDs

Par la suite, les éponges ont été obtenues par lyophilisation. Ainsi, l'hydrogel CHT/PCDs a été injecté dans des tubes (12 mm de diamètre et 50 mm d'hauteur), puis congelé à  $-20^\circ\text{C}$  et finalement lyophilisé. Les éponges 3:3 cylindriques sont illustrées sur la Figure 54A. D'un point de vue macroscopique, les éponges ont présenté une couleur jaune-beige et une porosité homogène sur toutes les sections à différents niveaux du cylindre (Figure 54B).



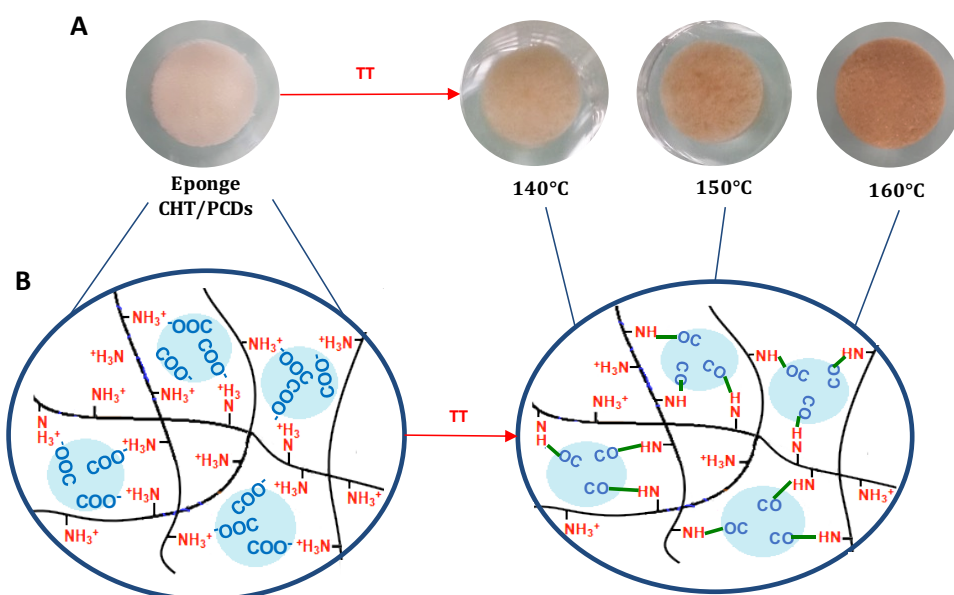
**Figure 54.** Images de l'éponge CHT/PCDs obtenues après lyophilisation. **(A)** Éponge sous forme de cylindre démoulée de son support après lyophilisation et **(B)** Éponge coupée en disques.

### 2.1. Stabilisation des éponges par traitement thermique

Comme il a été rapporté dans le travail de thèse précédent, les éponges CHT/PCDs produites ont tendance à se désintégrer très rapidement en milieux aqueux<sup>(38)</sup>. La vitesse de dégradation de scaffolds pour la régénération osseuse est importante pour soutenir la génération de nouveaux tissus, donc celle-ci ne doit être ni trop rapide ni trop lente. De ce fait, un traitement thermique (TT) a été réalisé afin de donner plus de stabilité aux éponges. La température de 140°C pendant 90 minutes réalisé précédemment au laboratoire a montré un effet positif sur la stabilité de l'éponge. Cependant, aucune optimisation de cette étape n'avait été réalisée. Ainsi, le TT à différentes températures de 140, 150 et 160°C pendant 90 minutes ont été appliquées dans ce travail.

La Figure 55A montre l'aspect macroscopique des éponges après les différents TT. Les éponges ayant subi un TT ont changé de couleur ; ainsi une couleur brunâtre semble s'assombrir avec l'augmentation de la température. Ce phénomène est dû aux facteurs comme le réarrangement des chaînes du CHT et surtout la réticulation (formation de liaisons covalentes) due au traitement thermique<sup>(278,279)</sup>. En effet, comme illustré dans la Figure 55B, la formation de liaisons amides entre les groupes  $\text{NH}_2$  et le groupe  $\text{COOH}$  du PCD peut se produire à haute température. Cette réaction d'amidation a été démontrée par Bernabé *et al.*<sup>(226)</sup> avec un TT à 120°C sur les films PEC à base de CHT et de pectine. Une autre possibilité est la réaction d'estérification entre les groupes  $\text{COOH}$  du PCD et les groupes  $\text{OH}$  du CHT. La liaison covalente est énergétiquement plus forte qu'une liaison électrostatique et donc permettra une meilleure stabilité de l'éponge, qui devrait se dégrader plus lentement<sup>(279)</sup>.





**Figure 55.** Étude du traitement thermique (TT) des éponges CHT/PCDs. **(A)** Images macroscopiques des éponges avant et après TT et **(B)** schématisation des interactions ioniques puis covalente après TT (amidation) entre le CHT et le PCDs.

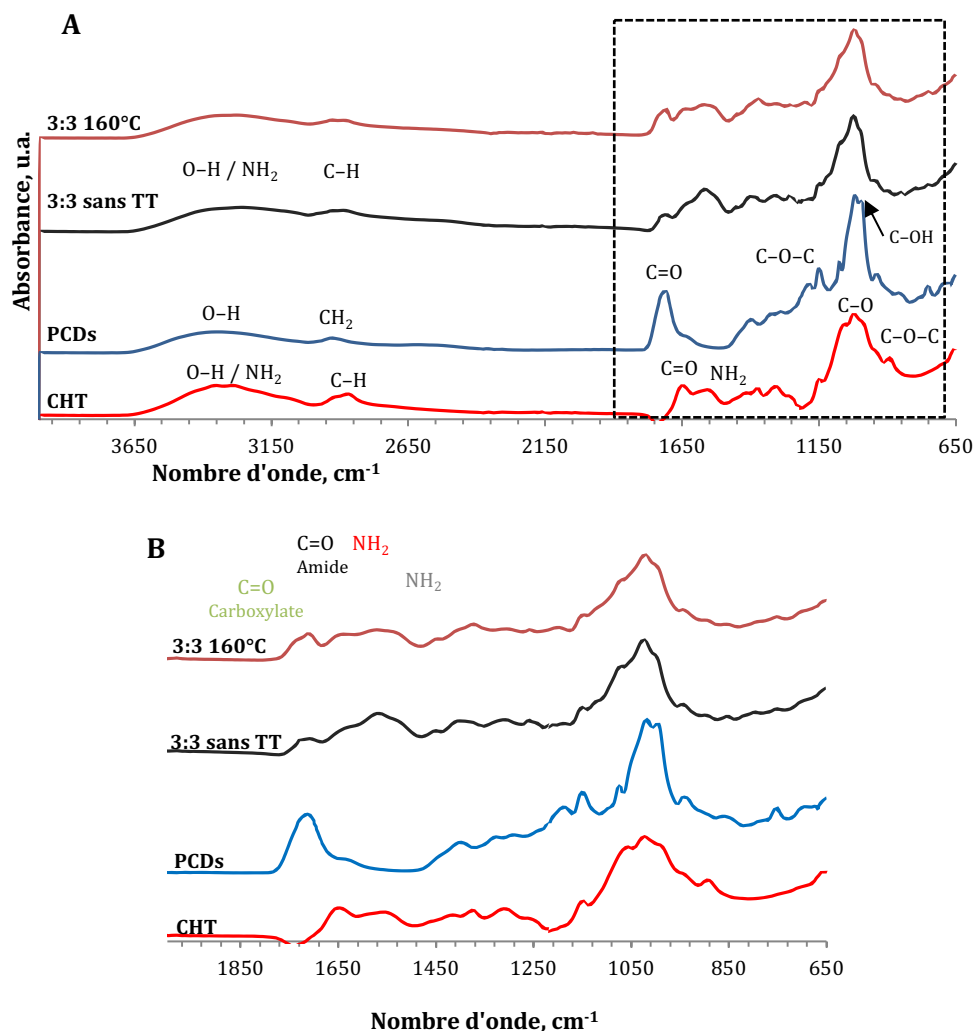
## 2.2. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les éponges avec et sans TT ont été analysées par IRTF afin de déterminer sa composition chimique. Sur la Figure 56, le spectre de l'éponge CHT/PCDs avec TT à 160°C est comparé à celui de l'éponge sans TT et à ceux de ses constituants (CHT et PCDs).

Le spectre de la poudre de CHT montre des bandes caractéristiques des groupes  $-\text{OH}$  et  $-\text{NH}_2$  (superposées) entre 3600 et 3000  $\text{cm}^{-1}$ , et les bandes du  $\text{C-H}$  entre 3000 et 2700  $\text{cm}^{-1}$ . Les autres pics typiques du CHT sont indiqués respectivement à 1650  $\text{cm}^{-1}$  (élongation des liaisons  $\text{C=O}$  du groupe amide), à 1555  $\text{cm}^{-1}$  (déformation  $\text{N-H}$  des amines primaires), à 1375,5  $\text{cm}^{-1}$  (déformation symétrique du groupe  $\text{CH}_3$ ), à 1025,5  $\text{cm}^{-1}$  (élongation  $\text{C-O}$ ) et à 894  $\text{cm}^{-1}$  (élongation  $\text{C-O-C}$ )<sup>(248,280,281)</sup>. Le spectre de la poudre de PCDs montre une bande typique des groupes  $-\text{OH}$  correspondant aux acides carboxyliques compris entre 3600 et 3000  $\text{cm}^{-1}$ , et révèle des pics à 2931,5  $\text{cm}^{-1}$  (élongation asymétrique du groupe  $\text{CH}_2$ ), à 1712,5  $\text{cm}^{-1}$  (élongation  $\text{C=O}$  du groupe carboxylique), à 1151  $\text{cm}^{-1}$  (élongation  $\text{C-O-C}$ ) et à 1019,5  $\text{cm}^{-1}$  (élongation  $\text{C-OH}$ ) typiques des dérivés du sucre<sup>(243,282)</sup>.

Le spectre de l'éponge sans TT montre des bandes, comprises entre 3600 et 3000  $\text{cm}^{-1}$ , et entre 3000 et 2700  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant à la superposition des bandes du CHT et du PCDs, respectivement. Le grossissement de la région spectrale entre 2000 et 650  $\text{cm}^{-1}$  (Figure 56B) montre que le pic à 1713  $\text{cm}^{-1}$ , correspondant à l'élongation  $\text{C=O}$  du groupe carboxylique du PCDs, réduit drastiquement son intensité (tracé vert sur le graphique) comparé avec celui du PCDs. Cela peut être associé à la conversion de groupes  $\text{COOH}$  en groupes carboxylates ( $\text{COO}^-$ ) pendant l'étape de suspension lors de la préparation de

l'hydrogel<sup>(248)</sup>. De plus, le pic de  $-NH_2$  dans l'éponge, pic caractéristique du CHT (à  $1555\text{ cm}^{-1}$ ), s'élargit et passe à un nombre d'onde de  $1569\text{ cm}^{-1}$  (tracés rouge et gris du graphique). Cela pourrait être une conséquence de l'interaction ionique intermoléculaire (entre le CHT et le PCDs)<sup>(283)</sup>. Tous ces changements spectraux dans l'éponge prouvent la formation du PEC entre les groupes  $NH_3^+$  de CHT et le groupe  $COO^-$  de la PCDs.



**Figure 56.** Identification de la composition chimique de l'éponge CH/PCDs par IRTF (A) Spectres IRTF-ATR de l'éponge CHT/PCDs 3:3 avec et sans TT à  $160^\circ C$  et des poudres de CHT et PCDs et (B) Grossissement de la région comprise entre  $2000$  et  $650\text{ cm}^{-1}$ .

Le spectre de l'éponge traitée à  $160^\circ C$  montre toutes les bandes correspondantes à l'éponge sans TT. Néanmoins, les changements dans l'intensité de certains pics sont affichés. Pour l'éponge traitée à  $160^\circ C$ , l'intensité du pic à  $1569\text{ cm}^{-1}$  (groupes  $-NH_2$  - tracé rouge) a diminué. Cette réduction de groupes amines peut supposer la formation de liaisons amides, lesquelles ont consommé les groupes amines. D'autre côté, le pic correspondant aux groupes amides à  $1650\text{ cm}^{-1}$  (tracé noir) apparaît légèrement plus intense dans le spectre de l'éponge traité à  $160^\circ C$  en comparaison à l'éponge sans TT. De ce fait, nous pouvons supposer que la

formation des liaisons amides a eu lieu lors du TT des éponges. Afin d'avoir plus de certitude, une analyse par spectroscopie Raman devrait être réalisée pour corroborer ces résultats.

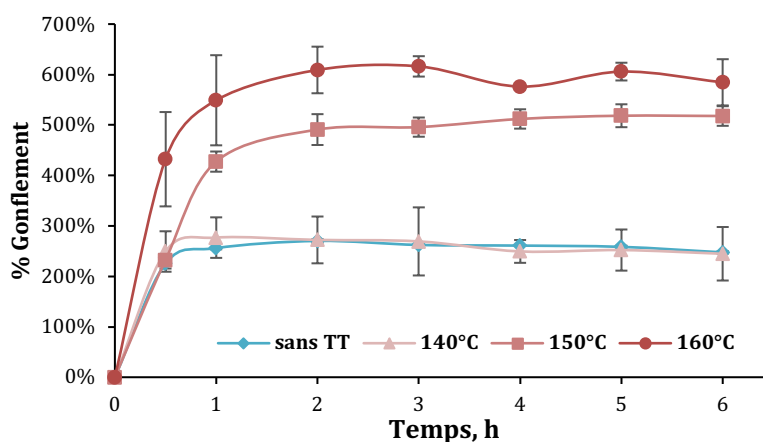
### 2.3. Propriété d'absorption et d'adsorption d'eau des éponges

La propriété d'absorption et d'adsorption d'eau des éponges a été évaluée par deux méthodes : dans un premier temps, une étude d'absorption par la méthode en batch pour mesurer le taux de gonflement dans une solution tamponnée (PBS), et dans un deuxième temps, avec une étude d'adsorption d'humidité (vapeur) par la méthode de sorption dynamique de vapeur (DVS).

#### 2.3.1. Test de gonflement par batch

Les cinétiques de gonflement de l'éponge CHT/PCDs à différentes températures du TT sont présentées dans la Figure 57. En général, les cinétiques de gonflement de toutes les éponges ont suivi une tendance similaire : elles atteignent leur taux de gonflement maximal à partir d'une heure après immersion dans PBS. Une capacité d'absorption d'eau importante a été observée pour toutes les éponges par un taux de gonflement d'environ 600% (TT à 160°C), d'environ 500% (TT à 150°C), et d'environ 290% (TT à 140°C). Pour toutes les éponges la tendance était similaire jusqu'à 24 h d'immersion dans le PBS. Il faut remarquer qu'il y a une différence significative ( $p < 0,05$ ) sur les taux de gonflement entre les différentes températures du TT. Cependant, le taux de gonflement de l'éponge sans TT n'a pas montré de différences significatives ( $p > 0,05$ ) comparé à l'éponge traitée à 140°C.

Ces résultats sont particulièrement surprenants, car théoriquement l'augmentation de la température du TT de l'éponge devrait augmenter le taux de réticulation du réseau polymères, et donc réduire sa propriété de gonflement<sup>(278,279)</sup>. Le mécanisme exact de ce phénomène n'est pas encore clair.



**Figure 57.** Profil de gonflement des éponges CHT/PCDs après TT à 140, 150 et 160°C et sans TT, dans le PBS (pH 7,4) à 37°C et 80 rpm. Le test a été répété 2 fois (n=3).

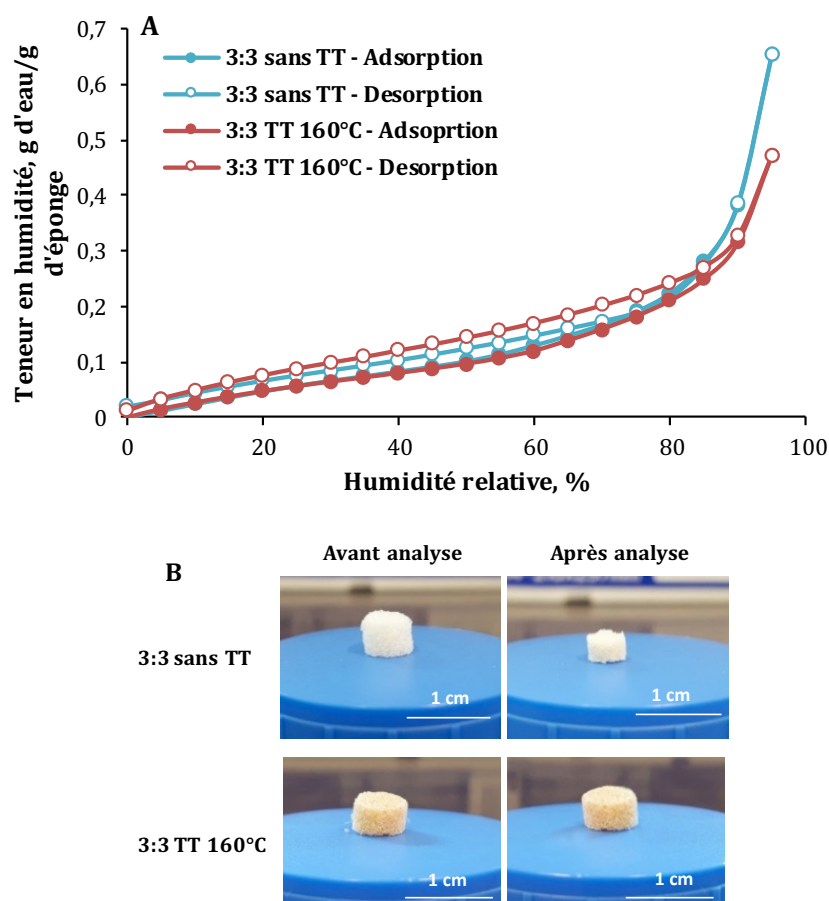
Le gonflement des éponges est un paramètre très important pour l'ITO. Le gonflement initial permet l'augmentation de la taille des pores, ce qui facilite l'invasion, l'adhésion et la croissance cellulaire dans le scaffold 3D<sup>(162,284)</sup>. Le gonflement est aussi important pour l'incorporation de principes actifs par absorption et pour leur délivrance par diffusion dans les éponges<sup>(106)</sup>. D'un autre côté, un gonflement trop important peut conduire à un stress au niveau des tissus environnants et à une perte de la résistance mécanique du scaffold dû au déploiement excessif des pores<sup>(284)</sup>. En effet, nos éponges semblent s'adapter à une application dans l'ITO, car elles n'ont besoin que d'une heure pour arriver à un taux de gonflement maximal (plateau), et elles sont stables.

### 2.3.2. Sorption Dynamique de Vapeur

Par la suite, les isothermes d'adsorption/désorption de vapeur d'eau ont été enregistrés par la sorption dynamique de vapeur (DVS). La Figure 58A illustre les courbes d'isothermes d'absorption et désorption d'eau des éponges CHT/PCDs traitée à 160°C (une seule température choisie) et sans TT.

Les isothermes pour les deux types des éponges ont le même type de profil, et montrent une augmentation quasi linéaire de l'absorption d'eau jusqu'à 70% d'humidité relative (HR), puis une augmentation exponentielle entre 70 et 95% HR. Il convient de remarquer que les courbes de désorption pour les deux éponges sont très légèrement au-dessus des courbes d'absorption. Nous pouvons remarquer également que la courbe de l'éponge traitée à 160°C montre une légère hystérésis. A 75% de HR, les deux éponges avec et sans TT ont montré des valeurs en teneur en humidité très similaires (0,181 et 0,189 g d'eau/g d'éponge, respectivement), ce qui montre que le TT n'a que peu d'incidence sur la prise en humidité jusqu'à cette valeur de HR. Cependant, à 95% de HR, l'éponge sans TT atteint une teneur en humidité de 0,656 g d'eau/g d'éponge, tandis que l'éponge traité à 160°C atteint une valeur de 0,473 g d'eau/g d'éponge, soit 28% de plus pour l'éponge sans TT. Ces résultats sont logiques car l'éponge sans TT possède plusieurs groupes hydrophiles (-OH, -COOH) qui permet de nombreuses interactions avec l'eau et ainsi une plus forte teneur en eau. En revanche, l'éponge traitée à 160°C a été réticulée et une grande partie de ces groupes hydrophiles ont été impliqués pour former des liaisons covalentes (*i.e.* amides). Le changement de la structure du réseau qui en découle explique que la courbe de désorption soit située au-dessus de celle de sorption, l'eau présente dans le matériau étant plus difficile à extraire une fois le réseau réticulé.

D'un autre côté, nous avons constaté que la structure macroscopique de l'éponge sans TT montrait une réduction de son volume très importante après le processus de désorption ; tandis que l'éponge traitée à 160°C n'a pas changé de forme à la fin de l'analyse (Figure 58B). Ces résultats confirment la meilleure stabilité de l'éponge après TT.



**Figure 58.** Résultats du test de sorption dynamique de vapeur (DVS). **(A)** Isothermes d'adsorption et de désorption de vapeur d'eau des éponges CHT/PCDs avec et sans TT à 160°C et **(B)** Images représentatives des éponges avant et après l'analyse.

Néanmoins, ces résultats n'ont pas été répétés dans le cas de l'absorption en batch dans du PBS. L'éponge traitée à 160°C avait montré un taux de gonflement 4 fois plus élevé à celui de l'éponge sans TT. Cette différence de comportement d'absorption d'eau pourrait être dû aux différentes conditions dans deux tests.

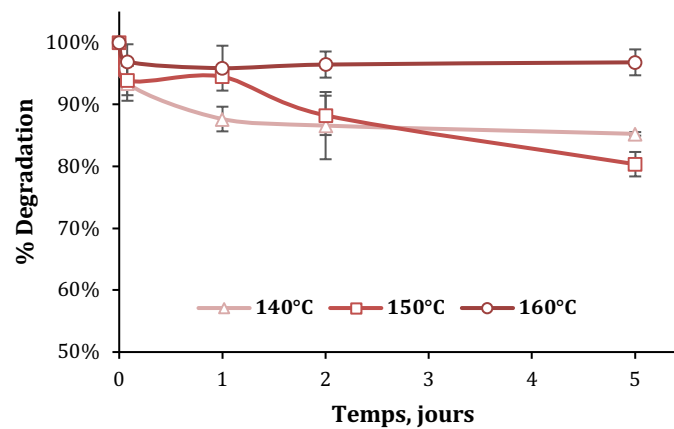
## 2.4. Dégradation des éponges

Le taux de dégradation des scaffolds est très important pour l'application dans l'ITO. Le but de ce travail est donc d'élaborer une éponge qui peut supporter la croissance cellulaire pour générer un néo-tissu (dans ce cas l'os). Le cas idéal serait que le scaffold se résorbe au même rythme que la régénération du tissu. Ainsi, une étude préliminaire de dégradation a été réalisée pendant 5 jours dans du PBS (pH 7,4) à 37°C. Puis, une biodégradation en utilisant le lysozyme a été évaluée à 37°C pendant 21 jours.

### 2.4.1. Dégradation dans PBS

La Figure 59 montre les profils de dégradation des éponges traitées thermiquement dans PBS. Les éponges traitées à 160°C ont montré une perte de masse de 3% environ au bout de 5 jours, tandis que la dégradation des éponges après traitement à 140°C et 150°C était

d'environ 15% et 20%, respectivement. Donc, la stabilité des éponges dans le PBS semble augmentée avec la température du TT.



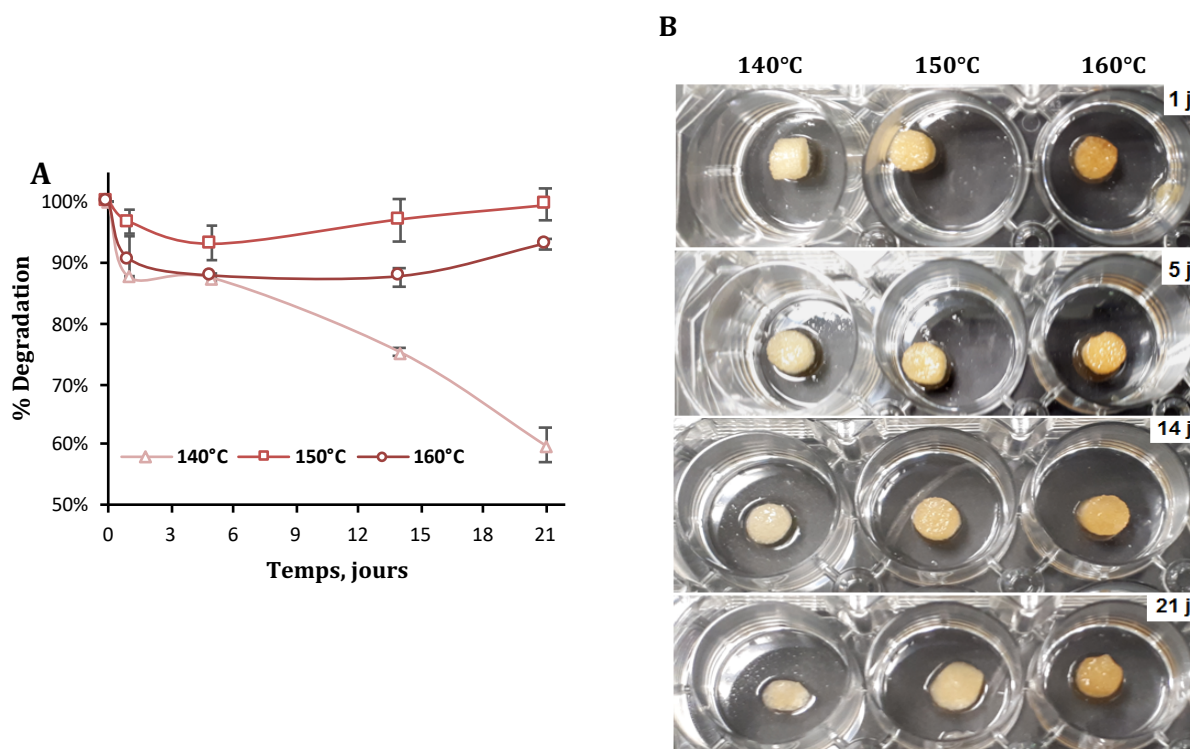
**Figure 59.** Profil de dégradation des éponges CHT/PCDs avec le TT de 140, 150 et 160°C dans PBS pH 7,4 à 37°C et 80 rpm. Le test a été répété 2 fois (n=3).

Il faut remarquer que, parmi les trois températures, seulement les éponges traitées à 150°C ont donné des résultats peu cohérents car l'éponge a été dégradée plus rapidement (environ 20% de perte de masse après 5 jours) que l'éponge traité à 140°C (15% de perte de masse après 5 jours).

#### 2.4.2. Dégradation dans PBS enrichi par lysozyme

Afin de se rapprocher des conditions *in vivo*, l'étude de la biodégradation des éponges a été réalisée en utilisant une solution de PBS enrichi avec 0,5 mg/mL de lysozyme. Le lysozyme est la principale enzyme qui dégrade le CHT dans le corps humain en coupant les liaisons glycosidiques entre les unités polysaccharidiques du CHT<sup>(193)</sup>.

Les cinétiques de biodégradation pour toutes les éponges sont illustrées dans la Figure 60A. Les éponges traitées à 150 et 160°C ont maintenu respectivement 93% et 88% de leur poids initial après 21 jours. En revanche, les éponges traitées à 140°C ont subi une perte de poids de 40% après 21 jours en batch. Ces résultats ont également été rapportés par Shamekhi *et al.*<sup>(177)</sup> sur la dégradation d'éponges de CHT dans une solution de lysozyme à 1,5 µg/mL, les éponges de CHT réticulées à 120°C ont été moins dégradées que les éponges qui n'avaient pas subi de traitement thermique<sup>(177)</sup>.



**Figure 60.** Biodégradation des éponges CHT/PCDs avec le TT de 140, 150 et 160°C. **(A)** Profil de dégradation des éponges dans PBS pH 7,4 enrichi avec 0,5 mg/mL de lysozyme à 37°C et 80 rpm. Le test a été répété 2 fois (n=3). **(B)** Images représentatives des éponges humides après la biodégradation jusqu'à 21 jours.

La Figure 60B montre des vues macroscopiques des éponges après les différents temps de dégradation. A partir du 14<sup>ème</sup> jour, les éponges traitées à 140°C ont commencé à se rétracter jusqu'à la fin de l'étude (jour 21). En revanche, les éponges traitées à 160°C ont montré une bonne stabilité dimensionnelle en conservant leur structure jusqu'à la fin de l'étude. Les points de la courbe à 21 jours montrent une augmentation de masse en pourcentage, cela peut s'expliquer par l'accumulation possible de sels dans l'éponge. Le test est réalisé dans un tampon PBS riche en sel, malgré le rinçage des éponges avec l'eau ultrapure à la fin de l'étude, les sels peuvent être piégés à l'intérieur des éponges.

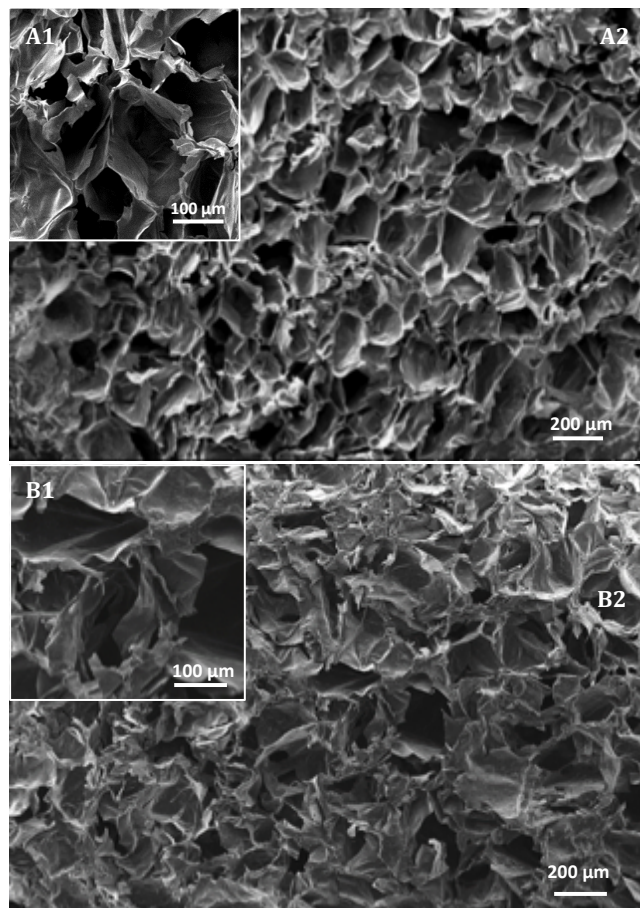
Il a été démontré qu'un certain nombre de paramètres y compris la cristallinité, le degré de désacétylation et la réticulation jouent aussi un rôle important sur la dégradation des éponges à base de CHT<sup>(177)</sup>. En effet, les résultats obtenus confirment qu'aux températures les plus élevées (*i.e.* 160°C), les éponges CHT/PCDs sont plus stables. De même, il convient de remarquer que la dégradation dans le PBS seul et dans le PBS enrichi avec 0,5 mg/mL de lysozyme jusqu'à 5 jours n'a pas montré de différences importantes quelles que soient les éponges évaluées. De ce fait, la réticulation thermique a limité la dégradation des éponges par le lysozyme. Considérant ces résultats, nous avons choisi l'éponge traitée à 160°C pour la suite de l'étude.

## 2.5. Étude de la microstructure et la porosité

La microstructure et la porosité d'un scaffold pour l'ITO est très importante car l'invasion cellulaire, l'apport de nutriments, l'extraction de déchets et la formation de vaisseaux sanguins dépendent de ces paramètres. A cet effet, la microstructure de l'éponge CHT/PCDs avec et sans TT a été caractérisée dans un premier temps, sur la morphologie de sa microstructure par microscopie électronique à balayage (MEB) et dans un deuxième temps, sur la porosité par microtomographie par rayons X ( $\mu$ CT).

### 2.5.1. Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'analyse par MEB nous a permis d'avoir une première perception de la microstructure des éponges. La section transversale des éponges avec et sans TT analysée par MEB (Figure 61A-B) a montré une microstructure poreuse, qui semble être interconnectée. Une vue agrandie des éponges (Figure 61A1-B1) a révélé des pores avec des parois lisses et fines. Il faut remarquer qu'il n'y a pas eu des différences entre les éponges avec ou sans TT.



**Figure 61.** Image MEB de l'éponge CHT/PCDs sans TT (A1-A2) et avec TT à 160°C (B1-B2).  
Grossissement (A1-B1)  $\times$  100 et (A2-B2)  $\times$  50.

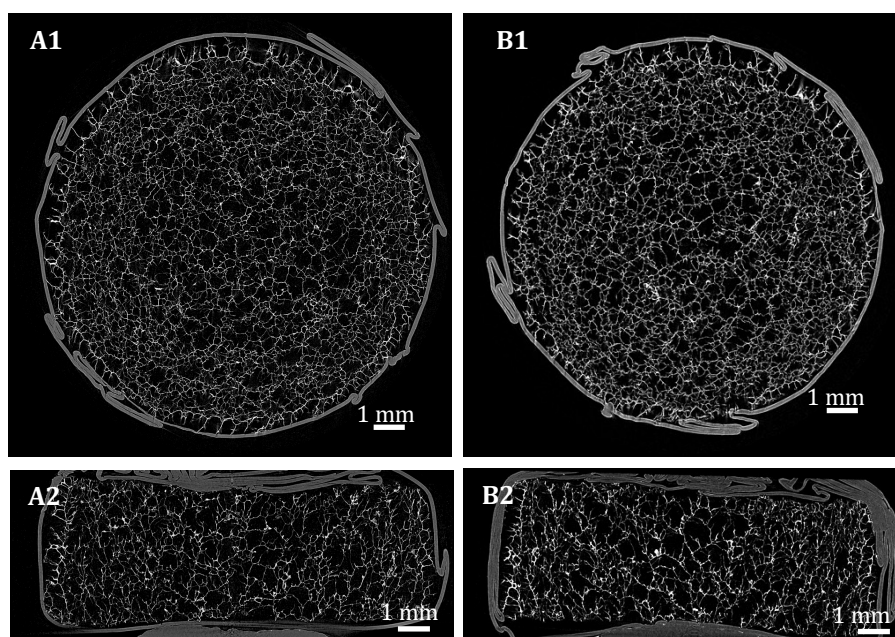
La porosité des scaffolds est dépendante des paramètres du processus de préparation, comme par exemple la concentration du CHT, la réticulation de l'hydrogel et la température de congélation<sup>(157–159)</sup>. Afin d'avoir une microstructure différente, une technique de congélation



connu comme « freeze-casting » peut être utilisée. Cette technique permet la production de matériaux poreux qui peuvent être minutieusement contrôlés pour obtenir une porosité de taille déterminée avec des formes et orientations différentes<sup>(285)</sup>. Nematollahi *et al.*<sup>(286)</sup> ont obtenu des éponges de CHT/soie avec la méthode de « freeze-casting ». La microstructure de ces éponges a révélé une porosité sous forme de lamelles alignées de façon parallèle et/ou perpendiculaire selon la direction de la congélation. Les tailles de pores obtenues étaient de 135 et 372  $\mu\text{m}$  dans une direction perpendiculaire et de 38 et 83  $\mu\text{m}$  dans une direction verticale<sup>(286)</sup>. Donc, cette technique pourrait être appliquée éventuellement sur nos hydrogels afin d'avoir une porosité mieux contrôlée.

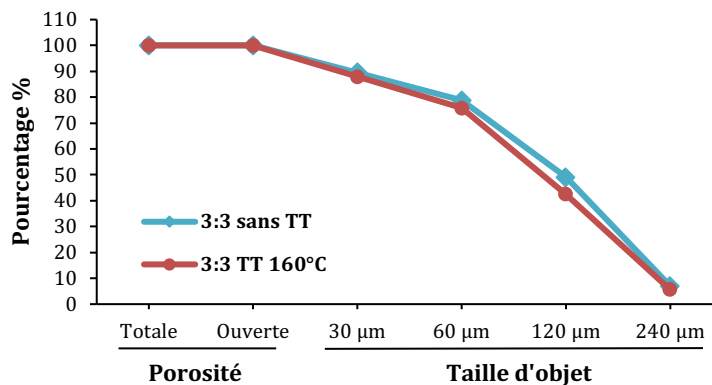
### 2.5.2. Microtomographie par rayons X ( $\mu\text{CT}$ )

Une analyse précise de la porosité de l'éponge été réalisée par  $\mu\text{CT}$ . Cette technique non-destructive permet de calculer des paramètres morphométriques, tels que la distribution de la taille des pores et la porosité totale de la microstructure d'un matériau. L'analyse est basée sur une série d'images 2D, prises sous différents angles, lesquelles seront reconstruites de façon tridimensionnelle à l'aide d'un logiciel<sup>(154)</sup>. La reconstruction en 3D de l'éponge avec et sans TT (Figure 62) a révélé une porosité interconnectée avec des pores de différentes tailles distribuées de façon homogène dans l'éponge. L'analyse des paramètres morphométriques a indiqué que l'éponge possédait une porosité totale interconnectée de 87,5% environ pour les éponges avec et sans TT, avec une taille de pores moyenne de 153  $\mu\text{m}$ . Cette porosité est considéré idéale pour une application dans l'ITO car un scaffold doit posséder une porosité interconnectée comprise entre 60% et 90%<sup>(73-76)</sup>.



**Figure 62.** Reconstructions 3D de l'éponge CHT/PCDs sans TT (A1-2) et avec TT à 160°C (B1-2), à partir des images obtenues par  $\mu\text{-CT}$ . (A) Vue de dessous et (B) coupe transversale.

La Figure 63 montre l'analyse de l'interconnectivité des pores dans l'éponge avec et sans TT. Les résultats de l'interconnectivité ont montré que les deux éponges possèdent des tailles de pores comprises entre 30 et 240  $\mu\text{m}$ . Les éponges présentent aussi une totalité de la porosité disponible et ouverte. Le pourcentage de cette porosité accessible aux objets de tailles de 30, 60, 120 et 240  $\mu\text{m}$  a été de 89%, 79%, 49% et 7%, respectivement pour l'éponge sans TT, et de 88%, 76%, 42% et 6%, respectivement pour l'éponge avec TT. Lorsque la taille de l'objet augmente, l'interconnectivité disponible au passage de cet objet diminue. L'éponge a montré une accessibilité porosité moyenne d'environ 120  $\mu\text{m}$ , *i.e.* des objets de cette taille peuvent traverser 49% environ de la porosité de l'éponge. En revanche, des objets d'environ 200  $\mu\text{m}$  peuvent pénétrer seulement le 6% de la porosité disponible de l'éponge. D'après cette analyse, nous avons confirmé que la réticulation thermique de l'éponge, ne modifie pas la microstructure de l'éponge initiale.



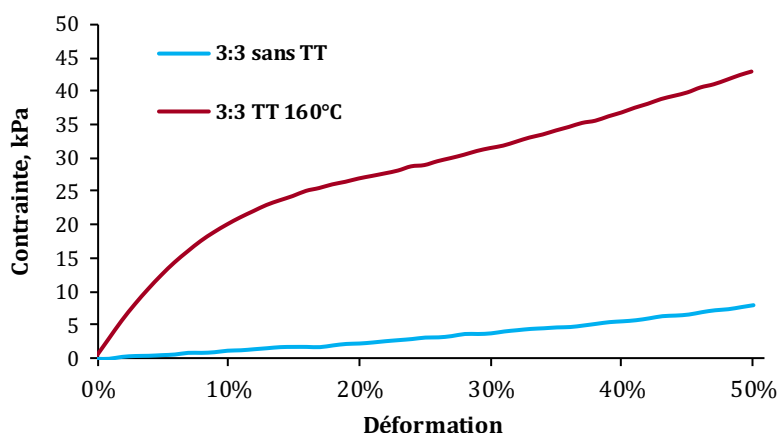
**Figure 63.** Pourcentage de porosité disponible interconnectée pour permettre le passage d'un objet de taille définie dans l'éponge CHT/PCDs avec TT à 160°C. Le graphique a été fait à partir des données apportées par le  $\mu$ -CT.

Un scaffold pour l'ITO doit contenir des pores de différentes tailles<sup>(73-76)</sup>. Les macropores (100-350  $\mu\text{m}$ ) permettent la croissance cellulaire et tissulaire *in vivo*, et l'invasion du système vasculaire ; tandis que les micropores (< 20  $\mu\text{m}$ ) présentent une surface spécifique plus grande qui vont favoriser l'adsorption des biomolécules<sup>(75)</sup>. L'éponge CHT/PCDs répond aux critères demandés, en ce qui concerne la porosité et l'interconnectivité pour une application en ITO.

## 2.6. Test mécanique de compression

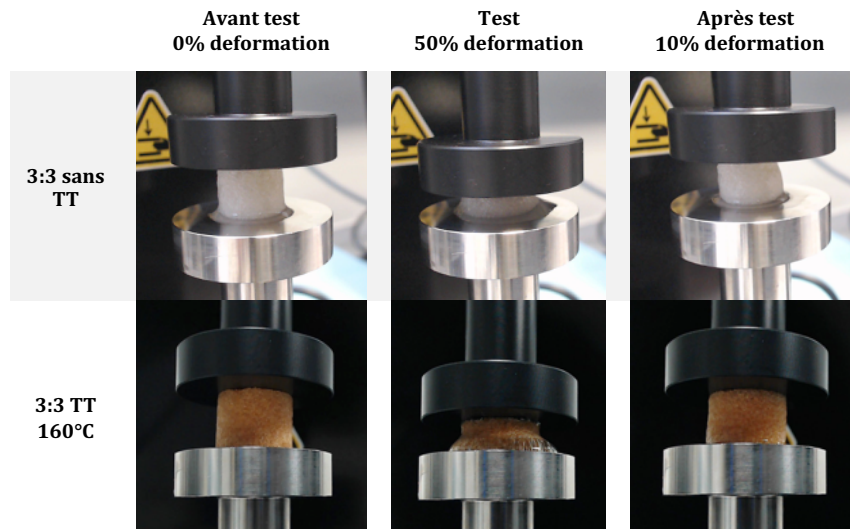
Les propriétés mécaniques de l'éponge sont importantes pour son application en tant que scaffold pour l'ITO. A cet effet, les éponges réhydratées avec et sans TT ont été évaluées par rapport à leur comportement mécanique sous compression. Les courbes de contrainte-déformation (Figure 64) des éponges montrent des profils très différents. L'éponge traitée thermiquement a montré des valeurs de contrainte significativement supérieures à celles de l'éponge sans TT. La courbe de contrainte-déformation de l'éponge traitée thermiquement a

montré deux régions caractéristiques des matériaux élastiques<sup>(163,191)</sup>. La première région présente une augmentation très rapide de la contrainte aux faibles déformations et comprend la région élastique linéaire initiale (entre 1 et 10% de déformation). Puis, la deuxième région est représentée par un « plateau » où les contraintes présentent une augmentation à déformations élevées (jusqu'à 50%). La phase appelée « rupture » ne peut pas être observée car le test a été arrêté à 50% de déformation.



**Figure 64.** Courbe de contrainte-déformation en compression représentatives de l'éponge CHT/PCDs avec et sans TT à 160°C après immersion dans PBS pendant 2 h, testées à température ambiante. La courbe correspond aux valeurs moyennes de trois répétitions (n=3).

Le module élastique de compression ( $E$ ) a été calculé à partir de la région linéaire de la courbe contrainte-déformation pour les deux éponges et a été de  $256 \pm 4$  kPa et de  $12 \pm 1$  kPa, pour l'éponge traitée thermiquement et pour l'éponge sans TT, respectivement. La valeur de la contrainte à 50% de déformation a été de  $42,92 \pm 0,04$  kPa et de  $7,84 \pm 0,01$  kPa pour l'éponge avec et sans TT, respectivement. Ces résultats confirment le renforcement des propriétés mécaniques des éponges réticulées thermiquement en comparaison avec les éponges sans TT. D'un autre côté, malgré la différence dans le module de compression, les deux éponges avec et sans TT ont démontré une récupération totale après la compression (50%) dans l'appareil d'essais mécaniques avec une cellule de charge de 10 N (Figure 65).



**Figure 65.** Images représentatives des éponges CHT/PCDs avec et sans TT lors du test de compression. À gauche, les éponges au début de l'analyse ; au milieu, les éponges comprimées à 50% de déformation ; à droite, les éponges ont récupéré leur forme à la fin du test.

Les scaffolds à base de polymères biodégradables montrent des propriétés mécaniques plus faibles que celles des biocéramiques<sup>(5)</sup>. Par exemple, Laasri *et al.*<sup>(287)</sup> ont rapporté un module de Young de 97 GPa pour un scaffold d'HAp (287) et Kuo *et al.*<sup>(288)</sup> ont rapporté un module de compression de  $170 \pm 6$  kPa pour une éponge hémostatique commerciale à base de gélatine (Spongostan™) laquelle a servi pour la différenciation cellulaire de pré-ostéoblastes. Felfel *et al.*<sup>(162)</sup> ont élaboré des éponges à différents ratios de CHT/Alginate et des valeurs du module de compression entre 50 et 130 kPa ont été rapportés pour des éponges mouillées.

L'os spongieux est aussi un matériau viscoélastique, et présente un module de compression compris entre 0,1 - 2 GPa<sup>(73)</sup>. Par conséquent, la valeur du module de compression de l'éponge traitée thermiquement est beaucoup plus faible que celle de l'os. La rigidité d'un substrat est un facteur important pour réguler la fonction des ostéoblastes notamment leur différenciation<sup>(26)</sup>, bien qu'on ne connaisse pas le mécanisme. Il a été rapporté que les substrats rigides avec un module de Young de 134 kPa favorisent la différenciation ostéoblastique<sup>(289)</sup>. Malgré les caractéristiques mécaniques de l'éponge CHT/PCDs, l'adhésion et la prolifération cellulaire peuvent être envisagées. Donc plus d'études sont nécessaires pour élucider l'adéquation de la rigidité de notre éponge à la fonction de l'ostéoblaste.

D'ailleurs, les propriétés mécaniques de l'éponge peuvent être améliorées en ajoutant une phase minérale comme il a été démontré par Beşkardeş *et al.*<sup>(260)</sup> pour une éponge de CHT composite élaborée avec des perles et de la poudre d'HAp, respectivement. Dans ce cas, le module de compression a été augmenté de 295 kPa (éponge du CHT seule) à 1 399

et 928 kPa pour les éponges composites contenant des perles et de la poudre d'HAp, respectivement.

En conclusion, l'éponge CHT/PCDs soumise à un traitement thermique (TT) présente une meilleure stabilité par rapport à celle sans TT. Ainsi, l'éponge traitée à 160°C a démontré un gonflement élevé et une dégradation lente. Cette éponge a montré aussi une porosité adaptée aux exigences pour son utilisation dans l'ITO. Enfin, le module de compression obtenu a été 20 fois plus élevé que celle de l'éponge sans TT.

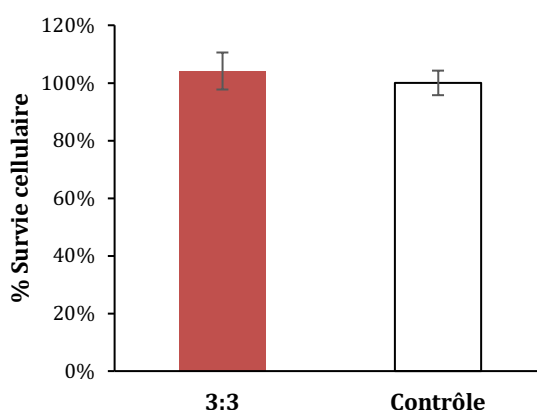
### 3. Étude des propriétés biologiques de l'éponge CHT/PCDs

L'éponge traitée à 160°C a été bien caractérisée par ses propriétés physicochimiques et mécaniques, ensuite sa cytocompatibilité a été évaluée selon la norme ISO-10993 par les méthodes de contact indirect et direct.

#### 3.1. Cytotoxicité – Méthode de contact indirect

Sachant qu'un TT du CHT à température élevée peut être contraignante d'un point de vue cytotoxicité en raison de la formation possible de composants toxiques lors de la réaction de Maillard (réaction chimique entre les groupes amines et carboxyle du CHT)<sup>(290)</sup>, il est nécessaire d'évaluer la cytotoxicité de nos éponges.

La Figure 66 présente le résultat de cytotoxicité de l'éponge CHT/PCDs (pré-conditionnée pendant 2 h dans milieu de culture), laquelle a montré un taux de survie cellulaire de  $104 \pm 6\%$  par rapport au contrôle ( $p > 0,05$ ). Enfin, il est donc clair que les éponges réticulées à 160°C pendant 90 minutes ne sont pas du tout cytotoxiques.



**Figure 66.** Viabilité cellulaire des éponges CHT/PCDs avec un TT à 160°C en utilisant la méthode de contact indirect avec les cellules pré-ostéoblastes MC3T3-E1 ( $p > 0,05$ ). Le test a été répété 3 fois ( $n=3$ ).

#### 3.2. Viabilité et adhésion cellulaire – Méthode de contact direct

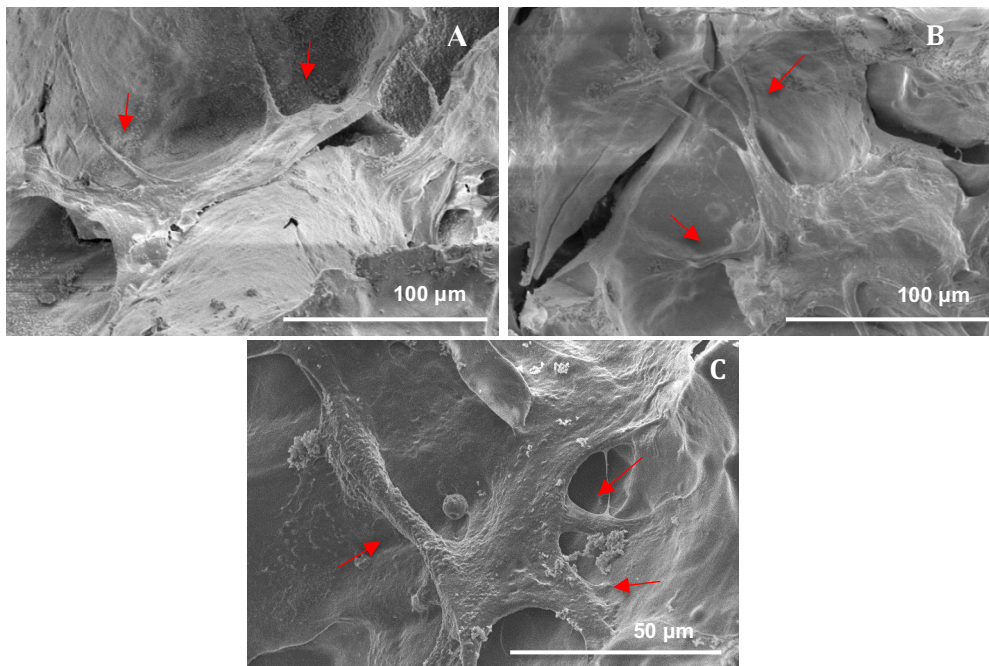
En plus des substances potentiellement toxiques éluées de l'éponge (évalué par la méthode indirecte), la surface de l'éponge joue aussi un rôle important dans l'interaction entre les cellules et l'éponge, e.g. l'adhésion, la prolifération et/ou la différenciation des cellules<sup>(260)</sup>.

Afin de mettre en évidence les interactions matériaux-cellules, un test de contact direct a été réalisé en utilisant deux types de cellules : pré-ostéoblastes et endothéliales. La viabilité cellulaire et l'adhésion cellulaire seront donc développées ci-dessous.

### 3.2.1. Culture directe avec les cellules pré-ostéoblastes (MC3T3-E1)

#### 3.2.1.1. Observation de l'adhésion cellulaire par MEB

Tout d'abord, la Figure 67A-C montre les images MEB de cellules pré-ostéoblastes (MC3T3-E1) dans l'éponge CHT/PCDs après 3 jours de culture statique. La morphologie cellulaire est clairement caractéristique : sur la surface de l'éponge des parois des pores, les cellules adhérentes ont montré une forme polygonale bien étalées avec la présence de lamellipodes et filopodes (flèches rouges), qui jouent un rôle central dans la modulation de l'adhésion cellulaire au cours de la phase d'étalement. De plus, les cellules ont montré des surfaces dorsales rugueuses (synthèse et sécrétion active d'ECM), propriété caractéristique des ostéoblastes actifs<sup>(291)</sup>. Ainsi, les cellules ont été parfaitement adhérentes aux parois des pores dans l'éponge.



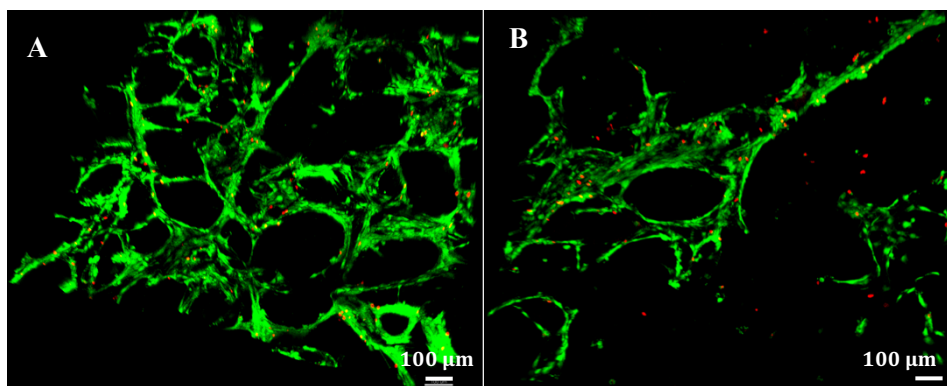
**Figure 67.** Images MEB des cellules pré-ostéoblastes MC3T3-E1 adhérentes sur l'éponge CHT/PCDs traitées à 160°C après 3 jours de culture statique. Grossissement (A, B)  $\times 500$  et (C)  $\times 1000$ . Flèches rouges : filopodes.

Ces résultats ont également été observés dans le travail de Ran *et al.*<sup>(292)</sup> pour les scaffolds de CHT avec des pores anisotropes ensemencés avec le même type de cellules (MC3T3-E1). Les cellules pré-ostéoblastes, adhérentes aux pores, ont montré une morphologie fusiforme et polygonale et elles ont proliféré durant 7 jours de culture<sup>(292)</sup>. Amaral *et al.*<sup>(291)</sup> ont aussi démontré une bonne adhésion et prolifération des cellules ostéoblastes humains (MG-63) sur les éponges de CHT ayant différents DD. Les cellules adhérentes à la surface des

éponges avec un DD élevé (>87%) ont présenté les meilleurs résultats par rapport aux autres DD, et les cellules ont montré de longs filopodes et de nombreuses interactions cellules-cellules<sup>(291)</sup>. Donc, il est confirmé les scaffolds à base de CHT montrent une bonne interaction avec les ostéoblastes.

### 3.2.1.2. Test de viabilité cellulaire par kit LIVE/DEAD®

D'un autre côté, le test LIVE/DEAD® a été réalisé dans l'éponge CHT/PCDs cultivée avec des cellules MC3T3-E1 pendant 3 et 6 jours pour observer par fluorescence les cellules vivantes (fluorescence verte) et les cellules mortes (fluorescence rouge) dans la structure poreuse de l'éponge. La Figure 68 montre les images de microscopie fluorescente de cellules MC3T3-E1 sur l'éponge. Il a été constaté que l'éponge a été totalement occupée et colonisée par des cellules vivantes ont été prédominantes après 3 et 6 jours de culture. Ceci nous a confirmé la bonne cytocompatibilité de l'éponge grâce à un bon transfert d'oxygène et des nutriments à travers des pores. Amirian *et al.*<sup>(270)</sup> ont démontré, la bonne viabilité cellulaire et une excellente prolifération des cellules MC3T3-E1 ensemencées dans une éponge composite à base de gélatine/pectine/BCP après 1, 3 et 7 jours de culture<sup>(270)</sup>. De plus, les cellules ont proliféré plus rapidement dans les éponges composites contenant les FC (BMP-2 et VEGF) que dans l'éponge sans FC, ce qui confirme l'efficacité de la stratégie de charger des FCs dans le scaffold pour améliorer la réaction biologique.



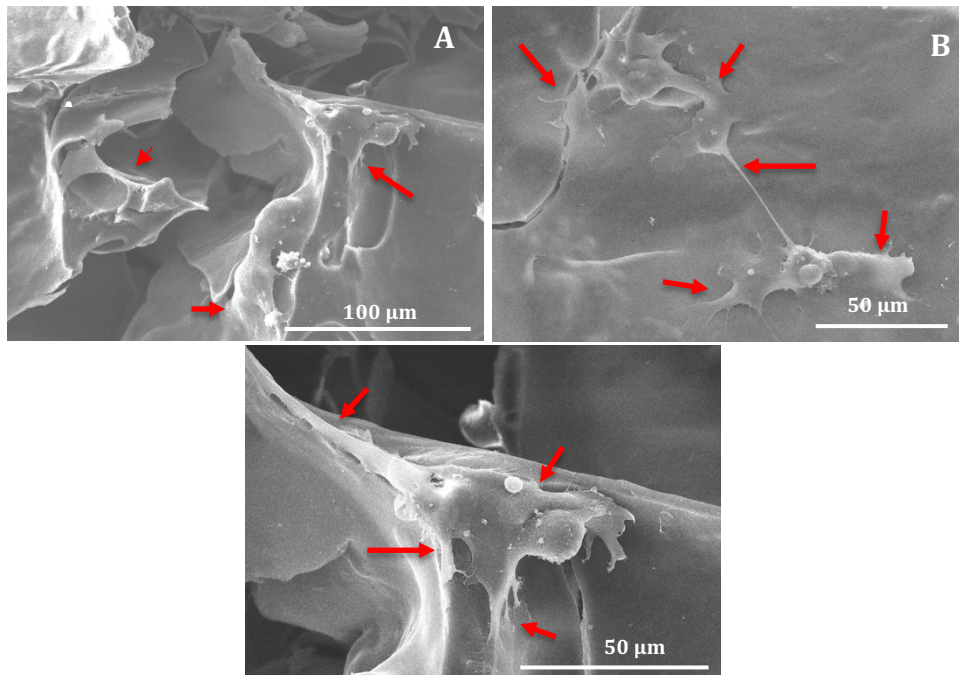
**Figure 68.** Images 2D de microscopie confocale à fluorescence du test LIVE/DEAD® de cellules pré-ostéoblastes MC3T3-E1 dans l'éponge CHT/PCDs après (A) 3 jours et (B) 6 jours de culture statique. Vert : cellules vivantes, rouge : cellules mortes.

## 3.2.2. Culture directe statique avec cellules endothéliales (HUVECs)

### 3.2.2.1. Observation de l'adhésion cellulaire par MEB

La réponse cellulaire a ensuite été évaluée en utilisant des cellules primaires endothéliales (HUVECs). La Figure 69A-C montre les images des cellules endothéliales dans l'éponge : les cellules sont bien adhérentes et étalées sur la surface de l'éponge et montrent une morphologie polygonale avec des filopodes (flèches rouges). Il convient de remarquer que, les cellules primaires (comme les HUVECs) sont beaucoup plus sensibles et fragiles lors

de la manipulation par rapport aux cellules immortalisées (comme les MC3T3-E1). Par conséquent, les résultats obtenus ici, montrant une bonne adhésion cellulaire des HUVECs sur les éponges CHT/PCDs, sont très encourageantes pour leur application en tant que scaffold pour l'ITO. Mohandas *et al.*<sup>(293)</sup> ont également démontré une excellente adhésion de cellules endothéliales HUVECs, qui ont été bien étalées sur la surface d'une éponge CHT/acide hyaluronique après 24 h et 48 h de culture. Ils ont aussi montré une prolifération cellulaire plus importante une fois chargé VEGF dans les éponges<sup>(293)</sup>. Donc, cela montre l'avantage d'ajouter du VEGF dans l'éponge pour améliorer encore la réponse cellulaire.



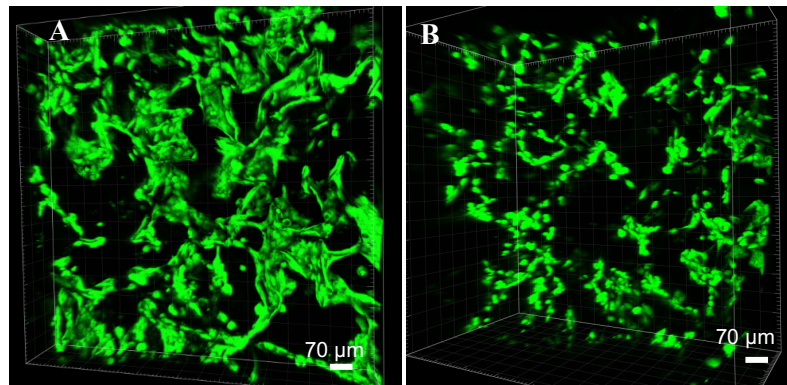
**Figure 69.** Images MEB des cellules endothéliales HUVECs adhérentes sur l'éponge CHT/PCDs avec un TT à 160°C après 3 jours de culture statique. Grossissement (A)  $\times 500$ , (B)  $\times 700$  et (C)  $\times 1000$ . Flèches rouges : filopodes.

### 3.2.2.2. Test de viabilité cellulaire par kit LIVE/DEAD®

La viabilité cellulaire des HUVECs dans l'éponge a été analysée par le test LIVE/DEAD®. De la même manière à ce qui a été observé pour les cellules MC3T3-E1, les cellules HUVECs ont parfaitement adhéré et ont bien colonisé l'éponge après 3 et 6 jours de culture (Figure 70). De même, les cellules vivantes (fluorescence vert) étaient en très grand nombre et les cellules mortes (fluorescence rouge) étaient très rares.

Néanmoins, nous avons aussi constaté que le nombre de cellules présentes dans l'éponge après 6 jours de culture tend à être inférieur à celui du 3<sup>ème</sup> jour pour les deux types de cellules. Cela peut être dû aux conditions de culture statique, qui ne permettent pas un échange constant d'éléments nutritifs et de métabolites au sein de l'éponge. C'est donc qu'une culture dynamique est nécessaire pour les scaffolds 3D.





**Figure 70.** Images 2D de microscopie fluorescente du test LIVE/DEAD de cellules HUVECs dans l'éponge CHT/PCDs après (A) 3 jours et (B) 6 jours de culture statique. Vert : cellules vivants, rouge : cellules mortes.

En conclusion, il a été démontré que les éponges sont capables d'agir en tant que bio-support pour l'adhésion et la prolifération cellulaire avec les cellules pré-ostéoblastes et les cellules endothéliales, qui garantit ainsi à la fois la régénération osseuse et la formation des vaisseaux sanguins à l'intérieur du scaffold. En conséquence, la suite va être la biofonctionnalisation de ce biomatériau avec le VEGF pour favoriser le recrutement et la prolifération des cellules endothéliales. Ensuite, la méthode de contact direct devra être aussi réalisée afin d'évaluer sa cytocompatibilité.

#### 4. Chargement des éponges avec VEGF : Évaluation de la libération et leur bio-activité

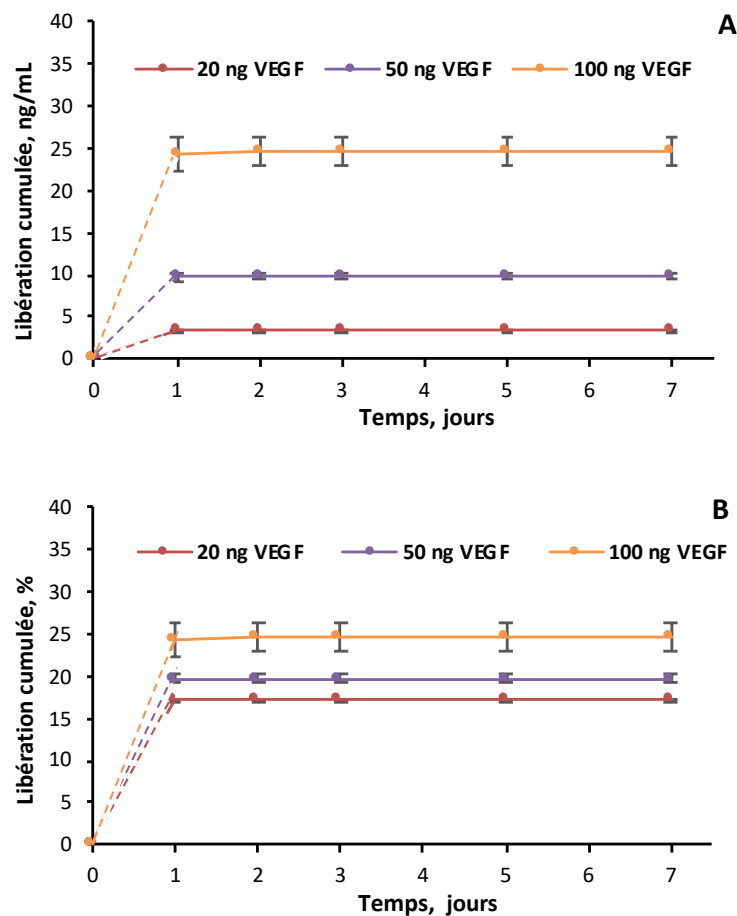
Après d'avoir démontré que l'éponge CHT/PCDs était cytocompatible par l'évaluation de l'adhésion cellulaire et la viabilité cellulaire en contact direct avec des cellules pré-ostéoblastes et endothéliales, l'élaboration des éponges chargées de biomolécule (VEGF) a été prise en considération. En ITO, la stimulation de la vascularisation à l'intérieur du biomatériau est une phase fondamentale pour la régénération osseuse, mais reste encore un défi. Selon le principe de l'ITO *in situ*, l'incorporation par adsorption d'un FC angiogénique a été réalisée dans ce travail. Ainsi, les éponges ont été chargées avec VEGF à trois concentrations (choisies selon la littérature)<sup>(265)</sup> : 20 ng, 50 ng et 100 ng par éponge. Par la suite, la cinétique de libération du VEGF dans deux milieux (PBS et le milieu de culture ECM enrichi avec 0,5% de SVF -sérum de veau fœtal) et la bio-activité (pro-migration et pro-prolifération) du VEGF libéré envers les cellules endothéliales ont été étudiées.

##### 4.1. Libération du VEGF

Tout d'abord, le profil de libération du VEGF des éponges a été étudié dans le PBS et le milieu de culture ECM enrichi avec 0,5% de SVF. Pour évaluer la cinétique de libération statique du VEGF, le milieu de libération a été récupéré et renouvelé intégralement pour chaque temps, et la concentration du VEGF a été mesurée par la méthode ELISA.

#### 4.1.1. Libération dans PBS

La Figure 71 montre le profil de libération du VEGF dans le PBS à 37°C. Pour les trois concentrations testées, la libération du VEGF n'excède pas 24 heures dans les conditions appliquées, car la VEGF n'était plus détecté à partir du 2<sup>ème</sup> jour. Il faut remarquer que la quantité totale de VEGF libéré est proportionnelle à la quantité initiale chargée, l'éponge avec une charge initiale plus élevée (100 ng VEGF) a montré la quantité totale libéré (24,7 ± 1,8 ng) la plus haute ( $p < 0,05$ ) comparativement à l'éponge chargée avec 20 ng de VEGF (3,4 ± 0,1 ng) ou celle chargée avec 50 ng de VEGF (9,9 ± 0,1 ng) (Figure 71A). Ainsi, en faisant varier la quantité de charge initiale, la libération de VEGF pourrait être ajustée à la dose bioactive requise.



**Figure 71.** Profils de libération cumulative *in vitro* exprimés en (A) ng/mL et (B) en pourcentage, des éponges CHT/PCDs chargées avec 20, 50 et 100 ng de VEGF dans le PBS (pH 7,4) à 37°C en conditions statiques. Le test a été répété 2 fois (n=3).

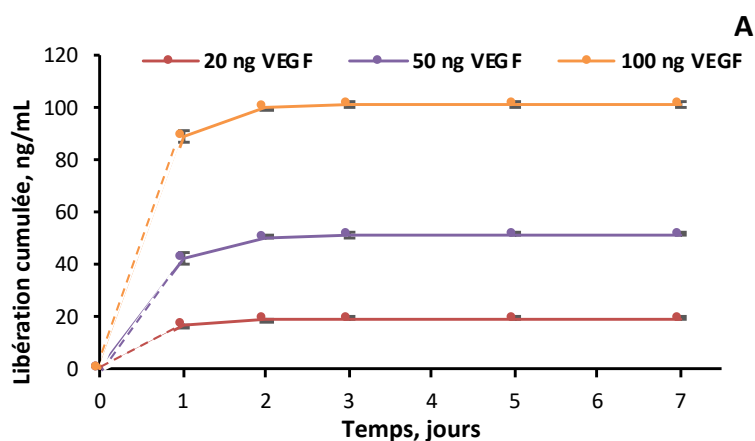
Cependant, nous avons aussi constaté que la quantité totale de VEGF libérée par rapport à la quantité initiale chargée n'était pas de 100%. Ainsi, les pourcentages de VEGF libérée à partir des éponges chargées avec 20 ng, 50 ng et 100 ng de VEGF étaient respectivement de 17,2%, 19,6%, et 24,7% de la quantité initiale chargée (Figure 71B). Ce phénomène peut être dû à la dégradation lente de l'éponge, donc la biomolécule piégée dans

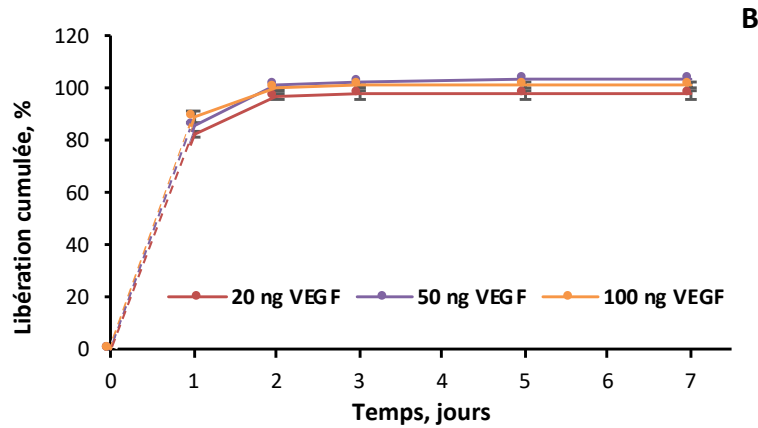
la microstructure de l'éponge n'est pu pas être libérée par le mécanisme d'érosion. Également, le VEGF a peut-être été dénaturé ou dégradé progressivement pendant la durée du test (l'imprégnation et libération à 37°C), induisant ainsi une diminution du taux de libération. Gnani *et al.*<sup>(265)</sup> ont montré des résultats similaires pour un hydrogel à base de gélatine, qui a été chargé de VEGF à différentes concentrations. Ainsi, dans milieu de culture sans SVF, ils ont obtenu un pourcentage de libération de seulement 27%<sup>(265)</sup>.

Par ailleurs, dans la littérature, certaines études ont été réalisées dans un milieu de culture enrichi en SVF, en raison de sa grande ressemblance avec le milieu physiologique. Nous avons donc effectué le test dans un milieu enrichi à 0,5% SVF.

#### 4.1.2. Libération dans milieu enrichi avec 0,5% SVF

La cinétique de libération du VEGF a été évaluée dans le milieu de culture ECM enrichi avec 0,5% de SVF. Les profils de libération sont illustrés sur la Figure 72. Les trois groupes évalués montrent un profil de libération similaire et rapide d'environ 85% le 1<sup>ère</sup> jour. Puis, la quantité de VEGF libérée est devenue plus faible en atteignant une libération cumulative finale à 7 jours de 19,5 ± 0,3 ng, 51,5 ± 13,9 ng et 101,1 ± 0,7 ng pour les éponges chargées de 20, 50 et 100 ng VEGF, respectivement (Figure 72A). La libération au 1<sup>er</sup> jour sera approfondie ci-après. De manière similaire à ce qui a été trouvé avec la libération dans le PBS, la quantité totale de VEGF libérée est proportionnelle à la quantité initiale chargée. Cependant, à différence des résultats obtenus dans PBS (entre 17 et 25%), la totalité de la quantité de VEGF chargée a été libérée. Ainsi, les trois groupes atteignent 97,5 ± 1,6%, 102,9 ± 27,7% et 101,1 ± 0,7% par rapport à la quantité initiale chargée (Figure 72B).





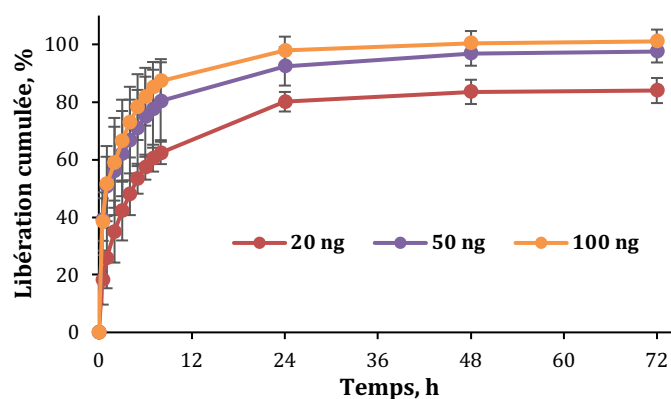
**Figure 72.** Profils de libération cumulative *in vitro* exprimés en (A) ng/mL et (B) en pourcentage, des éponges CHT/PCDs chargées avec 20, 50 et 100 ng de VEGF dans le milieu de culture ECM enrichi avec 0,5% SVF à 37°C sous conditions statiques. Le test a été répété 2 fois (n=3).

Plusieurs hypothèses peuvent être émises. Soit, le VEGF est dégradé plus rapidement dans le PBS que dans le milieu enrichi en SVF ; soit le SVF facilite la libération du VEGF. Cela pourrait s'expliquer par une interaction entre le VEGF et l'albumine, qui est la protéine la plus abondante dans le plasma sanguin humain et le SVF. Cette molécule peut servir de véhicules (« carriers ») pour les biomolécules à faible hydrosolubilité via les ligands hydrophobes de l'albumine<sup>(294)</sup>. De plus, l'albumine est capable de protéger un certain nombre d'enzymes ou de FCs de l'inactivation et de l'agrégation thermique, dit « effet chaperon »<sup>(294)</sup>. Ainsi, l'albumine pourrait faciliter la libération du VEGF via sa fonction de véhicule et le protéger de la dégradation.

D'un autre côté, la libération du VEGF dans notre étude a été relativement rapide (7 jours) dans le milieu enrichi en SVF, ce qui peut s'expliquer par la méthode d'incorporation du VEGF dans les éponges. Le VEGF a été chargé sur l'éponge par le mécanisme d'adsorption (interaction de faible énergie), qui d'un côté affecte peu la structure de la protéine par rapport aux autres mécanismes (Tableau 7, partie 1) ; mais de l'autre côté produit la libération rapide de VEGF par diffusion une fois en contact avec le milieu aqueux. Li *et al.*<sup>(97)</sup> ont démontré qu'une libération du VEGF dès le début (surtout les 3 premiers jours) peut favoriser l'établissement d'une microcirculation locale très importante pour la régénération osseuse sur un modèle *in vivo* chez les souris<sup>(97)</sup>. En tenant compte de cette publication, malgré la libération rapide du VEGF, nos éponges pourraient tout de même induire la formation de vaisseaux sanguins et garantir la formation de microcirculation dans la phase critique (3 premiers jours)<sup>(97)</sup>.

Afin d'évaluer de manière plus approfondie la libération rapide pendant le 1<sup>er</sup> jour, la libération a été évaluée avec des prélèvements (et renouvellement de milieu) plus fréquemment pendant 3 jours, les résultats sont présentés sur la Figure 73. Dans ce cas, la

cinétique de libération du VEGF révèle un « burst » initial d'environ 40% de la quantité totale dès la première demi-heure pour les 3 concentrations, suivi d'une libération modérée et soutenue pendant 24 h. Ce type de profil de libération est typique de ce mécanisme (*i.e.* l'adsorption non-spécifique de biomolécules). Finalement, les éponges ont libéré quasiment la totalité de VEGF chargé initialement, soit  $84,0 \pm 4,4\%$ ,  $97,5 \pm 3,8\%$  et  $100,4 \pm 4,2\%$  de VEGF à 3 jours de libération pour les concentrations respectives de 20, 50 et 100 ng de VEGF.



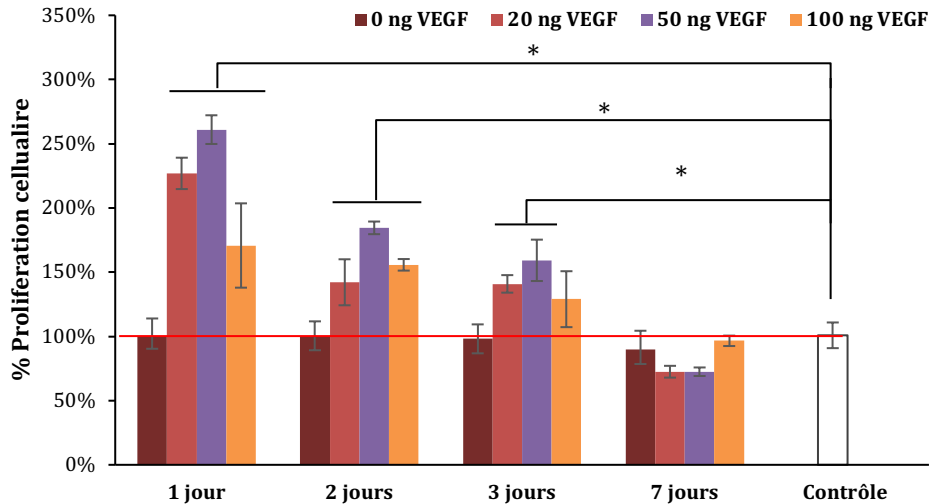
**Figure 73.** Profils de libération statique *in vitro* des éponges CHT/PCDs chargées avec 20, 50 et 100 ng de VEGF dans le milieu de culture ECM enrichi avec 0,5% SVF à 37°C. Le test a été répété 2 fois (n=3).

#### 4.2. Évaluation de la bio-activité du VEGF libéré

Après avoir étudié la cinétique de libération de VEGF, il est impératif d'évaluer son bio-activité intrinsèque vis-à-vis les cellules endothéliales. Pour cela, nous avons évalué deux propriétés importantes lors de la vascularisation : la prolifération et la migration des cellules endothéliales (HUVECs).

##### 4.2.1. Prolifération cellulaire

La Figure 74 montre le pourcentage de prolifération cellulaire au bout de 48 h des cellules HUVECs en contact avec le milieu de libération contenant le VEGF en comparaison au contrôle (milieu de culture avec 0,1% SVF). La libération de l'éponge sans VEGF n'a montré aucun effet pro-prolifération. D'un autre côté, une prolifération cellulaire supérieure significative ( $p < 0,05$ ) au contrôle peut être observée jusqu'à 3<sup>ème</sup> jour de libération pour les trois groupes (20, 50 et 100 ng de VEGF chargé par éponge). Néanmoins, il n'y a pas de différence significative entre chaque concentration ( $p > 0,05$ ). En revanche, pour les trois groupes, la VEGF libérée du 3<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour ne présente plus d'effet « pro-prolifération » sur les cellules HUVECs. Ces résultats révèlent que, a priori, en condition de culture cellulaire, une concentration de VEGF inférieure à  $0,23 \pm 0,05$  ng/mL n'influence plus la prolifération des cellules HUVECs (Tableau 17).



**Figure 74.** Bio-activité du VEGF libéré dans le milieu de culture ECM enrichi par 0,1% SVF à 37°C basée par la prolifération cellulaire en utilisant les cellules endothéliales HUVECs (\* $p < 0,05$ ). Le test a été répété 2 fois ( $n=2$ ).

**Tableau 17.** Concentration de VEGF libéré dans 7 jours dans milieu de culture ECM enrichi de 0,1% SVF.

Éponge VEGF Libération	Concentration		
	20 ng	50 ng	100 ng
Jour	Concentration (ng/mL)	Concentration (ng/mL)	Concentration (ng/mL)
1	18,5 ± 0,80	43,17 ± 3,00	84,26 ± 4,78
2	1,95 ± 0,06	6,12 ± 2,60	11,03 ± 0,99
3	0,23 ± 0,05	0,92 ± 0,53	1,82 ± 1,27
7	0,05 ± 0,00	0,10 ± 0,15	0,24 ± 0,03

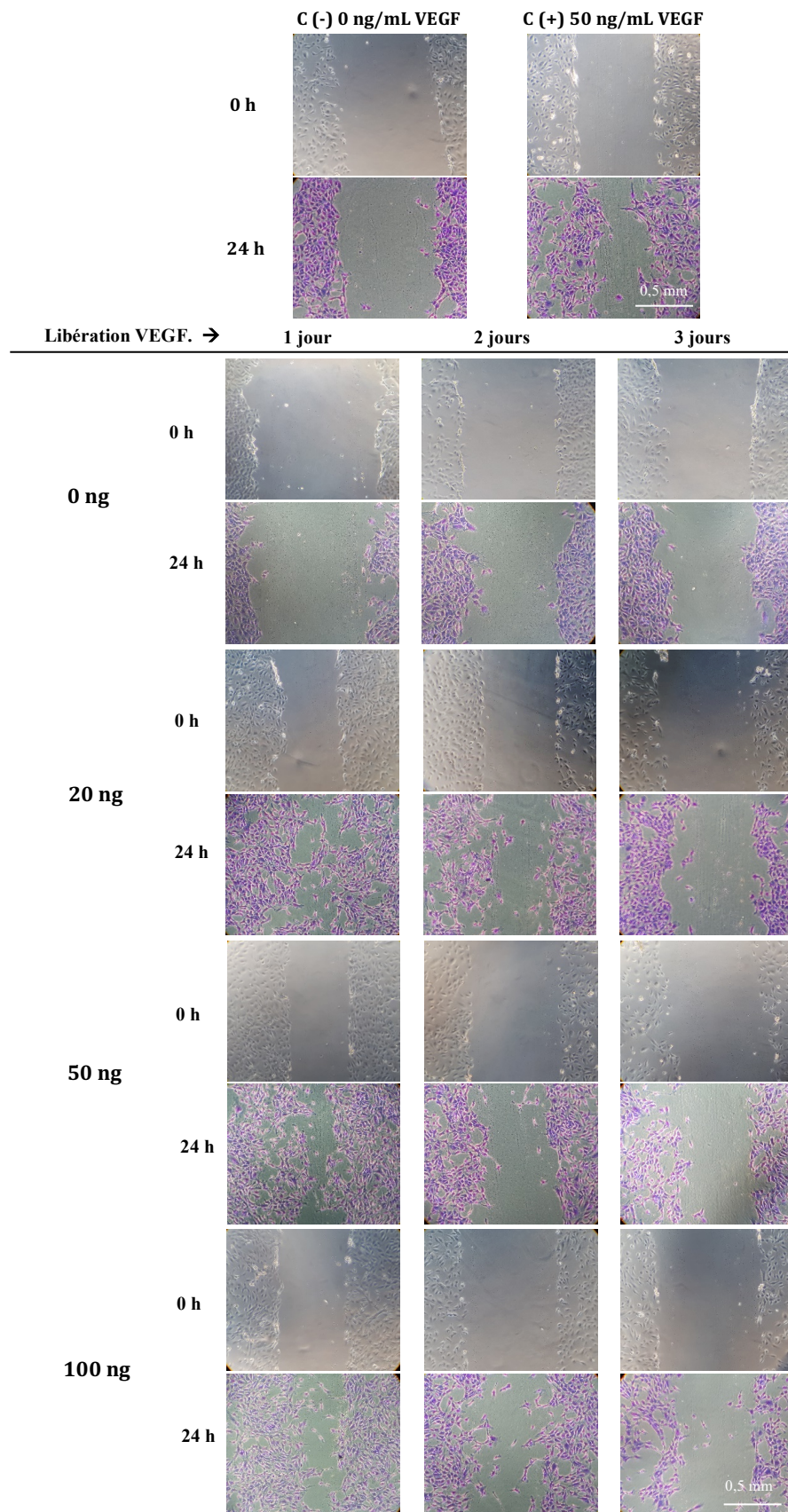
#### 4.2.2. Migration cellulaire

Par la suite, en prenant en compte les résultats obtenus par le test de libération de VEGF et son effet sur la prolifération cellulaire, l'activité de la pro-migration cellulaire de VEGF libérée a été évaluée seulement sur 3 jours de libération. Basées sur la littérature<sup>(255,272,273)</sup>, deux méthodes couramment utilisées : la technique de blessure/cicatrisation et test de migration « Transwell », ont été appliquées comme suit.

##### 4.2.2.1. Technique de blessure/cicatrisation

Par cette technique, la capacité du VEGF libéré pour favoriser la « cicatrisation » d'une blessure faite sur une monocouche cellulaire a été évaluée. L'effet cicatrisant mis en évidence par cette technique englobe les étapes de migration et prolifération cellulaire, cependant ce dernier est minimisé en utilisant le milieu pauvre en SVF<sup>(255)</sup>. La

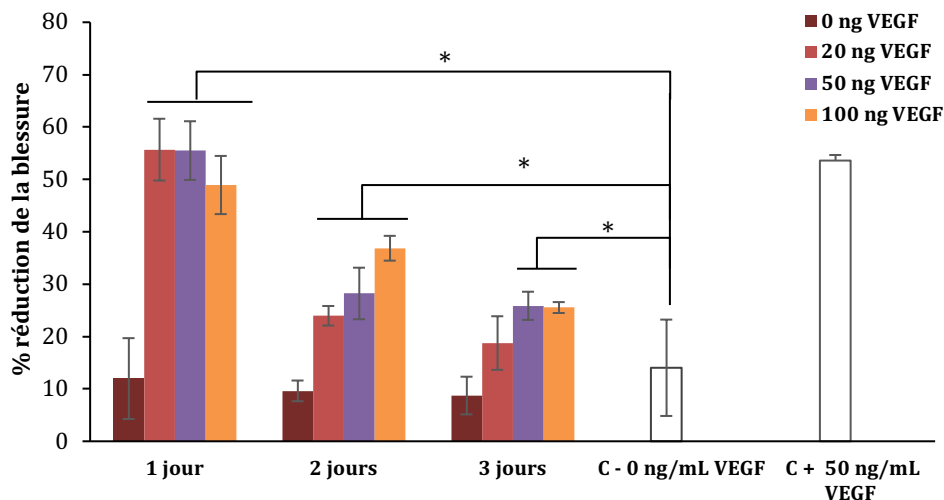
Figure 75 montre les images représentatives lors de la création de la blessure (0 h) et la cicatrisation par la migration des cellules HUVECs après 24 h.



**Figure 75.** Images représentatives de la migration des cellules HUVECs en utilisant le test de blessure par griffe en contact avec VEGF libéré dans le milieu de culture ECM enrichi par 0,5% SVF à 37°C. Les images montrent que les cellules ont migré pour fermer la blessure après 24 h d'incubation. Le test a été répété 2 fois (n=2).

D'abord, nous pouvons observer que, pour le contrôle négatif (0 ng/mL VEGF), la migration des cellules au bord de la blessure après 24 h a été imperceptible. En revanche, le contrôle positif, avec une concentration définie de VEGF à 50 ng/mL, a clairement montré la migration des cellules et la réduction importante de largeur de la blessure. En conséquence, la méthode appliquée ici est efficace pour montrer l'effet pro-migration de VEGF. D'un autre côté, la libération de l'éponge sans VEGF (0 ng/mL) n'a montré aucun effet pro-migration.

Dans ce contexte, pour toutes les concentrations (20, 50 et 100 ng), le VEGF libéré le 1<sup>er</sup> jour ont montré une effet pro-migration cellules par rapport au contrôle négatif (0 ng VEGF), dont une réduction importante de la largeur de la blessure est bien visible. Tandis que le VEGF libéré du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour ont montré d'effet de pro-migration plus faible ; le VEGF libérée cumulative du 3<sup>ème</sup> au 7<sup>ème</sup> jour ne présente plus du tout de bio-activité sur les cellules HUVECs. Cette tendance est assez similaire à celle que nous avons trouvée dans le test ci-dessus pour l'effet du test de pro-prolifération.



**Figure 76.** Analyse quantitative de l'effet pro-migration de VEGF libéré exprimé en pourcentage relatif de la réduction de la blessure d'une monocouche de cellules HUVECs. Le test a été répété 2 fois (n=2).

Les pourcentages de réduction de la blessure, présentés dans la

Figure 75 et obtenus par ImageJ, confirment bien l'observation ci-dessus. La réduction de la largeur de la blessure a été d'environ 55% pour tous les groupes par VEGF libéré du 1<sup>er</sup> jour, qui est significativement plus fort ( $p < 0,05$ ) par rapport celui du contrôle négatif (15%). Puis, pour les trois concentrations, la réduction de la blessure par VEGF libéré de 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour est devenue plus faible, d'environ de 30% et 20% respectivement, qui pourtant a été toujours plus fort ( $p < 0,05$ ) que celui du contrôle négatif.

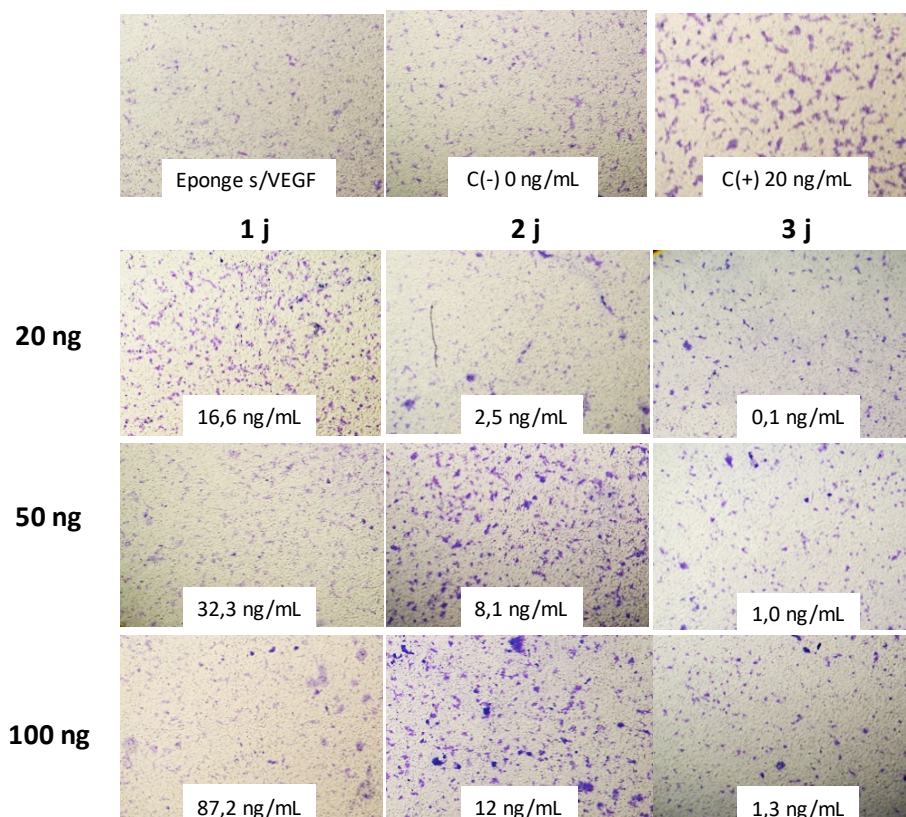
Il convient de remarquer que par rapport au contrôle positif, en regardant le VEGF libéré du 1<sup>er</sup> jour, les trois groupes d'éponges n'ont pas montré de différences significatives ( $p > 0,05$ ), malgré la concentration de VEGF libéré du 1<sup>er</sup> jour a été de  $84,26 \pm 4,78$  ng/mL (Tableau 17)



pour l'éponge de 100 ng VEGF, qui est pourtant bien plus fort que contrôle positif (50 ng /mL). De plus, les trois concentrations n'ont pas montré de différences significatives ( $p>0,05$ ) entre eux, malgré que les concentrations de VEGF libéré ( $18,5 \pm 0,80$  ng /mL,  $43,17 \pm 3,00$  ng /mL et  $84,26 \pm 4,78$  ng /mL, respectivement) sont bien différent entre eux. D'un autre côté, le VEGF libéré du 2<sup>ème</sup> et 3<sup>ème</sup> jour de tous les groupes (moins de 11 ng/mL de VEGF) a montré une plus faible réduction de la blessure que contrôle positif ( $p<0,05$ ). Ces résultats montrent que, dans les conditions de test appliquées, en dessous d'un certain seuil (par exemple, 18 ng/mL), le VEGF induit une migration cellulaire sur HUVECs d'une manière dose-dépendante ; mais au-delà, l'effet pro-migration du VEGF ne se renforcera plus avec une concentration croissante.

#### 4.2.2.2. Test de migration « Transwell »

Une deuxième technique, la migration à travers d'une membrane « Transwell », a été réalisé pour encore évaluer l'effet du VEGF libéré sur la migration des cellules HUVECs. La Figure 77 montre les images représentatives de la migration des cellules HUVECs à travers d'une membrane de polycarbonate (8  $\mu$ m) après 4 h de culture en réponse au VEGF déposé dans l'autre côté de la membrane.



**Figure 77.** Images représentatives de la migration des cellules HUVECs en utilisant le test d'infiltration (Insert Transwell®) après 4 h en contact du VEGF libéré dans le milieu de culture ECM enrichi par 0,5% SVF à 37°C. Le test a été répété 2 fois (n=2).

D'abord, nous pouvons observer que, pour le contrôle négatif (0 ng/mL VEGF), le nombre des cellules ayant migré a été très faible, pareil que pour le milieu de libération de l'éponge sans VEGF. Par contre, le contrôle positif, avec une concentration de VEGF à 20 ng/mL, a montré une migration cellulaire évidente. De ce fait, cette méthode appliquée ici semble aussi efficace pour montrer l'effet pro-migration de VEGF.

Dans ce contexte, on a constaté que le nombre de cellules ayant migré pour le VEGF libéré du 1<sup>er</sup> jour a été différent pour chaque groupe d'éponge. Le groupe de 20 ng VEGF a montré un effet pro-migration évident, et beaucoup plus de cellules ont migré à travers la membrane que le contrôle négatif. En revanche, les éponges chargées avec 50 et 100 ng VEGF n'ont pas induit autant de migration cellulaire que le contrôle négatif. Cela est peut-être dû à un gradient chimiotactique trop fort vers les cellules présentes de l'autre côté de membrane « Transwell », 32 ng/mL et 87 ng/mL, respectivement pour les éponges chargées de 50 et 100 ng VEGF, ce qui a pu déranger l'adhésion et migration des cellules dans le compartiment supérieur. Ce phénomène n'a pas été observé dans la méthode de blessure/cicatrisation car l'état des cellules dans les deux protocoles ne sont pas comparables. Les cellules avaient déjà bien adhéré au substrat de culture cellulaire avant de faire la blessure et de mettre en présence de VEGF, tandis que pour la méthode « Transwell » les cellules sontensemencées en même temps que l'exposition au VEGF.

Pour le 2<sup>ème</sup> jour de libération, le groupe de 20 ng VEGF n'a pas présenté d'effet sur la migration des cellules ; néanmoins, les éponges avec 50 et 100 ng VEGF ont montré un effet pro-migration cellulaire similaire à celle du contrôle positif. Pour le 3<sup>ème</sup> jour de libération, tous les groupes ne montrent plus de bio-activité (pro-migration) sur les cellules HUVECs. Ici, avec une concentration inférieure à 20 ng/mL, le VEGF semble induire une migration HUVECs d'une manière dose-dépendante.

Ces résultats, clairement non-cohérents avec ceux du test de blessure/cicatrisation (qui a montré un effet sur la migration cellulaire jusqu'à 3 jours de libération), nous rappellent que, même avec le même sujet à tester, les différentes méthodes peuvent aboutir à des conclusions très différentes en fonction de la procédure expérimentale utilisée. Il est donc nécessaire d'appliquer différentes méthodes pour assurer les résultats. Malgré des différences dans les détails de leurs procédures, les deux méthodes pour évaluer la migration cellulaire ont confirmé l'effet pro-migration du VEGF libéré des éponges chargées de VEGF.

Parmi de nombreuses études similaires dans la littérature pour l'ITO, la plupart n'étudient que le comportement de libération du VEGF ; peu d'entre elles vont plus loin dans l'examen de la bio-activité du VEGF libéré *in vitro*, alors qu'elles pourraient être désactivées pour de nombreuses raisons. Ce travail a fait une étude approfondie sur la bio-activité du VEGF libéré,

et a mis en évidence la relation entre la bio-activité et la dose libérée. Il sera aussi intéressant par la suite d'observer la formation des vaisseaux sanguins à l'intérieure de l'éponge biofonctionnalisée.

## 5. Conclusion

En conclusion, nous avons développé et caractérisé des éponges CHT/PCDs de ratio 3:3. La méthode de fabrication en utilisant un système de seringues interconnectées a permis d'obtenir des hydrogels homogènes et donc exploitables pour former éponges par lyophilisation.

Ces éponges ont subi un TT et il a été constaté que celui-ci a induit la formation de liaisons covalentes amides entre les fonctions  $\text{NH}_2$  du CHT et les fonctions  $\text{COOH}$  du PCDs en complément des interactions ioniques. De plus, le traitement thermique a montré un effet sur les propriétés de dégradation et de gonflement des éponges CHT/PCDs. En raison de sa biodégradation lente (dans PBS enrichi avec lysozyme) et de sa forte capacité de gonflement, l'éponge CHT/PCDs traitée à  $160^\circ\text{C}$  a été choisie pour la suite de l'étude. L'éponge traitée à  $160^\circ\text{C}$  a démontré avoir une porosité adaptée aux exigences pour l'ITO et a montré un module de compression beaucoup plus élevé que l'éponge sans TT, réaffirmant ainsi la stabilité donnée par la réticulation thermique.

Après avoir confirmé la cytocompatibilité des éponges par les méthodes indirectes et directes selon la norme ISO-10993 avec cellules pré-ostéoblastes et endothéliales, la bio fonctionnalisation des éponges par l'adsorption de VEGF à trois concentrations a été réalisée. La cinétique de libération de VEGF dans PBS et dans un milieu enrichi de 0,5% de SVF a montré une grande différence. Dans ce dernier, une libération très rapide d'environ 85% au 1<sup>er</sup> jour de libération a été trouvé pour les éponges chargées de différentes concentrations de VEGF, et la libération de VEGF détectable a duré une période de 7 jours.

Ensuite, la bio-activité du VEGF libérée par les éponges a été montrée par son effet pro-prolifération et pro-migration des cellules endothéliales, qui sont deux processus importants lors de la vascularisation de scaffold. Ces résultats sont encourageants pour l'application de l'éponge en tant que scaffold pour l'ITO. Cependant, elles sont besoin d'autres études telles que l'essai de formation des tubes (tubulogènese) ou le test CAM (« Chick Chorioallantoic Membrane »), pour pouvoir choisir une seule concentration de VEGF à charger. De même, un test de contact direct avec les cellules HUVECs sera fait.

## **Chapitre 2. Développement et optimisation des hydrogels injectables CHT/PCDi/PCDs**

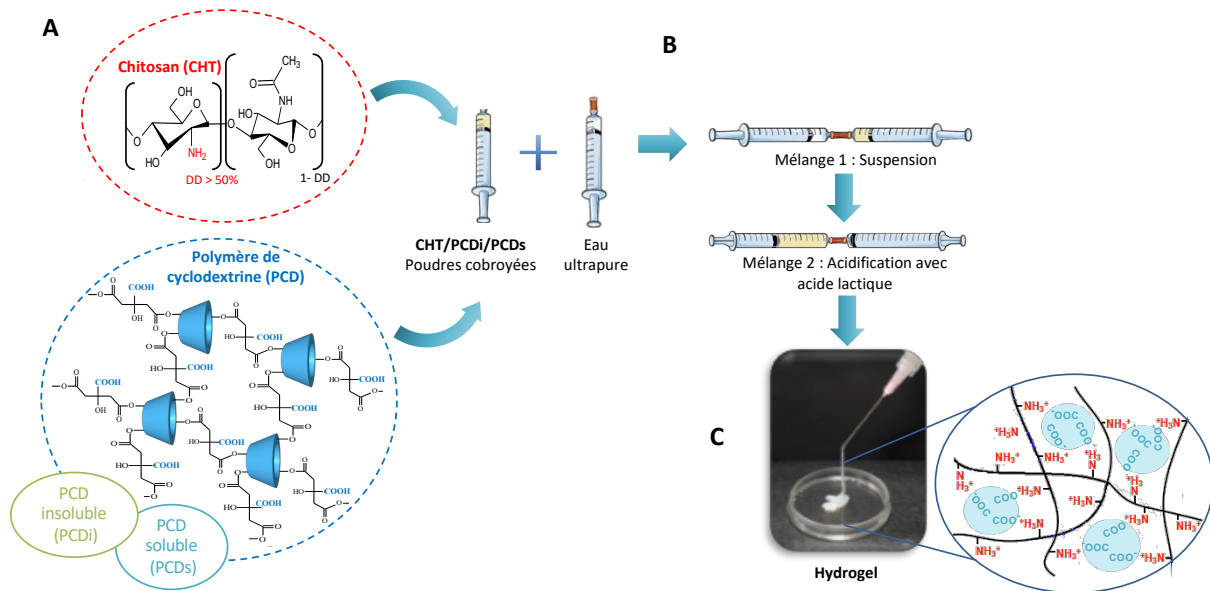
---



## 1. Formation des hydrogels CHT/PCDi/PCDs

Le second objectif de notre travail a été de développer un hydrogel injectable pour la chirurgie mini-invasive. Les travaux préliminaires ont montré que l'hydrogel à base de CHT et de PCD soluble (PCDs) et élaboré à partir d'un rapport massique 3:3 ne représentait pas une stabilité optimale en milieu aqueux. Des travaux antérieurs du laboratoire ont montré que la forme insoluble du PCD (PCDi) présentait une composition chimique proche de celle du PCDs, mais des propriétés physicochimiques très différentes (forte capacité de gonflement dans l'eau)<sup>(242)</sup>. Par conséquent nous avons tenté de combiner les deux formes de PCDi et PCDs pour élaborer des hydrogels CHT/PCDi/PCDs et nous avons étudié l'influence du PCDi sur les propriétés physico-chimiques et rhéologiques des hydrogels obtenus.

A cet effet, les hydrogels ont été préparés à partir du mélange de CHT avec différents ratios de PCDi/PCDs. Il faut remarquer que la portion massique totale de PCDi et PCDs a été fixée à 3%<sub>ov/v</sub>, car l'hydrogel CHT/PCDs 3:3 a été validé comme formulation de base lors de l'étude de l'éponge. Ainsi les ratios CHT:PCDi:PCDs évalués ont été 3:0:3 (correspondant au ratio 3:3 de la partie éponge), 3:1,5:1,5 et 3:3:0. La formation des hydrogels est illustrée dans la Figure 78. Quel que soit le ratio CHT/PCDi/PCDs utilisé, on a obtenu des hydrogels homogènes en les mélangeant dans le système de deux seringues interconnectées (Figure 78B), comme cela a été vu précédemment au chapitre 1.

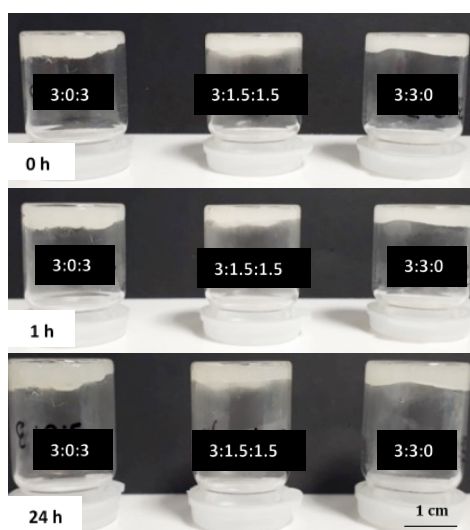


**Figure 78.** Schéma de la formation des hydrogels injectables CHT/PCDi/PCDs. **(A)** Les composantes : le CHT, le PCDi et le PCDs. **(B)** Système de deux seringues interconnectées pour l'obtention de l'hydrogel. **(C)** Observation macroscopique d'un hydrogel CHT/PCDi/PCDs injecté et schématisation des interactions ioniques entre le CHT et le PCD pour la formation de l'hydrogel.

Par la suite, les hydrogels ont été caractérisés par leurs propriétés rhéologiques, d'injectabilité et de cytocompatibilité afin de trouver le meilleur ratio et de mieux comprendre l'impact de l'ajout du PCDi sur ces propriétés.

## 2. Test du flacon retourné pour la formation des gels

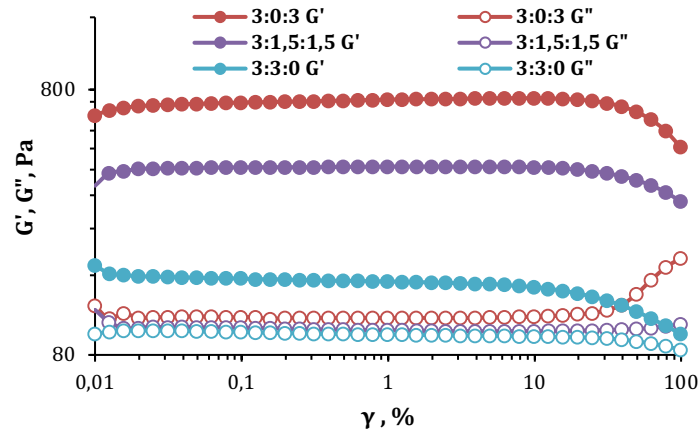
Le test du flacon retourné permet la première observation sur la gélification des suspensions des CHT/PCDi/PCDs suite à l'acidification du milieu. Ainsi, le mélange final a été extrudé dans un flacon qui a été retourné afin d'observer sa compacité et s'il coule ou pas sur l'action de la gravité. Cette technique permet aussi d'observer qualitativement la formation des hydrogels ainsi que leur stabilité<sup>(275)</sup>. La Figure 79 révèle que, immédiatement après le processus de préparation, les mélanges sont plutôt des hydrogels compacts ; même après 1 h ou 24 h d'incubation à 37°C. Aucun des hydrogels ne s'écoule sous l'effet de la gravité après avoir retourné les flacons (pendant 3 min environ).



**Figure 79.** Observation de flacons retournés contenant des hydrogels avec différents ratios CHT/PCDi/PCDs immédiatement après injection (0 h), après 1 h et 24 h d'incubation à 37°C.

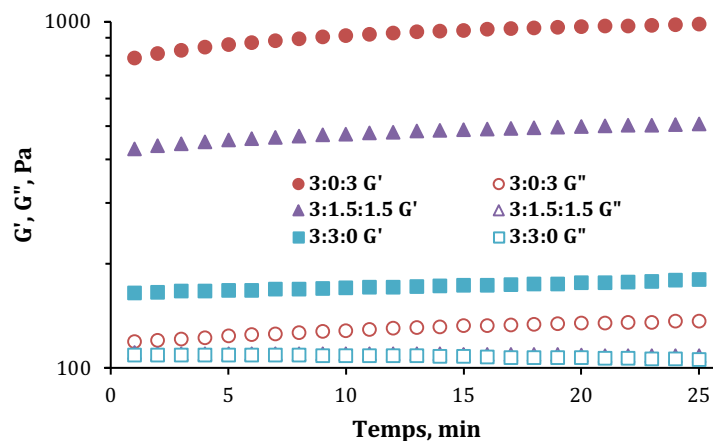
## 3. Étude rhéologique des hydrogels CHT/PCDi/PCDs

Le test rhéologique a été effectué en mode oscillation, et la contrainte ( $\gamma$ ) qu'on applique va être exprimée en termes d'amplitude (% d'un tour de mobile). La région viscoélastique (RVE) des hydrogels CHT/PCDi/PCDs, identifiée dans la Figure 80, est le domaine d'amplitude pour laquelle les modules  $G'$  et  $G''$  sont constants. Dans ce cas, cette zone correspond au domaine entre 0,05 et 10%. Il est évident que le module de stockage ( $G'$ ) est supérieur au module de perte ( $G''$ ), ainsi, les mélanges sont des hydrogels élastiques. Ce résultat démontre que les hydrogels ne sont pas déstructurés dans la RVE ; en revanche au-delà d'une amplitude de 10%, le module  $G'$  diminue et le module  $G''$  augmente, ce qui correspond à la déstructuration des réseaux des hydrogels. Par la suite, la valeur d'amplitude de déformation a été donc fixée à 1% pour tous les hydrogels et a été utilisée par la suite dans toutes les analyses.



**Figure 80.** Région viscoélastique (RVE) des hydrogels CHT/PCDi/PCDs 3:0:3, 3:1,5:1,5 et 3:3:0,  $\nu = 1$  Hz,  $37^\circ\text{C}$  lors du balayage d'amplitude. Le test a été répété 2 fois ( $n=3$ ).

L'évolution des modules viscoélastiques en fonction du temps (Figure 81) a été réalisée à une fréquence ( $\nu$ ) de 1 Hz et à  $37^\circ\text{C}$ . Pour les trois ratios CHT/PCDi/PCDs évalués, le module  $G'$  a été supérieur au module  $G''$  à temps 0 et tout au long de l'étude. Cela signifie que l'hydrogel élastique a été formé dès l'acidification du mélange dans les seringues interconnectées. Il convient de souligner que le module  $G'$  montre un ordre décroissant :  $3:0:3 > 3:1,5:1,5 > 3:3:0$ . Ainsi, l'hydrogel 3:0:3 affiche une valeur de  $G'$  de  $970 \pm 50$  Pa, l'hydrogel 3:1,5:1,5 une valeur de  $498 \pm 5$  Pa et l'hydrogel 3:3:0 une valeur de  $180 \pm 10$  Pa ( $p < 0,05$ ). Néanmoins, tous les hydrogels (3:0:3, 3:1,5:1,5 et 3:3:0) présentaient des valeurs similaires de  $G''$  :  $135 \pm 1$  Pa,  $109 \pm 7$  Pa et  $107 \pm 3$  Pa, respectivement (Figure 81). En conclusion, l'ajout de PCDi dans l'hydrogel induit une diminution du module  $G'$ , ceci est aussi confirmé par la mesure du facteur de perte ( $\tan \delta$ ).



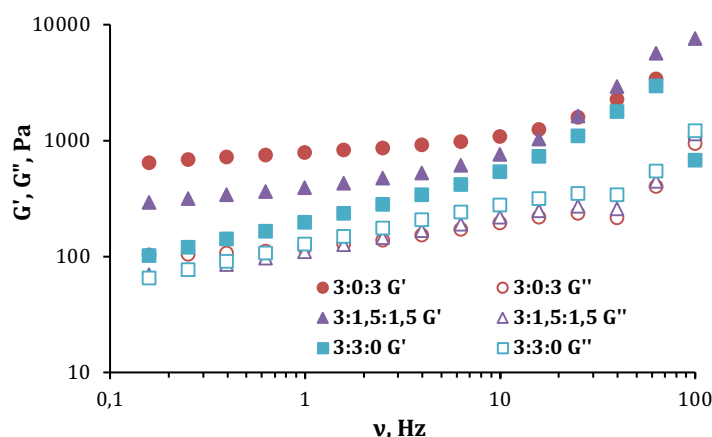
**Figure 81.** Évolution du module élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) en fonction du temps,  $\nu = 1$  Hz,  $\gamma = 1\%$ ,  $37^\circ\text{C}$  (la courbe  $G''$  de l'hydrogel 3:1,5:1,5 est superposée par la courbe  $G''$  de l'hydrogel 3:3:0). Les valeurs moyennes sont représentées dans le graphique. Le test a été répété 3 fois ( $n=3$ ).



**Tableau 18.** Valeurs de  $G'$ ,  $G''$  et  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ), sous conditions  $\nu = 1$  Hz,  $\gamma = 1\%$  pour les hydrogels CHT/PCDi/PCDs

CHT/PCDi/PCDs	$G'$ , Pa	$G''$ , Pa	Tan $\delta$
3:0:3	970 ± 50	135 ± 1	0,14 ± 0,01
3:1,5:1,5	498 ± 5	109 ± 7	0,22 ± 0,01
3:3:0	180 ± 10	107 ± 3	0,61 ± 0,02

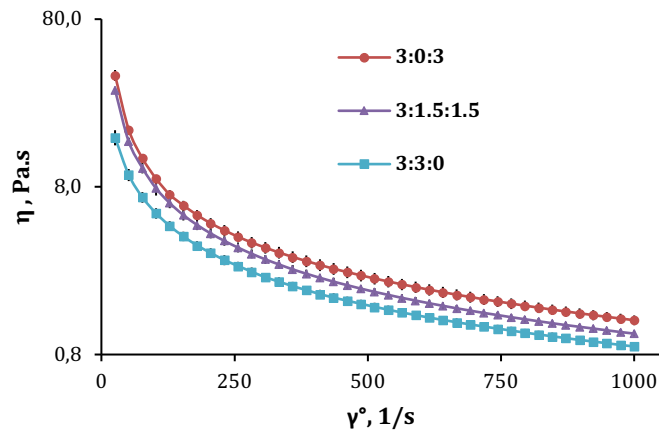
Le  $\tan \delta$  défini comme le rapport  $G''/G'$ , exprime le bilan viscoélastique de l'hydrogel<sup>(143)</sup>. Les valeurs de  $\tan \delta$  des hydrogels CHT/PCDi/PCDs (Tableau 18) ont augmenté significativement ( $p < 0,05$ ) à mesure que la proportion de PCDi augmente dans la formulation. Ainsi, les valeurs de  $\tan \delta$  pour l'hydrogel contenant uniquement du CHT et des PCDs (ratio 3:0:3) a été de  $0,14 \pm 0,01$ , tandis que pour les hydrogels 3:1,5:1,5 et 3:3:0 (contenant uniquement du CHT et du PCDi) les valeurs de  $\tan \delta$  ont été de  $0,22 \pm 0,01$  et de  $0,61 \pm 0,02$ . Borzacchiello et Ambrosio<sup>(143)</sup> ont rapporté que les hydrogels chimiques et physiques peuvent être distingués par leurs spectres mécaniques, *c.à.d.* la corrélation des modules  $G'$  et  $G''$  avec la fréquence. En général, un hydrogel physique présente une valeur de  $\tan \delta$  supérieure à 0,1, ce qui est typique d'hydrogels biologiques à base de polysaccharides ou de protéines<sup>(143)</sup>. Les hydrogels physiques peuvent en outre être classés en hydrogels « faibles » présentant une valeur de  $\tan \delta$  plus élevée (liaisons réversibles formées par des associations temporaires entre les chaînes) et des hydrogels « forts » ayant une valeur de  $\tan \delta$  plus basse (liaisons physiques stables formées dans certaines conditions)<sup>(295)</sup>. Selon ce critère, l'hydrogel 3:3:0 est le plus faible parmi les trois en raison de sa valeur de  $\tan \delta$  qui était la plus élevée ( $0,61 \pm 0,02$ ).



**Figure 82.** Spectres mécaniques des hydrogels CHT/PCDi/PCDs,  $\gamma = 1\%$ . Les valeurs moyennes sont représentées dans tous les courbes. Le test a été répété 2 fois ( $n=3$ ).

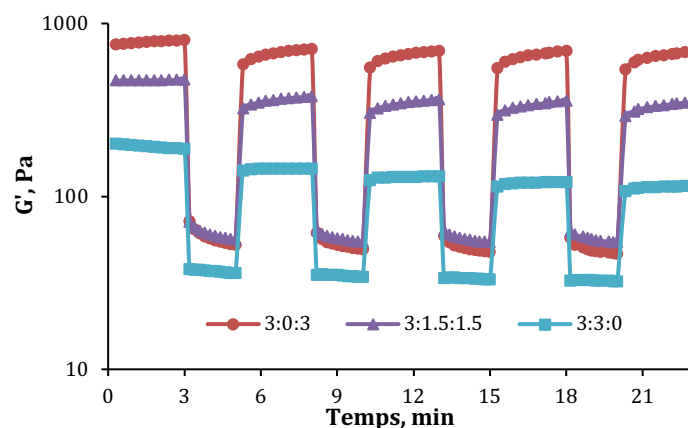
La Figure 82 montre le spectre mécanique des hydrogels CHT/PCDi/PCDs, qui représente l'évolution des modules de  $G'$  et  $G''$  en fonction de la fréquence à une contrainte de 1%. Les courbes révèlent l'augmentation progressive des modules  $G'$  et  $G''$  avec la

fréquence. Les valeurs de  $G'$  des 3 formulations étudiées se rapprochent lorsque la fréquence est supérieure à 10 Hz et atteignent aux mêmes valeurs au-delà de 40 Hz. Pour les trois ratios, le spectre mécanique reflète le comportement d'un hydrogel physique<sup>(143)</sup>.



**Figure 83.** Évaluation du caractère rhéofluidifiant des hydrogels CHT/PCDi/PCDs en mode rotation en fonction du taux de cisaillement ( $\dot{\gamma}$ ),  $\gamma = 1\%$ , température ambiante. Le test a été répété 2 fois ( $n=3$ ).

La Figure 83 montre l'évolution de la viscosité ( $\eta$ ) en fonction du taux de cisaillement ( $0 - 10^3 \text{ s}^{-1}$ ). Les viscosités des trois hydrogels ont été classifiées dans l'ordre  $3:0:3 > 3:1,5:1,5 > 3:3:0$  dans le domaine du taux de cisaillement étudié ( $25 - 10^3 \text{ s}^{-1}$ ). Il a été également constaté que la viscosité de tous les hydrogels diminuait à mesure que le taux de cisaillement augmentait. Par exemple, la viscosité de l'hydrogel 3:1,5:1,5 a diminué de  $30 \pm 1 \text{ Pa.s}$  à  $1,07 \pm 0,04 \text{ Pa.s}$  (Figure 83). Ces résultats montrent un comportement rhéofluidifiant des hydrogels<sup>(134,296)</sup>. Cette propriété est un facteur très important pour un hydrogel injectable. Lors de l'injection, les forces de cisaillement seront induites et les liaisons ioniques de l'hydrogel seront détruites et l'hydrogel pourra être extrudé à travers l'aiguille<sup>(134,147,297)</sup>.



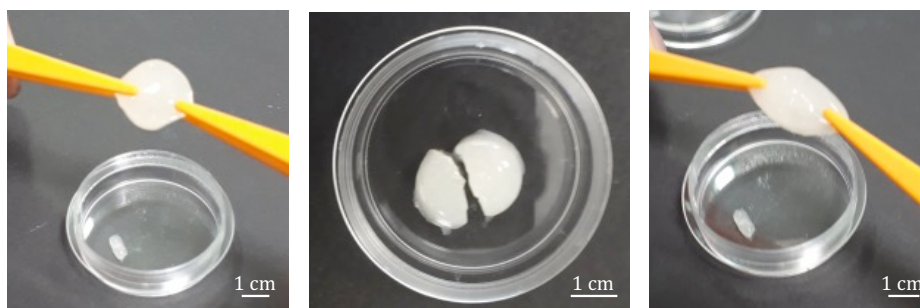
**Figure 84.** Évaluation du caractère autoréparant des hydrogels CHT/PCDi/PCDs par la méthode de déformation cyclique :  $\gamma = 1\%$  (faible) et  $\gamma = 500\%$  (haute),  $\nu = 1 \text{ Hz}$ , température ambiante. Les valeurs moyennes sont représentées dans le graphique. Le test a été répété 2 fois ( $n=3$ ).

Une analyse de déformation cyclique a été réalisée comme le montre la Figure 84. Celle-ci consiste à appliquer alternativement des cycles de déformation faible ( $\gamma = 1\%$ ) et forte

( $\gamma = 500\%$ ) pendant 3 et 2 minutes, respectivement. Tout d'abord, les hydrogels soumis une faible contrainte montrent un module  $G'$  élevé. Puis, une forte déformation (amplitude 500%) a été appliquée sur les hydrogels préformés pour détruire complètement le réseau ionique formé et augmenter la fluidité des hydrogels. Cela a été observé par la diminution drastique de la valeur de  $G'$ . Ensuite, une faible déformation (amplitude 1%) a été à nouveau appliquée, ce qui a révélé l'augmentation instantanée de la valeur de  $G'$ . En particulier, le module  $G'$  de l'hydrogel 3:0:3 a récupéré  $\sim 72\%$  de sa valeur initiale pour atteindre  $\sim 90\%$  après 3 minutes. D'un autre côté, les hydrogels 3:3:0 et 3:1,5:1,5 ont montré un comportement similaire mais avec une amplitude de variation de  $G'$  inférieure à celle de l'hydrogel 3:0:3.

Pour les hydrogels évalués dans ce travail, il a été évident qu'après application d'une forte contrainte, le module  $G'$  des hydrogels chute brusquement et atteint une valeur stable. Le cycle de faible contrainte suivant s'accompagne d'une augmentation soudaine du module  $G'$ . Ce phénomène se reproduit ainsi indéfiniment au fil des cycles appliqués. Cette expérience montre que les hydrogels CHT/PCDi/PCDs au repos ou sous faible contrainte présentent un caractère élastique qui disparaît dès qu'une forte contrainte (hors de la RVE) est appliquée. Ce comportement est typique de celui des hydrogels physiques qui sont figés au repos via les liaisons faibles établies entre les macromolécules, et qui sont détruites sous sollicitation. Ceci reflète donc le caractère rhéofluidifiant de l'hydrogel.

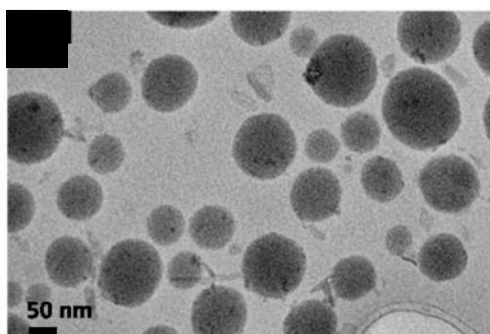
Dès l'arrêt de la contrainte, la « pseudo-réticulation » des hydrogels se produit à nouveau via le rétablissement et la réorganisation spontanée des nouvelles liaisons ioniques (auto-assemblage). Ceci reflète le caractère autoréparant (self-healing) des hydrogels qui a été aussi observée macroscopiquement (Figure 85) : l'hydrogel 3:1,5:1,5 a été coupé en deux parties qui ont ensuite été réunies pour reformer un assemblage cohésif après une minute de contact.



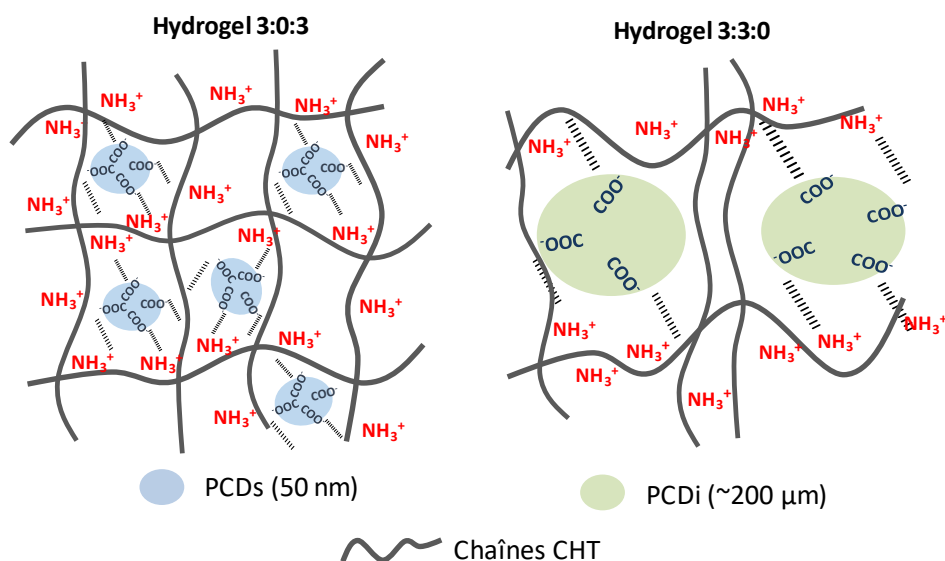
**Figure 85.** Images macroscopiques illustrant la propriété autoréparante de l'hydrogel 3:1,5:1,5 après rupture de l'hydrogel en deux.

Bien que les PCDs et les PCDi présentent la même composition chimique et la même quantité de groupes COOH (soit 4 mmol de groupes COOH par gramme de PCD)<sup>(241)</sup>, l'analyse rhéologique d'hydrogels a montré des modules  $G'$  différentes pour tous les hydrogels évalués. La différence des valeurs de module  $G'$  provient probablement de la différence de densité des

interactions ioniques entre le polycation (CHT) et le polyanion (PCD) au sein du réseau polymère. Ceci peut être expliqué par une différence d'accessibilité des groupes COOH apportés par PCDi et PCDs. Cette différence peut elle-même être attribuée à la taille des particules de deux types de PCD. Le PCDs solubilisé présente une forme globulaire d'environ 50 nm de diamètre (Figure 86)<sup>(298)</sup>. En revanche, le PCDi est une poudre insoluble qui a préalablement été broyée et tamisée pour obtenir une granulométrie d'environ 125 µm, et donc cette molécule formera des « clusters » d'au moins 200 µm dans l'hydrogel. A cause de leurs tailles très différentes, l'une nanométrique, l'autre micrométrique, les deux types de particules ne sont pas dispersées de la même façon au sein de l'hydrogel.



**Figure 86.** Image de microscopie électronique à transmission (MET) de la structure globulaire du PCD soluble (diamètre ~ 50 nm)<sup>(298)</sup>.



**Figure 87.** Schéma illustrant la possible conformation structurelle des hydrogels CHT/PCDi/PCDs de ratios 3:0:3 et 3:3:0.

Grace à ses dimensions nanométriques, le PCDs est dispersé de façon homogène au sein de l'hydrogel et ses fonctions COOH présentent une grande accessibilité vis-à-vis les fonctions  $\text{NH}_3^+$  des chaînes du CHT, ce qui conduit à une forte densité d'interactions ioniques au sein du réseau comme illustré dans la Figure 87. En revanche, le PCDi forme des micro domaines dont seuls les groupes COOH présents en surface peuvent interagir avec les

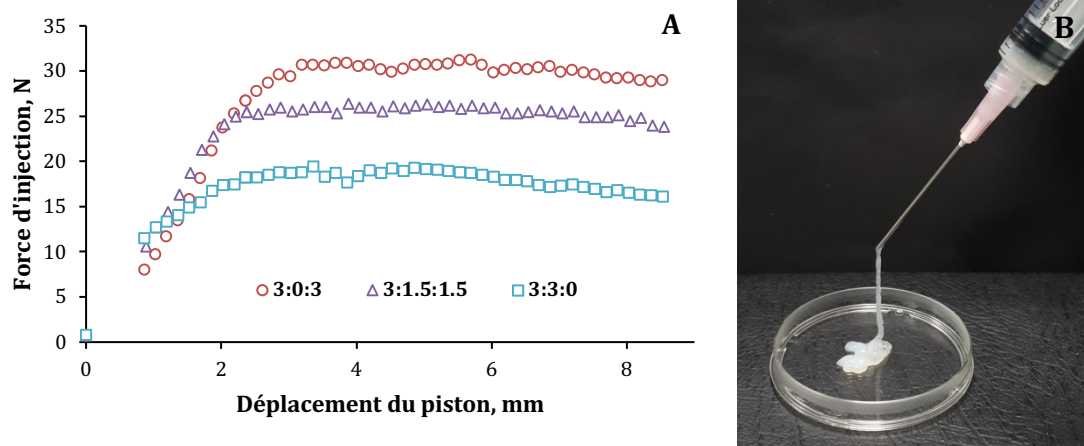
chaînes de CHT, conduisant ainsi à une faible densité d'interactions ioniques comparés aux PCDs. De cette manière, nous pouvons expliquer que le module de stockage  $G'$  de l'hydrogel 3:0:3 diminue quand la proportion de PCDi augmente dans la formulation de l'hydrogel CHT/PCDi/PCDs.

Wahid *et al.*<sup>(276)</sup> ont rapporté la formation des hydrogels injectables à base de carboxyméthyle-CHT réticulés de façon ionique avec différentes concentrations de zinc ( $Zn^{2+}$ ). Ils ont rapporté des valeurs de  $G'$  de  $\sim 200$  Pa pour la concentration la plus basse de  $Zn^{2+}$ , jusqu'à 11000 Pa pour la concentration la plus haute. Ces résultats ont montré que les propriétés viscoélastiques de l'hydrogel sont ajustables selon la concentration de  $Zn^{2+}$  ajouté. En plus, les hydrogels ont démontré un caractère autoréparant : après avoir subi une contrainte de 200% avec la destruction du réseau, le module  $G'$  remonte une fois la contrainte de 0,1% appliquée<sup>(276)</sup>.

#### 4. Injectabilité

##### 4.1. Profil de force d'injection

L'injectabilité est un paramètre important qui détermine si l'hydrogel peut être injecté manuellement par un clinicien et elle est liée à la force d'injection<sup>(134)</sup>. Les courbes de force – déplacement pour les trois formulations d'hydrogels sont rapportées à la Figure 88A. La force d'injection a d'abord augmenté jusqu'à environ 3 mm de déplacement, puis elle a atteint un plateau. Les valeurs du plateau démontrent la force de glissement dynamique qui a été de  $30 \pm 3$  N,  $26 \pm 3$  N et  $17 \pm 1$  N, pour les hydrogels 3:0:3, 3:1,5:1,5 et 3:3:0, respectivement. Ainsi, la force d'injection diminue avec le taux de PCDi croissant.



**Figure 88.** Étude de l'injectabilité des hydrogels CS/PCDi/PCDs avec une seringue de 5-mL à travers une aiguille 18G (A) Profil de la force d'injection à une vitesse d'enfoncement du piston de 10 mm/min à température ambiante. La moyenne de trois mesures ( $n=3$ ) est indiquée dans le graphique. (B) Extrusion d'un cordon de l'hydrogel 3:1,5:1,5.

La force d'injection d'un matériau fluide dépend des diamètres intérieurs de la seringue et de l'aiguille, ainsi que de la vitesse transversale lors de l'analyse<sup>(134,149,150)</sup>. C'est pourquoi,

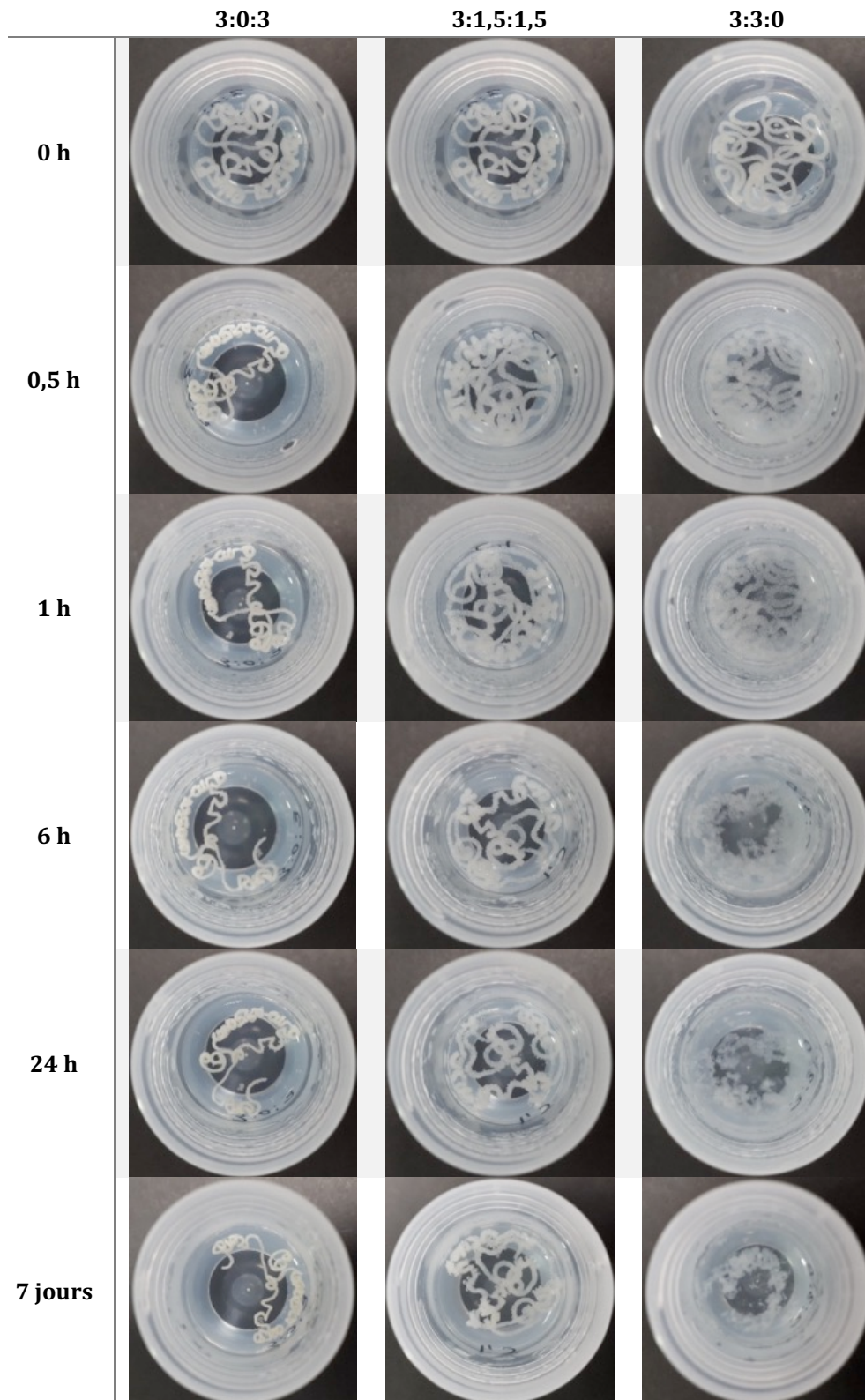
la mesure de la force d'injection varie souvent dans la littérature. Néanmoins, l'étude de Cilurzo *et al.*<sup>(151)</sup> a défini qu'une force d'injection inférieure à 45 N représente une injection facile pour le chirurgien. Dans ce contexte, tous les hydrogels CHT/PCDi/PCDs testés ont présenté une force d'injection inférieure à 45 N, ce qui garantit une injection sans difficulté pour les cliniciens. Par exemple, l'hydrogel 3:1,5:1,5 a été facilement extrudé à travers une aiguille 18G en formant un cordon continu comme illustré sur la Figure 88B.

#### 4.2. Intégrité structurelle des hydrogels dans PBS

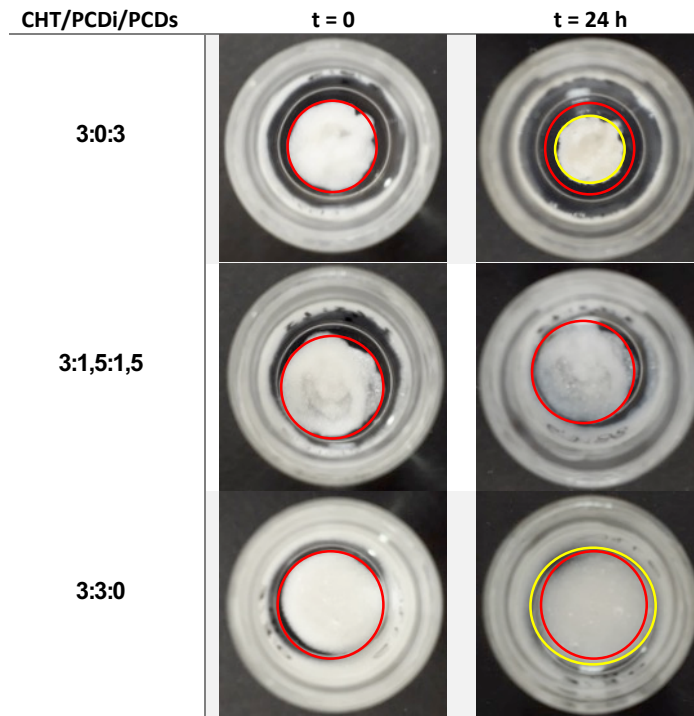
Afin d'évaluer la stabilité et l'intégrité des hydrogels après injection dans milieu aqueux, tous les hydrogels ont été injectés directement à partir d'une seringue de 5-mL à travers d'une aiguille 18G dans du PBS (pH 7,4) à 37°C. Les trois hydrogels injectés présentaient une structure en forme de cordon ininterrompu avec une surface lisse (Figure 89 - après injection 0 h). L'hydrogel 3:0:3 (contenant que CHT et PCDs) a présenté une contraction visible du volume (rétrécissement) dans les 30 premières minutes d'immersion et la bonne cohésion du cordon a été maintenue jusqu'à 7 jours en batch. Au contraire, l'hydrogel 3:3:0 (contenant que CHT et PCDi) a commencé à se déformer et à se désintégrer dans les 30 premières minutes en batch. Cela peut être dû à la propriété du gonflement caractéristique de PCDi (3 fois son volume initial)<sup>(241)</sup>, qui provoque un fort gonflement de l'hydrogel. De même, le fait que l'hydrogel soit « faible » selon l'analyse rhéologique précédent (moins de liaison ioniques) peut générer la désintégration du cordon. De façon intéressante, une heure après son injection dans du PBS, le cordon d'hydrogel 3:1,5:1,5 n'a montré aucun changement en termes de volume ou d'intégrité (Figure 89, 1 h). Après 24 h d'immersion dans du PBS (Figure 89, 24 h), cet hydrogel, composé à parts égales de PCDi et de PCDs, a conservé sa structure même s'il a montré une surface plus rugueuse. Ces résultats ont démontré que l'hydrogel 3:1,5:1,5 présente la meilleure stabilité dimensionnelle et l'intégrité structurelle par rapport aux deux autres hydrogels. Cela a été aussi confirmé par l'observation jusqu'à 7 jours d'incubation (Figure 89, 7 jours). En conséquence, la combinaison du PCD insoluble et PCD soluble dans la formulation de l'hydrogel CHT/PCD permet d'obtenir un hydrogel avec les meilleures caractéristiques, ainsi que de réduire leurs inconvénients, sans déstabiliser le réseau ionique formé.

Afin de mieux observer le phénomène de contraction, les hydrogels ont été extrudés dans un flacon avant d'ajouter du PBS et ont été incubés jusqu'à 24 h à 37°C. La Figure 90 montre l'évolution des hydrogels en milieu aqueux, les diamètres approximatifs à temps 0 sont affichés avec un cercle rouge, celui-ci est superposé sur l'hydrogel après 24 h d'incubation (cercle jaune) afin d'observer si le diamètre initial est conservé. Ainsi, l'hydrogel 3:0:3 révèle une contraction évidente en termes du volume après 24 h. En revanche, l'hydrogel 3:3:0 montre une augmentation de son volume (gonflement). Néanmoins, la forme de l'hydrogel

3:1,5:1,5 n'a pas été modifiée et son volume a légèrement augmenté. Il sera par ailleurs intéressant d'évaluer la perte ou gain de masse des hydrogels afin de démontrer son gonflement ou sa dégradation.



**Figure 89.** Évaluation qualitative de l'intégrité structurale des hydrogels CHT/PCDi/PCDs après injection à travers une aiguille 18G dans du PBS (pH 7,4) à 37°C: immédiatement après l'injection (0 h) et à différents temps d'incubation.



**Figure 90.** Observation macroscopique des hydrogels CHT/PCDi/PCDs dans du PBS (pH 7,4) à 37°C à temps 0 et après 24 h d'incubation. Cercle rouge : diamètre initial (temps 0), cercle jaune : diamètre final (temps 24 h). Le cercle jaune de l'hydrogel 3:1,5:1,5 est superposé avec le cercle rouge du diamètre initial.

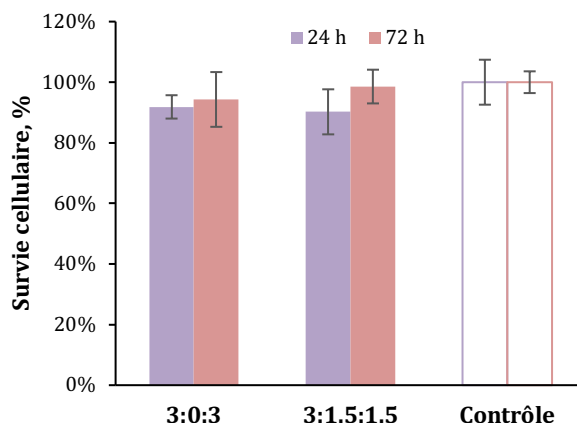
La transition rapide gel – sol – gel de l'hydrogel lors de l'extrusion de la seringue, la propriété d'autoréparation instantanée et la stabilité dimensionnelle sont les paramètres les plus importants pour assurer un remplissage parfait du défaut osseux par injection<sup>(134,299,300)</sup>. De plus, l'absence de contraction de l'hydrogel assurerait également un bon contact du matériau injecté avec la paroi du défaut et une bonne intégrité pendant le temps nécessaire pour l'activité thérapeutique *in situ* (c.à.d. délivrance de molécules bioactives ou de cellules)<sup>(135)</sup>. Enfin, en tenant compte les propriétés viscoélastiques (le comportement rhéofluidifiant et autoréparant), la force d'injection et l'intégrité structurelle après injection, l'hydrogel 3:1,5:1,5 a répondu au mieux aux spécifications de l'application, et a ensuite été évalué dans les tests de cytotoxicité.

## 5. Cytotoxicité – Méthode de contact indirecte

La réponse cellulaire au contact des hydrogels est essentielle pour une application biomédicale. Pour ce test, l'hydrogel 3:1,5:1,5 a été sélectionné du à leur propriétés indiqués ci-dessus et a été comparé à l'hydrogel 3:0:3. La cytotoxicité de deux hydrogels a été déterminée par la viabilité des cellules exposées aux extraits des hydrogels pré-conditionnés. Selon la nouvelle norme publiée le 16 juin 2016 par la FDA (Food and Drug Administration) concernant la norme ISO 10993 pour les tests de cytotoxicité, il est suggéré que tous les dispositifs médicaux permanents devraient subir une extraction pendant une période supérieure à 24 h (*i.e.* 72 h). Nous avons donc suivi la norme ISO 10993 (24 h) et la norme



FDA (72 h) pour évaluer la cytotoxicité des hydrogels qui est illustrée dans la Figure 91. Le taux de survie cellulaire (viabilité des cellules par rapport au contrôle) dans le milieu d'extraction de 24 h pour les hydrogels 3:0:3 et 3:1,5:1,5 ont été respectivement de  $92 \pm 4\%$  et  $90 \pm 7\%$ . Aucune différence significative n'a été trouvée entre les groupes ( $p > 0,05$ ). De plus, le taux de survie cellulaire en contact avec le milieu extrait après 72 h d'incubation donne des résultats similaires à ceux de l'extraction à 24 h ( $p > 0,05$ ). Dans ce test, les hydrogels 3:0:3 et 3:1,5:1,5 ne sont pas cytotoxiques.



**Figure 91.** Viabilité cellulaire des cellules pré-ostéoblastes (MC3T3-E1) après 24h de culture dans les extraits d'hydrogels à des rapports 3:0:3 et 3:1,5:1,5 (24 et 72 h). Le milieu de culture MEM- $\alpha$  seul a été utilisé comme contrôle. Le test a été répété 2 fois ( $n=3$ ).

## 6. Conclusion

L'impact de l'utilisation de PCD insoluble (PCDi) et soluble (PCDs) dans la formulation des hydrogels injectables CHT/PCD a été étudié. Les hydrogels CHT/PCDi/PCDs élaborés à partir de trois ratios ont été donc caractérisés. L'analyse rhéologique a montré que le comportement élastique (mesuré par  $G'$ ) diminue avec l'augmentation de la proportion de PCDi dans le mélange. En plus, les propriétés rhéofluidifiantes et auto-réparantes (obtenues grâce aux propriétés d'auto-assemblage des PEC) ont été constatées par évaluation rhéologique et par observation macroscopique. L'étude de la force d'injection des hydrogels a démontré que tous les hydrogels sont capables d'être injectés confortablement par un chirurgien (forces  $\leq 30$  N). Enfin, les hydrogels 3:0:3 et 3:1,5:1,5 ont démontré être cytocompatibles vis-à-vis les cellules pré-ostéoblastes. Nous avons donc mis en évidence l'impact de l'utilisation du PCDi sur les propriétés de l'hydrogel. En effet, il a été constaté que l'hydrogel 3:1,5:1,5 (contenant le PCDi et PCD en parts égales) a montré un bon compromis et il a obtenu la meilleure stabilité dimensionnelle après injection dans un tampon (PBS, pH 7,4).

## **Chapitre 3. Étude prospective pour l'élaboration d'hydrogels injectables et d'éponges composites**

---



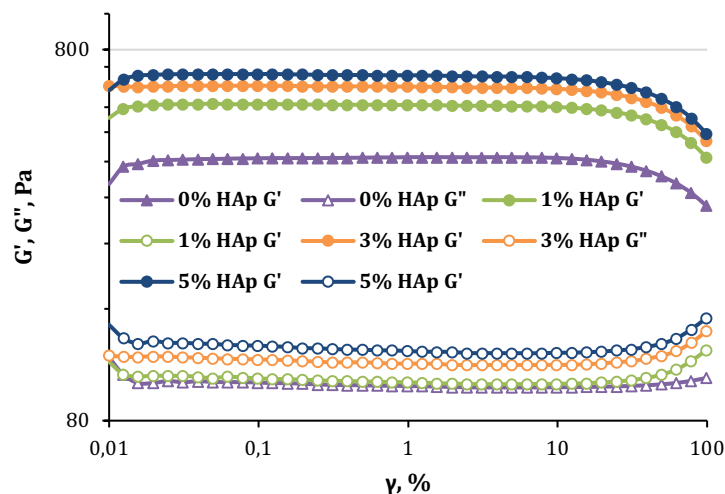
## 1. Formation et caractérisation des hydrogels composites CHT/PCDs/PCDi/HAp

Il est connu que le CHT possède des propriétés ostéoconductives et ostéogéniques<sup>(170,258)</sup>. Cependant, ces propriétés sont faibles en comparaison aux autres matériaux, e.g. les biocéramiques<sup>(259)</sup>. Dans ce contexte, le dernier chapitre de ce travail est consacré à évaluer la faisabilité de former des hydrogels composites en ajoutant de l'HAp à la formulation de l'hydrogel CHT/PCDi/PCDs 3:1,5:1,5. A cet effet, l'HAp a été incorporée lors de la préparation des hydrogels à trois concentrations : 1, 3 et 5%<sub>w/v</sub>.

Les hydrogels CS/PCDi/PCDs/HAp obtenus ont montré une coloration blanche et opaque par comparaison avec les hydrogels sans HAp et ils ont été caractérisés comme suit.

### 1.1. Analyse préliminaire du comportement rhéologique

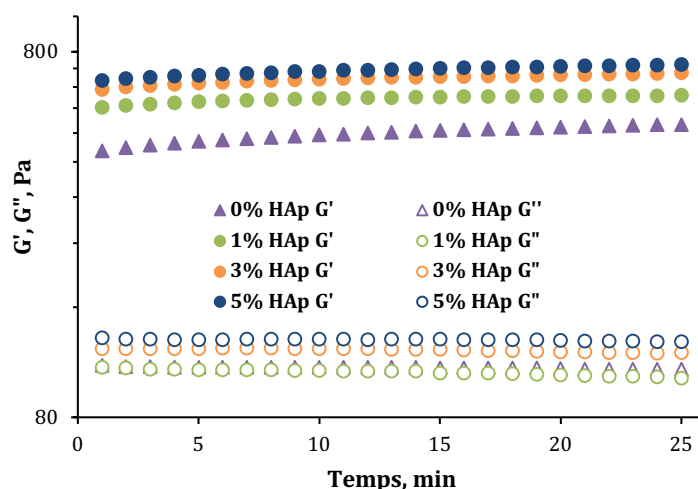
D'abord, les propriétés viscoélastiques des hydrogels composites ont été étudiées. La Figure 92 montre la RVE des hydrogels composites en comparaison avec l'hydrogel seul (3:1,5:1,5:0). Nous avons constaté que la RVE n'avait pas changé par rapport à l'hydrogel sans HAp et correspond au domaine d'amplitude de déformation compris entre 0,05 et 10% et que la formation des liaisons ioniques n'a pas être dérangée par l'incorporation d'HAp. La valeur d'amplitude a été donc fixée à 1% pour tous les hydrogels.



**Figure 92.** Région viscoélastique (RVE) des hydrogels CHT/PCDi/PCDs/HA,  $\nu = 1$  Hz, 37°C, lors du balayage d'amplitude ( $\gamma$ ). Les valeurs moyennes sont représentées dans toutes les courbes. Le test a été répété 2 fois ( $n=3$ ).

La Figure 93 montre l'évolution des modules  $G'$  et  $G''$  en fonction du temps pour les hydrogels composites. On a constaté que l'incorporation d'HAp l'hydrogel a augmenté de manière significative ( $p < 0,05$ ) la valeur du module  $G'$  en comparaison avec l'hydrogel de départ ( $498 \pm 5$  Pa). Ainsi, les valeurs de  $G'$  ont été de  $606 \pm 17$  Pa,  $692 \pm 44$  Pa et  $731 \pm 23$  Pa, pour les hydrogels contenant 1, 3 et 5% d'HAp respectivement. Quant au module  $G''$ , les valeurs obtenues pour les hydrogels composites contenant 1, 3 et 5% d'HAp ont été de

105 ± 2 Pa, 121 ± 7 Pa et 130 ± 3 Pa, respectivement, et ils étaient similaires à celle de l'hydrogels sans HAp (109 ± 7 Pa).



**Figure 93.** Évolution du module élastique ( $G'$ ) et visqueux ( $G''$ ) des hydrogels composites CHT/PCDi/PCDs/HAp,  $\nu = 1$  Hz, 37°C. Les valeurs moyennes sont représentées dans toutes les courbes. Le test a été répété 2 fois ( $n=3$ ).

**Tableau 19.** Valeurs de  $G'$ ,  $G''$  et  $\tan \delta$  ( $G''/G'$ ), sous conditions  $\nu = 1$  Hz,  $\gamma = 1\%$  pour les hydrogels CHT/PCDi/PCDs/HAp.

CHT/PCDi/PCDs/HAp	$G'$ , Pa	$G''$ , Pa	Tan $\delta$
3:1,5:1,5:0	498 ± 5	109 ± 7	0,220 ± 0,010
3:1,5:1,5:1	606 ± 17	105 ± 2 Pa	0,173 ± 0,004
3:1,5:1,5:3	692 ± 44	121 ± 7	0,175 ± 0,002
3:1,5:1,5:5	731 ± 23	130 ± 3	0,178 ± 0,030

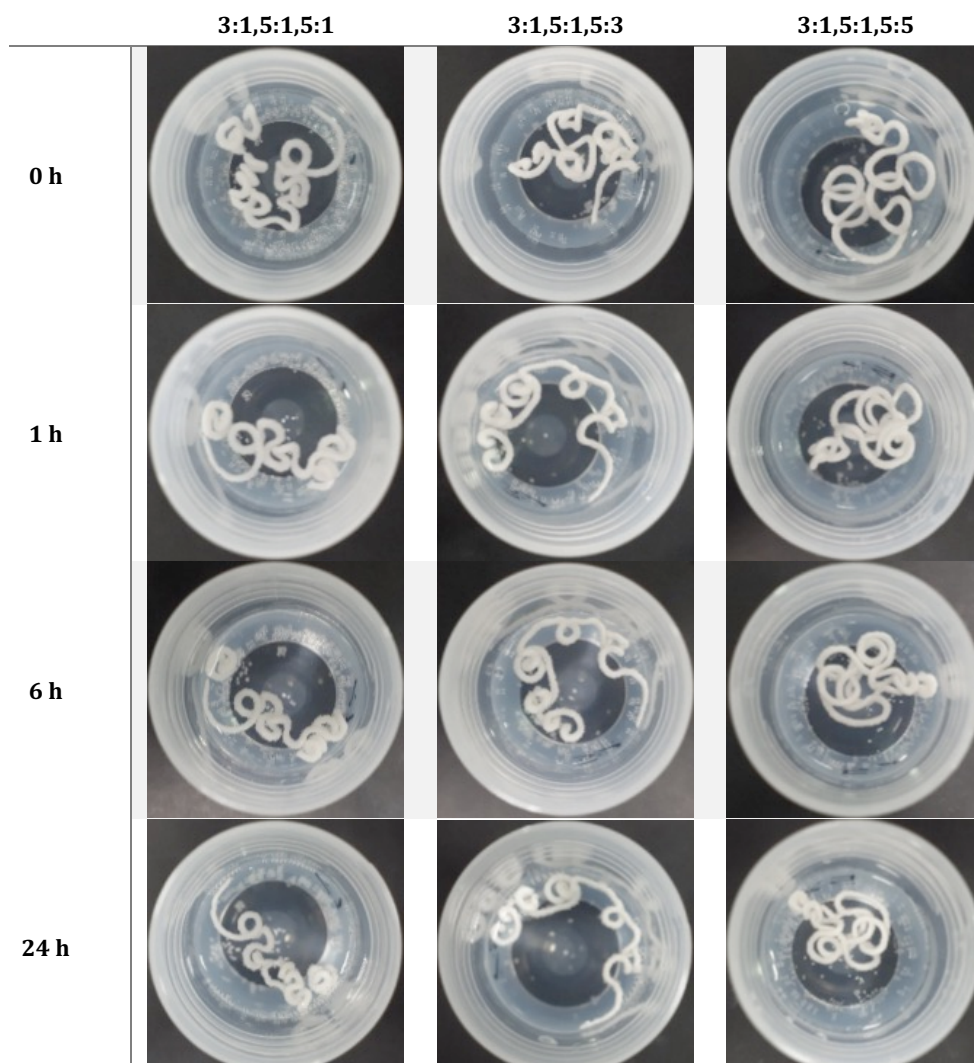
D'un autre côté, les valeurs de  $\tan \delta$  pour les hydrogels contenant de l'HAp (Tableau 19) ont été calculées et elles ont été inférieures à celle de l'hydrogel sans HAp (0,220 ± 0,010). Les valeurs de  $\tan \delta$  trouvées ont été de 0,173 ± 0,004, 0,175 ± 0,002 et 0,178 ± 0,030, pour les hydrogels contenant 1, 3 et 5% d'HAp respectivement. Par conséquent, les hydrogels composites montrent un caractère plus « fort » et plus élastique que l'hydrogel sans HAp<sup>(295)</sup>. Dans les résultats obtenus on a constaté que l'HAp agit comme un renfort dans la structure des hydrogels, et donc l'incorporation de cette phase minérale améliore les propriétés viscoélastiques de l'hydrogel 3:1,5:1,5. Le mécanisme exact de l'augmentation du module  $G'$  avec l'HAp n'est pas clair. Néanmoins, ce type de comportement a été aussi rapporté dans la littérature pour les hydrogels composites à base d'alginate, carboxyméthyl-CHT et HAp<sup>(301)</sup>. La propriété de renforcement similaire à l'HAp a été également trouvée dans des composants tels que le sulfate de calcium ( $\text{CaSO}_4$ )<sup>(114)</sup> et le  $\beta$ -TCP<sup>(302)</sup>, lorsqu'ils forment des hydrogels ou scaffolds composites avec différents polymères.

D'après les résultats obtenus (module  $G'$  et  $G''$ ), une étude des propriétés rhéofluidifiantes et autoréparantes devrait être réalisée afin de savoir celles-ci ne sont pas

affectés par l'incorporation de l'HAp. Sachant que l'HAp est une biocéramique très peu résorbable, il serait aussi intéressant d'étudier l'incorporation d'autres composants à propriétés ostéoconductive et ostéoinductive (comme le  $\beta$ -TCP qui est résorbable, par exemple) dans la formulation de notre hydrogel, afin de pouvoir comparer son effet dans la formulation et dans leurs propriétés biologiques vis-à-vis des cellules ostéoblastes.

### **1.2. Intégrité structurelle des hydrogels composites dans PBS**

Une fois que les hydrogels composites ont été caractérisés par ses propriétés rhéologiques, une analyse de leur stabilité structurelle après injection a été réalisé. A cet effet, les hydrogels composites ont été injectés dans du PBS (pH 7,4) à 37°C pendant 24 h (Figure 94). Immédiatement après injection, tous les hydrogels ont montré la formation de cordons continus avec un surface lisse, très similaire à l'hydrogel 3:1,5:1,5 sans HAp. La même tendance de stabilité structurelle a été retrouvée dans les trois hydrogels composites testés. Ils ont conservé leur volume tout au long de l'étude (jusqu'à 24 h en batch) et ne se sont pas désintégrés dans le milieu (pas de précipités ou de particules autour de l'hydrogel). Cela nous indique que l'incorporation de l'HAp n'affecte ni la stabilité dimensionnelle ni l'intégrité structurelle des hydrogels, et qu'il est bien intégré dans le réseau polymère.



**Figure 94.** Évaluation qualitative de l'intégrité structurelle des hydrogels CHT/PCDi/PCDs/HAp après injection à travers une aiguille 18G dans du PBS (pH 7,4) à 37°C: immédiatement après l'injection (0 h) et à différents temps d'incubation.

Les résultats obtenus des hydrogels composites sont intéressants et confirment que l'incorporation de l'HAp dans la meilleure formulation d'hydrogel injectable favorise et améliore les propriétés viscoélastiques, en conservant leur stabilité et intégrité structurelles.

D'après ces résultats encourageants sur l'hydrogel composite injectable, il serait par ailleurs aussi intéressant d'utiliser cette nouvelle formulation pour l'élaboration des éponges composites, car l'incorporation de l'HAp dans les éponges pourra davantage favoriser encore plus la régénération osseuse, et générer une vascularisation fonctionnelle (grâce à l'haute affinité de VEGF pour les surfaces de calcium dont HAp<sup>(303)</sup>).

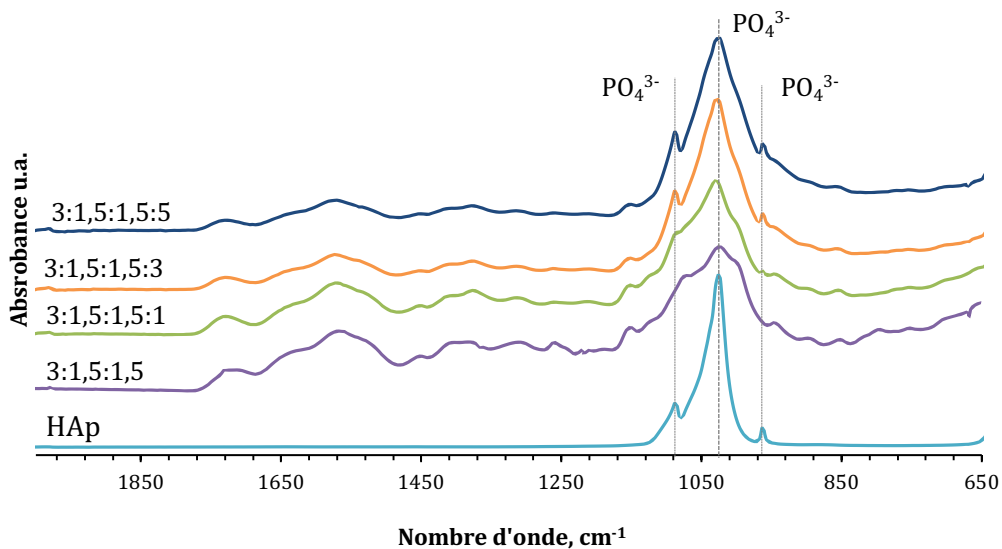
## 2. Formation et caractérisation des éponges composites CHT/PCDs/PCDi/HAp

Après la caractérisation des hydrogels composites, ceux-ci ont été injectés dans un moule, congelés et lyophilisés afin d'obtenir des éponges composites. Les éponges CS/PCDi/PCDs/HAp obtenues montrent une coloration plus blanche en comparaison avec les éponges sans HAp. D'un autre côté, les éponges avec 5% d'HAp (3:1,5:1,5:5) ont une texture

et une consistance plus friable comparé aux autres éponges avec une plus faible quantité de HAp.

### 2.1. Spectroscopie infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Afin de caractériser la structure chimique des hydrogels composites CHT/PCDi/PCDs/HAp une analyse IRTF a été réalisé (Figure 95). La poudre d'HAp et l'hydrogel sans HAp ont été analysés pour mettre en évidence leurs bandes caractéristiques. Le spectre d'HAp montre les trois bandes caractéristiques correspondant au groupe  $\text{PO}_4^{3-}$  (tracé dans le graphique) aux longueurs d'onde de 963, 1025 et 1087  $\text{cm}^{-1}$ (304,305). Ces bandes peuvent également être observées dans les hydrogels composites. Dans le cas de l'hydrogel ne contenant que 1% de HAp, les bandes sont masquées par celle du groupe C–OH (1024,5  $\text{cm}^{-1}$ ) de l'hydrogel sans HAp. En revanche, les bandes caractéristiques de l'HAp apparaissent dans les hydrogels contenant 3 et 5% d'HAp.



**Figure 95.** Spectres IRTF-ATR des hydrogels composites CHT/PCDi/PCDs/HAp, de l'hydrogel 3 :1,5 :1,5 sans HAp et de la poudre d'HAp.

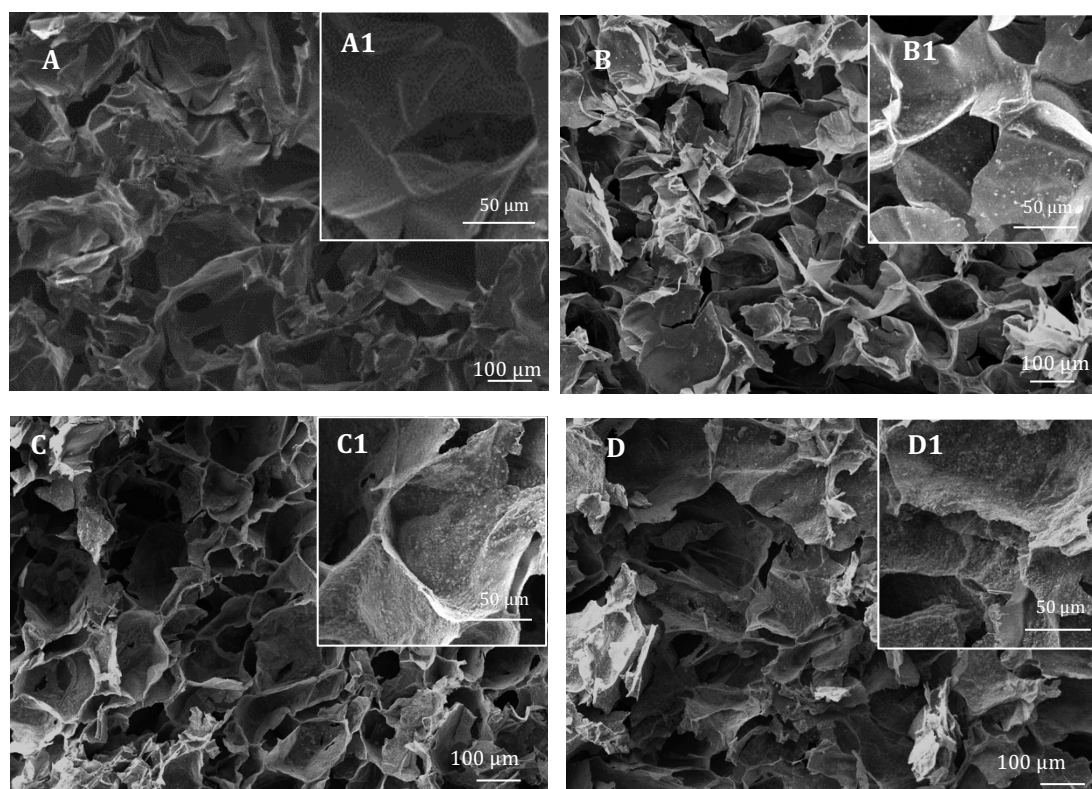
### 2.2. Microstructure par microscopie électronique à balayage (MEB)

La microstructure des éponges CS/PCDi/PCDs/HAp et de l'éponge sans HAp a été analysée par MEB. La Figure 96 révèle la coupe transversale de tous les éponges qui montrent une structure poreuse interconnectée. Il faut remarquer que l'incorporation d'HAp n'affecte pas la porosité de l'éponge. Une vue agrandie de tous les hydrogels (Figure 96A1-D1) a montré que l'hydrogel sans HAp possède les parois des pores avec des parois lisses contrairement aux hydrogels composites. Les images ont révélé que la poudre d'HAp incorporée lors de la formation de l'hydrogel est bien intégrée dans la structure de l'hydrogel (Figure 96B1-D2). Ce type d'interaction démontre une forte affinité de l'HAp avec la matrice de CHT des hydrogels<sup>(306)</sup>. La quantité de revêtement d'HAp observée dans les éponges est directement proportionnelle à la concentration ajoutée dans chaque formulation. La granulométrie de l'HAp



utilisé a été de 1 – 2  $\mu\text{m}$  dans une suspension. Avec l'analyse MEB on peut retrouver la taille de ces particules dans l'éponge avec 1% d'HA. Par contre, dans le cas des éponges avec le pourcentage d'HAp plus élevé (*i.e.* 3 et 5%), il est difficile d'observer des particules isolées en raison de la forte densité des particules incorporées dans la matrice de CHT.

Ces caractéristiques ont été aussi rapportés par Ren *et al.*<sup>(301)</sup> pour des hydrogels d'alginate et carboxyméthyl-CHT avec des pourcentages de 2%, 4%, 6%, 8% et 10% d'HAp. Les résultats ont montré la bonne intégration d'HAp sur les parois de pores. A son tour, Cai *et al.*<sup>(306)</sup> ont rapporté une distribution homogène de nanoHAp sur les parois des pores dans la formation d'un scaffold à base de CHT.



**Figure 96.** Image MEB des hydrogels lyophilisés CS/PCDi/PCDs/HA. (A, A1) 3:1,5:1,5:0, (B, B1) 3:1,5:1,5:1, (C, C1) 3:1,5:1,5:3 et (D, D1) 3:1,5:1,5:5. Grossissement (A-D)  $\times 100$ , (A1-D1)  $\times 200$ .

### 3. Conclusion

Basé sur la formulation choisie de l'hydrogel 3:1,5:1,5, la faisabilité de former des hydrogels et éponges composites a été étudiée. L'HAp a été donc incorporée dans l'hydrogel 3:1,5:1,5 à trois concentrations.

Tout d'abord, l'analyse rhéologique a démontré que l'incorporation de l'HAp ne perturbe pas la formation des hydrogels mais améliore même ses propriétés viscoélastiques. En plus, la stabilité structurelle des hydrogels composites après injection dans un milieu aqueux n'a pas été affecté par la présence de l'HAp. Il est donc très prometteur pour une application en tant qu'hydrogel composite injectable.

Par la suite, la formation et la caractérisation des éponges composites a été réalisée. L'analyse par IFTR a démontré que l'HAp ne réagit pas chimiquement avec les composants polymères de l'hydrogel, et l'analyse de la microstructure des éponges composites par MEB a montré l'incorporation de l'HAp dans le réseau CHT/PCD et qui est visible sur les parois des pores.

Pour la prochaine étape, l'étude complète des propriétés rhéologiques des hydrogels composites y compris le caractère rhéofluidiant et autoréparant seront réalisés. Également, l'évaluation des propriétés mécaniques ainsi que des propriétés de dégradation et de gonflement seront nécessaires pour caractériser l'éponge composite. Ensuite, des études de cytotoxicité *in vitro* seront impératifs pour les deux matériaux composites. De plus, d'études supplémentaires sont nécessaires pour déterminer la meilleure concentration d'HAp dans la composition de l'hydrogel, et pour déterminer son potentiel ostéoconducteur.



## **CONCLUSION GENERALE**

---



La guérison de fractures osseuses et la reconstruction de défauts osseux représentent un problème majeur pour les cliniciens en chirurgie orthopédique et maxillo-faciale. Une alternative aux greffes osseuses conventionnelles est une approche par l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO). Elle nécessite un biomatériau « scaffold » présentant les caractéristiques essentielles comme la biocompatibilité, un faible coût, et d'excellentes propriétés ostéoconductive et/ou ostéoinductive mais également angiogéniques.

Ce travail de thèse portait sur l'élaboration de deux types de biomatériaux à base de CHT et de PCD destinés à être utilisés comme « scaffold » pour l'ITO sous différentes formes pour des applications cliniques : une éponge (dit hydrogel macroporeux) pour combler les défauts osseux relativement larges, et un hydrogel injectable pour la chirurgie mini-invasive.

La première partie a été consacrée au développement et à la caractérisation d'une éponge CHT/PCDs. Nous avons mis au point une méthode de fabrication du « précurseur » (hydrogel) en utilisant un système de deux seringues interconnectées qui a permis d'obtenir des hydrogels homogènes. Les éponges ont ensuite été mises en forme par lyophilisation des hydrogels et ont été stabilisées avec un traitement thermique (TT). La spectroscopie IRTF a montré que le TT permettait de réticuler le PCD et le CHT au sein de l'éponge par la formation de liaison amides. De plus, le TT à 160°C permettait d'avoir des propriétés optimales : Une importante capacité de gonflement dans le PBS (environ 600%), une dégradation modérée dans PBS enrichi avec lysozyme pendant 21 jours (perte de masse de 12%), et un module de compression de 256 kPa. Ainsi, l'éponge CHT/PCDs traitée à 160°C a été sélectionnée pour la suite des travaux. Les résultats ont montré que cette éponge avait une microstructure interconnectée hautement poreuse (87%) et une taille de pores d'environ 150 µm, idéale pour une application en tant que scaffold pour l'ITO. L'étude de cytocompatibilité par contact direct a démontré que les éponges étaient capables d'agir en tant que bio-support pour l'adhésion et la prolifération cellulaire vis-à-vis des cellules pré-ostéoblastes et des cellules endothéliales. Ainsi, l'éponge CHT/PCDs traitée à 160°C a répondu aux principales exigences pour l'ITO. Bien que le module de compression obtenu (256 kPa) ne corresponde à celui de l'os spongieux (0,1 – 2 GPa), il pourrait être amélioré par l'incorporation d'une charge minérale ou de facteurs de croissance pour favoriser les interactions matériaux-cellules.

L'étude suivante, axée sur la bio-fonctionnalisation de l'éponge CHT/PCDs avec le VEGF, était consacrée à l'évaluation de la cinétique de libération et de la bio-activité du VEGF. Nous avons observé que le milieu de libération utilisé dans l'étude jouait un rôle important dans le profil de libération. En utilisant un milieu enrichi de protéines sériques (plus proche des conditions physiologiques), le VEGF a été libéré rapidement pendant les premières 24 heures

puis de manière prolongée pendant 7 jours quel que soit la concentration étudiée. La quantité de VEGF libérée était clairement liée à la quantité de VEGF chargée dans l'éponge. Ceci est une variable importante d'ajustement de la concentration locale. La bio-activité du VEGF libéré par les éponges a été étudiée, plus spécifiquement sur son impact sur la prolifération et la migration des cellules endothéliales, qui sont deux processus importants lors de la vascularisation. Les effets pro-prolifération et pro-migration ont été démontrés pour le VEGF libéré notamment pendant les 2 à 3 premiers jours. Ce résultat prouve que le VEGF n'a pas été dégradé ou dénaturé lors du processus de chargement, de stockage et de libération.

La deuxième partie a été dédiée au développement des hydrogels injectables CHT/PCDi/PCDs par l'utilisation de PCD insoluble (PCDi) et soluble (PCDs) dans la formulation de l'hydrogel et leur impact sur les propriétés rhéologiques et sur la stabilité. L'analyse rhéologique a montré que le comportement élastique (mesuré par  $G'$ ) diminue avec l'augmentation de la proportion de PCDi dans la formulation. Les propriétés rhéofluidifiantes et autoréparantes des hydrogels ont été constatées par une observation macroscopique et une évaluation rhéologique, et ce quel que soit la formulation. Les études d'injectabilité des hydrogels ont montré qu'ils étaient adaptés à une application clinique ( $<45$  N). L'étude de la stabilité structurelle des hydrogels injectés dans un milieu aqueux a démontré l'importance de l'utilisation du PCDi dans la formulation des hydrogels injectables. En effet, l'hydrogel contenant que le CHT et le PCDs (3:0:3) s'est fortement contracté alors que l'hydrogel 3:1,5:1,5 (contenant le PCDi et PCD à parts égales) a montré une bonne stabilité pendant 7 jours et une excellente cytocompatibilité vis-à-vis des cellules pré-ostéoblastes. Cette formulation a permis de répondre aux principales exigences du cahier de charges afin d'être appliqué en tant qu'hydrogel injectable.

Finalement, une étude prospective a été dédiée au développement des hydrogels et éponges composites CHT/PCDi/PCDs/HAp en ajoutant une phase minérale (HAp) dans la formulation. Ceci permettra d'améliorer les propriétés mécaniques et ostéoconductrices de l'hydrogel. Ainsi, l'HAp a été incorporé à différentes concentrations dans la formulation présélectionnée de l'hydrogel (3:1,5:1,5). Les résultats ont montré que l'incorporation de l'HAp ne dérange pas la formation ou la stabilité structurelle des hydrogels dans un milieu aqueux, mais améliore ses propriétés viscoélastiques. Les éponges composites ont ensuite été mises en forme par lyophilisation à partir de ces hydrogels. Nous avons clairement observé les particules d'HAp dispersés de manière homogène sur les parois des pores au sein de la microstructure de l'éponge. Ces premiers résultats ont montré la possibilité de former un hydrogel injectable ou une éponge composite, et sont encourageants pour mener des études plus approfondies.

Ce travail de thèse multidisciplinaire, a montré certaines limitations comme l'optimisation du processus de lyophilisation qui reste à améliorer pour un meilleur contrôle de la microarchitecture de l'éponge, ou l'évaluation de la compatibilité du scaffold avec une méthode la stérilisation. Ceci devra être pris en compte dans les études futures pour avancer dans le développement et la commercialisation de ces nouveaux dispositifs médicaux.

En effet, la mise sur le marché de dispositifs médicaux suit un parcours avec de nombreuses étapes dont la maîtrise de la conception du dispositif médical avec la mise en place d'un système qualité, la phase marquage CE avec les étapes de validation réglementaire et l'industrialisation. Tout d'abord, les biomatériaux développés dans ce travail sont classés au regard du nouveau règlement européen (MDR2017/745) comme dispositifs médicaux implantables de classe III. Plus spécifiquement, l'éponge chargée de VEGF sera classifiée comme classe III combiné en raison de l'utilisation d'un agent thérapeutique. Concernant le marquage CE, plusieurs points du cahier de charge ont été déjà validés pour l'éponge comme la cytocompatibilité *in vitro*, la biodégradabilité et les propriétés mécaniques. Dans le cas des hydrogels, l'évaluation de leur biodégradabilité, bio-activité et propriétés mécaniques devront être évaluées. De plus, l'étape essentielle de la stérilisation et la stabilité dans le temps (stockage) n'ont pas été encore évalués pour les deux biomatériaux. Néanmoins, des études préliminaires au sein du laboratoire pour ces deux polymères utilisés dans un système multicouche (Thèse Alejandra Mogrovejo) ont permis de montrer la possibilité d'une stérilisation par rayons gamma.

Globalement, le développement de deux types de scaffolds ciblés pour l'ITO dans le cadre de cette thèse a fourni des résultats très encourageants.

Dans l'ensemble, cette étude a permis de mettre au point des scaffolds à base de CHT/PCD très prometteur pour l'ITO. Afin d'élaborer un hydrogel composite injectable pour la régénération du tissu osseux, la poursuite des stratégies de recherche suivantes serait envisageables: (1) Optimiser la concentration en HAp dans la formulation en évaluant les propriétés rhéologiques qui auront un impact sur l'injectabilité de l'hydrogel, la biodégradabilité et les propriétés mécaniques (2) Évaluer la faisabilité de charger l'hydrogel composite avec le VEGF et étudier sa cinétique de libération; et (3) étudier la bio-activité du VEGF libéré vis-à-vis des cellules endothéliales avec les méthodes développées dans cette thèse. En ce qui concerne le développement de l'éponge composite pour l'ITO, la stratégie d'études futures peut, d'une part, s'appuyer sur les résultats de l'étude de l'hydrogel et optimiser le composite; d'autre part, (1) caractériser les éponges composites de par les propriétés comme la porosité (par  $\mu$ CT), propriétés mécaniques (compression, traction, etc.) et biodégradabilité ; (2) évaluer le chargement et la libération de VEGF mais également le chargement de facteurs de croissance multiples (FGF-2, BMP-2, etc.). Pour les deux dispositifs médicaux, une étude de



la bio-activité *in vitro* vis-à-vis des cellules ostéoblastes avec des essais de prolifération et de différenciation cellulaires (activité de la phosphatase alcaline, la minéralisation, *etc.*) pourront être réalisés. Finalement, l'évaluation *in vivo* de la biocompatibilité et de l'efficacité pour la réparation osseuse pourra être évaluée dans un modèle animal de lapin (défaut crânien et mandibule) validé au sein de notre laboratoire.

Les résultats obtenus dans ce travail nous permettraient de proposer des applications cliniques pertinentes pour les deux types de scaffold développés :

- L'éponge peut être utilisée en tant que comblement pour les défauts osseux en chirurgie maxillo-faciale, par exemple dans l'augmentation du sinus maxillaire et dans la reconstruction de la crête alvéolaire suite à une résection tumorale ou une ostéotomie.
- L'hydrogel injectable peut être utilisé comme comblement pour les défauts parodontaux et alvéolaires dans le cas d'une parodontie.

## REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

---

1. Stevens MM. Biomaterials for bone tissue engineering. *Materials Today*. mai 2008;11(5):18-25.
2. Beniash E. Biominerals-hierarchical nanocomposites: the example of bone: Biominerals-hierarchical nanocomposites. *Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology*. janv 2011;3(1):47-69.
3. Nair AK, Gautieri A, Chang S-W, Buehler MJ. Molecular mechanics of mineralized collagen fibrils in bone. *Nature Communications* [Internet]. déc 2013 [cité 30 oct 2018];4(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/ncomms2720>
4. Pereira I, Rodrigues C, Rodrigues A, Oliveira M, Gama M. Injectable hydrogels as a delivery system for bone regeneration. In: *Bioinspired Materials for Medical Applications* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 30 oct 2018]. p. 241-71. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081007419000097>
5. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Crit Rev Biomed Eng*. 2012;40(5):363-408.
6. Sommerfeldt D, Rubin C. Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton. *Eur Spine J*. oct 2001;10(Suppl 2):S86-95.
7. Lindahl A, Brittberg M, Gibbs D, Dawson JI, Kanczler J, Black C, et al. Cartilage and Bone Regeneration. In: *Tissue Engineering* [Internet]. Elsevier; 2015 [cité 30 oct 2018]. p. 529-82. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012420145300016X>
8. Polo-Corrales L, Latorre-Esteves M, Ramirez-Vick JE. Scaffold Design for Bone Regeneration. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*. 1 janv 2014;14(1):15-56.
9. Walsh JS. Normal bone physiology, remodelling and its hormonal regulation. *Surgery (Oxford)*. 1 janv 2015;33(1):1-6.
10. Florencio-Silva R, Sasso GR da S, Sasso-Cerri E, Simões MJ, Cerri PS. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells [Internet]. *BioMed Research International*. 2015 [cité 1 nov 2018]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/bmri/2015/421746/>
11. Lalande C. Développement d'un nouveau produit d'ingenierie tissulaire osseuse à base de polymères et de cellules souches du tissu adipeux. Université Bordeaux Segalen; 2011.
12. Clarke B. Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology*. 1 nov 2008;3(Supplement 3):S131-9.
13. Rouwkema J. Prevascularized bone tissue engineering. [S.l.]: s.n.; 2007.
14. Amini AR, Laurencin CT, Nukavarapu SP. Bone Tissue Engineering: Recent Advances and Challenges. *Critical Reviews™ in Biomedical Engineering*. 2012;40:363-408.
15. Mohamed KR. Biocomposite Materials. *Composites and Their Applications* [Internet]. 2012 [cité 30 oct 2018]; Disponible sur: <https://www.intechopen.com/books/composites-and-their-applications/biocomposite-materials>
16. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC. Bone tissue engineering: A review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnology Progress*. 1 nov 2009;25(6):1539-60.
17. Kini U, Nandeesh BN. Physiology of Bone Formation, Remodeling, and Metabolism. In: Fogelman I, Gnanasegaran G, van der Wall H, éditeurs. *Radionuclide and Hybrid Bone Imaging*

- [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2012 [cité 2 nov 2018]. p. 29-57. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-02400-9\\_2](http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-02400-9_2)
18. Wang W, Yeung KWK. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioactive Materials*. déc 2017;2(4):224-47.
  19. Marie P. Différenciation, fonction et contrôle de l'ostéoblaste. *médecine/sciences*. déc 2001;17(12):1252-9.
  20. L'os à l'échelle microscopique [Internet]. [cité 3 nov 2018]. Disponible sur: <http://tpe-fabrication-os.e-monsite.com/pages/l-os-a-l-echelle-microscopique.html>
  21. Weyand B, von Schroeder HP. Bone Challenges for the Hand Surgeon: From Basic Bone Biology to Future Clinical Applications. *Clinics in Plastic Surgery*. oct 2005;32(4):537-47.
  22. García JR, García AJ. Biomaterial-mediated strategies targeting vascularization for bone repair. *Drug Delivery and Translational Research*. avr 2016;6(2):77-95.
  23. Mercado-Pagán ÁE, Stahl AM, Shanjani Y, Yang Y. Vascularization in Bone Tissue Engineering Constructs. *Annals of Biomedical Engineering*. mars 2015;43(3):718-29.
  24. Filipowska J, Tomaszewski KA, Niedźwiedzki Ł, Walocha JA, Niedźwiedzki T. The role of vasculature in bone development, regeneration and proper systemic functioning. *Angiogenesis*. 2017;20(3):291-302.
  25. Tang D, Tare RS, Yang L-Y, Williams DF, Ou K-L, Oreffo ROC. Biofabrication of bone tissue: approaches, challenges and translation for bone regeneration. *Biomaterials*. 1 mars 2016;83:363-82.
  26. Marrella A, Lee TY, Lee DH, Karuthedom S, Syla D, Chawla A, et al. Engineering vascularized and innervated bone biomaterials for improved skeletal tissue regeneration. *Materials Today*. mai 2018;21(4):362-76.
  27. Santos MI, Reis RL. Vascularization in Bone Tissue Engineering: Physiology, Current Strategies, Major Hurdles and Future Challenges. *Macromolecular Bioscience*. 10(1):12-27.
  28. Hu K, Olsen BR. The roles of vascular endothelial growth factor in bone repair and regeneration. *Bone*. 1 oct 2016;91:30-8.
  29. Wang Y, Newman MR, Benoit DSW. Development of Controlled Drug Delivery Systems for Bone Fracture-Targeted Therapeutic Delivery: A Review. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* [Internet]. [cité 22 févr 2018]; Disponible sur: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641118300110>
  30. Mohammadi M, Mousavi Shaegh SA, Alibolandi M, Ebrahimzadeh MH, Tamayol A, Jaafari MR, et al. Micro and nanotechnologies for bone regeneration: Recent advances and emerging designs. *Journal of Controlled Release*. 28 mars 2018;274:35-55.
  31. Mehta M, Schmidt-Bleek K, Duda GN, Mooney DJ. Biomaterial delivery of morphogens to mimic the natural healing cascade in bone. *Advanced Drug Delivery Reviews*. sept 2012;64(12):1257-76.
  32. Agarwal R, García AJ. Biomaterial strategies for engineering implants for enhanced osseointegration and bone repair. *Advanced Drug Delivery Reviews*. nov 2015;94:53-62.
  33. Shakya AK, Kandalam U. Three-dimensional macroporous materials for tissue engineering of craniofacial bone. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*. nov 2017;55(9):875-91.

34. Rizzo M, Moran S. Vascularized Bone Grafts and Their Applications in the Treatment of Carpal Pathology. *Seminars in Plastic Surgery*. août 2008;22(03):213-27.
35. Beaman FD, Bancroft LW, Peterson JJ, Kransdorf MJ. Bone Graft Materials and Synthetic Substitutes. *Radiologic Clinics of North America*. 1 mai 2006;44(3):451-61.
36. Krishnan L, Willett NJ, Guldborg RE. Vascularization Strategies for Bone Regeneration. *Annals of Biomedical Engineering*. févr 2014;42(2):432-44.
37. Raoul G, Myon L, Chai F, Blanchemain N, Ferri J. Ingénierie d'un lambeau osseux vascularisé à destinée maxillofaciale : les limites techniques. *Revue de Stomatologie et de Chirurgie Maxillo-faciale*. 1 sept 2011;112(4):249-61.
38. Flores C. Substituts hybrides (polymères/biocéramiques) à libération prolongée d'antibiotiques pour le traitement des infections osseuses. Université de Lille; 2015.
39. Titsinides S, Agrogiannis G, Karatzas T. Bone grafting materials in dentoalveolar reconstruction: A comprehensive review. *Japanese Dental Science Review* [Internet]. 28 sept 2018 [cité 9 nov 2018]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1882761618300395>
40. Campana V, Milano G, Pagano E, Barba M, Cicione C, Salonna G, et al. Bone substitutes in orthopaedic surgery: from basic science to clinical practice. *J Mater Sci Mater Med*. oct 2014;25(10):2445-61.
41. Kolk A, Handschel J, Drescher W, Rothamel D, Kloss F, Blessmann M, et al. Current trends and future perspectives of bone substitute materials – From space holders to innovative biomaterials. *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery*. déc 2012;40(8):706-18.
42. Fernandez de Grado G, Keller L, Idoux-Gillet Y, Wagner Q, Musset A-M, Benkirane-Jessel N, et al. Bone substitutes: a review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *Journal of Tissue Engineering*. janv 2018;9:204173141877681.
43. Bhatt RA, Rozental TD. Bone Graft Substitutes. *Hand Clinics*. 1 nov 2012;28(4):457-68.
44. Navarro M, Michiardi A, Castaño O, Planell J. Biomaterials in orthopaedics. *J R Soc Interface*. 6 oct 2008;5(27):1137-58.
45. Nguyen HQ, Deporter DA, Pilliar RM, Valiquette N, Yakubovich R. The effect of sol-gel-formed calcium phosphate coatings on bone ingrowth and osteoconductivity of porous-surfaced Ti alloy implants. *Biomaterials*. 1 févr 2004;25(5):865-76.
46. Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 1 oct 2018;180:143-62.
47. Ilan DI, Ladd AL. Bone graft substitutes. *Operative Techniques in Plastic and Reconstructive Surgery*. 1 nov 2002;9(4):151-60.
48. Thrikraman G, Athirasala A, Twohig C, Boda SK, Bertassoni LE. Biomaterials for Craniofacial Bone Regeneration. *Dental Clinics of North America*. oct 2017;61(4):835-56.
49. Haute Autorité de Santé - INDUCTOS [Internet]. [cité 11 nov 2018]. Disponible sur: [https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c\\_401004/en/inductos](https://www.has-sante.fr/portail/jcms/c_401004/en/inductos)
50. Van Cauwenberge H, Georis P, Figiel S, Gillet P. Reconstruction osseuse et BMP-2 (Inductos) : une expérience de 70 patients. *Revue de Chirurgie Orthopédique et Traumatologique*. 1 nov 2012;98(7, Supplément):S289.

51. Mansouri N, SamiraBagheri. The influence of topography on tissue engineering perspective. *Materials Science and Engineering: C*. avr 2016;61:906-21.
52. Petrovic V, Zivkovic P, Petrovic D, Stefanovic V. Craniofacial bone tissue engineering. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*. sept 2012;114(3):e1-9.
53. Melek LN. Tissue engineering in oral and maxillofacial reconstruction. *Tanta Dental Journal*. 1 sept 2015;12(3):211-23.
54. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, et al. Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Materials Science and Engineering: C*. sept 2017;78:1246-62.
55. Sengupta D, Waldman SD, Li S. From In Vitro to In Situ Tissue Engineering. *Annals of Biomedical Engineering*. juill 2014;42(7):1537-45.
56. O'Brien FJ. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today*. mars 2011;14(3):88-95.
57. Lopes D, Martins-Cruz C, Oliveira MB, Mano JF. Bone physiology as inspiration for tissue regenerative therapies. *Biomaterials*. 1 déc 2018;185:240-75.
58. Sellgren KL, Ma T. Effects of flow configuration on bone tissue engineering using human mesenchymal stem cells in 3D chitosan composite scaffolds: EFFECTS OF FLOW CONFIGURATION ON BONE TISSUE ENGINEERING. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. août 2015;103(8):2509-20.
59. He X, Dziak R, Yuan X, Mao K, Genco R, Swihart M, et al. BMP2 Genetically Engineered MSCs and EPCs Promote Vascularized Bone Regeneration in Rat Critical-Sized Calvarial Bone Defects. *PLOS ONE*. abr 2013;8(4):e60473.
60. Xing Z, Xue Y, Finne-Wistrand A, Yang Z-Q, Mustafa K. Copolymer cell/scaffold constructs for bone tissue engineering: Co-culture of low ratios of human endothelial and osteoblast-like cells in a dynamic culture system. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2013;101A(4):1113-20.
61. Hassanzadeh P, Atyabi F, Dinarvand R. Tissue engineering: Still facing a long way ahead. *Journal of Controlled Release*. juin 2018;279:181-97.
62. Murdock MH, Badylak SF. Biomaterials-based in situ tissue engineering. *Current Opinion in Biomedical Engineering*. mars 2017;1:4-7.
63. Lee SJ, Yoo JJ, Atala A. Fundamentals of In Situ Tissue Regeneration. In: *In Situ Tissue Regeneration* [Internet]. Elsevier; 2016 [cité 12 nov 2018]. p. 3-17. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128022252000015>
64. Li Q, Ma L, Gao C. Biomaterials for in situ tissue regeneration: development and perspectives. *Journal of Materials Chemistry B*. 2015;3(46):8921-38.
65. Andreas K, Sittinger M, Ringe J. Toward in situ tissue engineering: chemokine-guided stem cell recruitment. *Trends in Biotechnology*. sept 2014;32(9):483-92.
66. Boerckel JD, Kolambkar YM, Dupont KM, Uhrig BA, Phelps EA, Stevens HY, et al. Effects of protein dose and delivery system on BMP-mediated bone regeneration. *Biomaterials*. août 2011;32(22):5241-51.
67. Akter F, Ibanez J. Bone and Cartilage Tissue Engineering. In: *Tissue Engineering Made Easy* [Internet]. Elsevier; 2016 [cité 19 nov 2018]. p. 77-97. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780128053614000084>

68. Tollemar V, Collier ZJ, Mohammed MK, Lee MJ, Ameer GA, Reid RR. Stem cells, growth factors and scaffolds in craniofacial regenerative medicine. *Genes & Diseases*. mars 2016;3(1):56-71.
69. Herrmann M, Laschke MW, Alini M, Scherberich A, Verrier S. Vascularization, Survival, and Functionality of Tissue-Engineered Constructs. In: *Tissue Engineering* [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 23 nov 2018]. p. 471-96. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780124201453000146>
70. Buranawat B, Kalia P, Di Silvio L. Vascularisation of tissue-engineered constructs. In: *Standardisation in Cell and Tissue Engineering* [Internet]. Elsevier; 2013 [cité 23 nov 2018]. p. 77-103a. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857094193500054>
71. Herrmann M, Verrier S, Alini M. Strategies to Stimulate Mobilization and Homing of Endogenous Stem and Progenitor Cells for Bone Tissue Repair. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* [Internet]. 2 juin 2015 [cité 12 nov 2018];3. Disponible sur: <http://journal.frontiersin.org/Article/10.3389/fbioe.2015.00079/abstract>
72. Fu J, Wang D-A. In Situ Organ-Specific Vascularization in Tissue Engineering. *Trends in Biotechnology*. août 2018;36(8):834-49.
73. Bose S, Roy M, Bandyopadhyay A. Recent advances in bone tissue engineering scaffolds. *Trends in Biotechnology*. oct 2012;30(10):546-54.
74. Chan BP, Leong KW. Scaffolding in tissue engineering: general approaches and tissue-specific considerations. *European Spine Journal*. déc 2008;17(S4):467-79.
75. Turnbull G, Clarke J, Picard F, Riches P, Jia L, Han F, et al. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioactive Materials*. 1 sept 2018;3(3):278-314.
76. Preethi Soundarya S, Haritha Menon A, Viji Chandran S, Selvamurugan N. Bone tissue engineering: Scaffold preparation using chitosan and other biomaterials with different design and fabrication techniques. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 nov 2018;119:1228-39.
77. Tian T, Zhang T, Lin Y, Cai X. Vascularization in Craniofacial Bone Tissue Engineering. *Journal of Dental Research*. août 2018;97(9):969-76.
78. Eap S, Ferrand A, Mendoza Palomares C, Hébraud A, Stoltz J-F, Mainard D, et al. Electrospun nanofibrous 3D scaffold for bone tissue engineering. *Bio-Medical Materials and Engineering*. 1 janv 2012;22(1-3):137-41.
79. Grémare A, Guduric V, Bareille R, Heroguez V, Latour S, L'heureux N, et al. Characterization of printed PLA scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2018;106(4):887-94.
80. Hao Z, Song Z, Huang J, Huang K, Panetta A, Gu Z, et al. The scaffold microenvironment for stem cell based bone tissue engineering. *Biomater Sci*. 26 juill 2017;5(8):1382-92.
81. Meurice E, Bouchart F, Hornez JC, Leriche A, Hautcoeur D, Lardot V, et al. Osteoblastic cells colonization inside beta-TCP macroporous structures obtained by ice-templating. *Journal of the European Ceramic Society*. 1 sept 2016;36(12):2895-901.
82. Shao H, He J, Lin T, Zhang Z, Zhang Y, Liu S. 3D gel-printing of hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Ceramics International*. 1 janv 2019;45(1):1163-70.
83. Lian H, Zhang L, Meng Z. Biomimetic hydroxyapatite/gelatin composites for bone tissue regeneration: Fabrication, characterization, and osteogenic differentiation in vitro. *Materials & Design*. 15 oct 2018;156:381-8.

84. Moreira CDF, Carvalho SM, Sousa RG, Mansur HS, Pereira MM. Nanostructured chitosan/gelatin/bioactive glass in situ forming hydrogel composites as a potential injectable matrix for bone tissue engineering. *Materials Chemistry and Physics*. 1 oct 2018;218:304-16.
85. Vo TN, Kasper FK, Mikos AG. Strategies for controlled delivery of growth factors and cells for bone regeneration. *Advanced Drug Delivery Reviews*. sept 2012;64(12):1292-309.
86. Custódio CA, Reis RL, Mano JF. Engineering Biomolecular Microenvironments for Cell Instructive Biomaterials. *Advanced Healthcare Materials*. 2014;3(6):797-810.
87. Kesireddy V, Kasper FK. Approaches for building bioactive elements into synthetic scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B*. 26 oct 2016;4(42):6773-86.
88. Lee S-H, Shin H. Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Advanced Drug Delivery Reviews*. mai 2007;59(4-5):339-59.
89. Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR. Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1 févr 2013;133(2):153-65.
90. Almubarak S, Nethercott H, Freeberg M, Beaudon C, Jha A, Jackson W, et al. Tissue engineering strategies for promoting vascularized bone regeneration. *Bone*. 1 févr 2016;83:197-209.
91. Saran U, Gemini Piperni S, Chatterjee S. Role of angiogenesis in bone repair. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1 nov 2014;561:109-17.
92. De Rosa L, Di Stasi R, D'Andrea LD. Pro-angiogenic peptides in biomedicine. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. déc 2018;660:72-86.
93. Beamer B, Hettrich C, Lane J. Vascular Endothelial Growth Factor: An Essential Component of Angiogenesis and Fracture Healing. *HSS Jnl*. 1 févr 2010;6(1):85-94.
94. De la Riva B, Nowak C, Sánchez E, Hernández A, Schulz-Siegmund M, Pec MK, et al. VEGF-controlled release within a bone defect from alginate/chitosan/PLA-H scaffolds. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*. 1 sept 2009;73(1):50-8.
95. Behr B, Sorkin M, Lehnhardt M, Renda A, Longaker MT, Quarto N. A comparative analysis of the osteogenic effects of BMP-2, FGF-2, and VEGFA in a calvarial defect model. *Tissue Eng Part A*. mai 2012;18(9-10):1079-86.
96. Farokhi M, Mottaghitalab F, Shokrgozar MA, Ai J, Hadjati J, Azami M. Bio-hybrid silk fibroin/calcium phosphate/PLGA nanocomposite scaffold to control the delivery of vascular endothelial growth factor. *Materials Science and Engineering: C*. 1 févr 2014;35:401-10.
97. Li B, Wang H, Zhou G, Zhang J, Su X, Huang Z, et al. VEGF-loaded biomimetic scaffolds: a promising approach to improve angiogenesis and osteogenesis in an ischemic environment. *RSC Advances*. 2017;7(8):4253-9.
98. Chen F-M, Zhang M, Wu Z-F. Toward delivery of multiple growth factors in tissue engineering. *Biomaterials*. 1 août 2010;31(24):6279-308.
99. Chen F-M, Wu L-A, Zhang M, Zhang R, Sun H-H. Homing of endogenous stem/progenitor cells for in situ tissue regeneration: Promises, strategies, and translational perspectives. *Biomaterials*. avr 2011;32(12):3189-209.
100. Amirian J, Linh NTB, Min YK, Lee B-T. Bone formation of a porous Gelatin-Pectin-biphasic calcium phosphate composite in presence of BMP-2 and VEGF. *International Journal of Biological Macromolecules*. mai 2015;76:10-24.

101. Dou DD, Zhou G, Liu HW, Zhang J, Liu ML, Xiao XF, et al. Sequential releasing of VEGF and BMP-2 in hydroxyapatite collagen scaffolds for bone tissue engineering: Design and characterization. *International Journal of Biological Macromolecules*. févr 2019;123:622-8.
102. Kempen DHR, Lu L, Heijink A, Hefferan TE, Creemers LB, Maran A, et al. Effect of local sequential VEGF and BMP-2 delivery on ectopic and orthotopic bone regeneration. *Biomaterials*. 1 mai 2009;30(14):2816-25.
103. De la Riva B, Sánchez E, Hernández A, Reyes R, Tamimi F, López-Cabarcos E, et al. Local controlled release of VEGF and PDGF from a combined brushite–chitosan system enhances bone regeneration. *Journal of Controlled Release*. 2 avr 2010;143(1):45-52.
104. Farokhi M, Mottaghitlab F, Ai J, Shokrgozar MA. Sustained release of platelet-derived growth factor and vascular endothelial growth factor from silk/calcium phosphate/PLGA based nanocomposite scaffold. *International Journal of Pharmaceutics*. 15 sept 2013;454(1):216-25.
105. Bai X, Gao M, Syed S, Zhuang J, Xu X, Zhang X-Q. Bioactive hydrogels for bone regeneration. *Bioactive Materials*. 1 déc 2018;3(4):401-17.
106. Bhattarai N, Gunn J, Zhang M. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Advanced Drug Delivery Reviews*. janv 2010;62(1):83-99.
107. Kishida A, Ikada Y. Hydrogels for Biomedical and Pharmaceutical Applications. In: Dumitriu S, éditeur. *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded* [Internet]. CRC Press; 2001 [cité 1 févr 2019]. Disponible sur: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9780203904671.ch6>
108. Naahidi S, Jafari M, Logan M, Wang Y, Yuan Y, Bae H, et al. Biocompatibility of hydrogel-based scaffolds for tissue engineering applications. *Biotechnology Advances*. 1 sept 2017;35(5):530-44.
109. Ullah F, Othman MBH, Javed F, Ahmad Z, Akil HM. Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and Engineering: C*. déc 2015;57:414-33.
110. Varaprasad K, Raghavendra GM, Jayaramudu T, Yallapu MM, Sadiku R. A mini review on hydrogels classification and recent developments in miscellaneous applications. *Materials Science and Engineering: C*. oct 2017;79:958-71.
111. Bahram M, Mohseni N, Moghtader M. An Introduction to Hydrogels and Some Recent Applications. In: Majee SB, éditeur. *Emerging Concepts in Analysis and Applications of Hydrogels* [Internet]. InTech; 2016 [cité 3 févr 2019]. Disponible sur: <http://www.intechopen.com/books/emerging-concepts-in-analysis-and-applications-of-hydrogels/an-introduction-to-hydrogels-and-some-recent-applications>
112. Zahedi E, Ansari S, Wu BM, Bencharit S, Moshaverinia A. Hydrogels in craniofacial tissue engineering. In: *Biomaterials for Oral and Dental Tissue Engineering* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 2 févr 2019]. p. 47-64. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081009611000049>
113. Park K-H, Kim H, Moon S, Na K. Bone morphogenic protein-2 (BMP-2) loaded nanoparticles mixed with human mesenchymal stem cell in fibrin hydrogel for bone tissue engineering. *Journal of Bioscience and Bioengineering*. 1 déc 2009;108(6):530-7.
114. Arun Kumar R, Sivashanmugam A, Deepthi S, Bumgardner JD, Nair SV, Jayakumar R. Nano-fibrin stabilized CaSO 4 crystals incorporated injectable chitin composite hydrogel for enhanced angiogenesis & osteogenesis. *Carbohydrate Polymers*. avr 2016;140:144-53.
115. Silva SS, Oliveira NM, Oliveira MB, da Costa DPS, Naskar D, Mano JF, et al. Fabrication and characterization of Eri silk fibers-based sponges for biomedical application. *Acta Biomaterialia*. mars 2016;32:178-89.



116. Ribeiro M, Fernandes MH, Beppu MM, Monteiro FJ, Ferraz MP. Silk fibroin/nanohydroxyapatite hydrogels for promoted bioactivity and osteoblastic proliferation and differentiation of human bone marrow stromal cells. *Materials Science and Engineering: C*. 1 août 2018;89:336-45.
117. Davidenko N, Gibb T, Schuster C, Best SM, Campbell JJ, Watson CJ, et al. Biomimetic collagen scaffolds with anisotropic pore architecture. *Acta Biomaterialia*. févr 2012;8(2):667-76.
118. Zhang D, Wu X, Chen J, Lin K. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioactive Materials*. 1 mars 2018;3(1):129-38.
119. Rodriguez I, Sell S, McCool J, Saxena G, Spence A, Bowlin G. A Preliminary Evaluation of Lyophilized Gelatin Sponges, Enhanced with Platelet-Rich Plasma, Hydroxyapatite and Chitin Whiskers for Bone Regeneration. *Cells*. 26 avr 2013;2(2):244-65.
120. Echave MC, Sánchez P, Pedraz JL, Orive G. Progress of gelatin-based 3D approaches for bone regeneration. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 1 déc 2017;42:63-74.
121. Kapoor S, Kundu SC. Silk protein-based hydrogels: Promising advanced materials for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 1 févr 2016;31:17-32.
122. Zhang Y, Heher P, Hilborn J, Redl H, Ossipov DA. Hyaluronic acid-fibrin interpenetrating double network hydrogel prepared in situ by orthogonal disulfide cross-linking reaction for biomedical applications. *Acta Biomaterialia*. 1 juill 2016;38:23-32.
123. Patterson J, Siew R, Herring SW, Lin ASP, Guldberg R, Stayton PS. Hyaluronic acid hydrogels with controlled degradation properties for oriented bone regeneration. *Biomaterials*. sept 2010;31(26):6772-81.
124. Guillaume O, Naqvi SM, Lennon K, Buckley CT. Enhancing cell migration in shape-memory alginate–collagen composite scaffolds: In vitro and ex vivo assessment for intervertebral disc repair. *Journal of Biomaterials Applications*. avr 2015;29(9):1230-46.
125. Diaz-Rodriguez P, Garcia-Triñanes P, Echezarreta López MM, Santoveña A, Landin M. Mineralized alginate hydrogels using marine carbonates for bone tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*. 1 sept 2018;195:235-42.
126. Varma DM, Gold GT, Taub PJ, Nicoll SB. Injectable carboxymethylcellulose hydrogels for soft tissue filler applications. *Acta Biomaterialia*. 1 déc 2014;10(12):4996-5004.
127. Laïb S, Fellaï BH, Fatimi A, Quillard S, Vinatier C, Gauthier O, et al. The in vivo degradation of a ruthenium labelled polysaccharide-based hydrogel for bone tissue engineering. *Biomaterials*. mars 2009;30(8):1568-77.
128. Zheng Y, Huang K, You X, Huang B, Wu J, Gu Z. Hybrid hydrogels with high strength and biocompatibility for bone regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. nov 2017;104:1143-9.
129. Lee JH. Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomater Res [Internet]*. 26 sept 2018 [cité 20 mars 2019];22. Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6158836/>
130. Sivashanmugam A, Arun Kumar R, Vishnu Priya M, Nair SV, Jayakumar R. An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*. nov 2015;72:543-65.
131. Pal A, Vernon BL, Nikkhah M. Therapeutic neovascularization promoted by injectable hydrogels. *Bioactive Materials*. déc 2018;3(4):389-400.

132. Saravanan S, Vimalraj S, Thanikaivelan P, Banudevi S, Manivasagam G. A review on injectable chitosan/beta glycerophosphate hydrogels for bone tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 janv 2019;121:38-54.
133. Chang B, Ahuja N, Ma C, Liu X. Injectable scaffolds: Preparation and application in dental and craniofacial regeneration. *Mater Sci Eng R Rep*. janv 2017;111:1-26.
134. Chen MH, Wang LL, Chung JJ, Kim Y-H, Atluri P, Burdick JA. Methods To Assess Shear-Thinning Hydrogels for Application As Injectable Biomaterials. *ACS Biomater Sci Eng*. 11 déc 2017;3(12):3146-60.
135. Guvendiren M, Lu HD, Burdick JA. Shear-thinning hydrogels for biomedical applications. *Soft Matter*. 8 déc 2011;8(2):260-72.
136. Chichiricco PM, Riva R, Thomassin J-M, Lesoeur J, Struillou X, Le Visage C, et al. In situ photochemical crosslinking of hydrogel membrane for Guided Tissue Regeneration. *Dental Materials*. déc 2018;34(12):1769-82.
137. Tang Y, Heaysman CL, Willis S, Lewis AL. Physical hydrogels with self-assembled nanostructures as drug delivery systems. *Expert Opinion on Drug Delivery*. sept 2011;8(9):1141-59.
138. Nguyen QV, Huynh DP, Park JH, Lee DS. Injectable polymeric hydrogels for the delivery of therapeutic agents: A review. *European Polymer Journal*. 1 nov 2015;72:602-19.
139. Foster AA, Marquardt LM, Heilshorn SC. The diverse roles of hydrogel mechanics in injectable stem cell transplantation. *Current Opinion in Chemical Engineering*. févr 2017;15:15-23.
140. Van Vlierberghe S, Graulus G-J, Keshari Samal S, Van Nieuwenhove I, Dubrue P. Porous hydrogel biomedical foam scaffolds for tissue repair. In: *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications* [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 1 févr 2019]. p. 335-90. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857096968500127>
141. Basics of rheology :: Anton Paar Wiki [Internet]. Anton Paar. [cité 21 mars 2019]. Disponible sur: <https://wiki.anton-paar.com/en/basics-of-rheology/>
142. McLemore R. Rheological properties of injectable biomaterials. In: *Injectable Biomaterials* [Internet]. Elsevier; 2011 [cité 21 mars 2019]. p. 46-60. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845695880500036>
143. Borzacchiello A, Ambrosio L. Structure-Property Relationships in Hydrogels. In: *Hydrogels* [Internet]. Milano: Springer Milan; 2009 [cité 30 juill 2018]. p. 9-20. Disponible sur: [http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-88-470-1104-5\\_2](http://www.springerlink.com/index/10.1007/978-88-470-1104-5_2)
144. von Lospichl B, Hemmati-Sadeghi S, Dey P, Dehne T, Haag R, Sittinger M, et al. Injectable hydrogels for treatment of osteoarthritis – A rheological study. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1 nov 2017;159:477-83.
145. Curso: Rhéologie [Internet]. [cité 21 mars 2019]. Disponible sur: <https://moodle.umontpellier.fr/course/view.php?id=273>
146. Kona S, Wadajkar AS, Nguyen KT. Tissue engineering applications of injectable biomaterials. In: *Injectable Biomaterials* [Internet]. Elsevier; 2011 [cité 7 févr 2019]. p. 142-82. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9781845695880500061>
147. Wang H, Hansen MB, Löwik DWPM, van Hest JCM, Li Y, Jansen JA, et al. Oppositely Charged Gelatin Nanospheres as Building Blocks for Injectable and Biodegradable Gels. *Advanced Materials*. 25 mars 2011;23(12):H119-24.

148. O'Hara R, Buchanan F, Dunne N. Injectable calcium phosphate cements for spinal bone repair. In: *Biomaterials for Bone Regeneration* [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 22 mars 2019]. p. 26-61. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780857098047500029>
149. Lima DB, Almeida RD, Pasquali M, Borges SP, Fook ML, Lisboa HM. Physical characterization and modeling of chitosan/peg blends for injectable scaffolds. *Carbohydrate Polymers*. juin 2018;189:238-49.
150. Vo A, Doumit M, Rockwell G. The Biomechanics and Optimization of the Needle-Syringe System for Injecting Triamcinolone Acetonide into Keloids. *Journal of Medical Engineering*. 2016;2016:1-8.
151. Cilurzo F, Selmin F, Minghetti P, Adami M, Bertoni E, Lauria S, et al. Injectability Evaluation: An Open Issue. *AAPS PharmSciTech*. juin 2011;12(2):604-9.
152. Dhandayuthapani B, Yoshida Y, Maekawa T, Kumar DS. Polymeric Scaffolds in Tissue Engineering Application: A Review [Internet]. *International Journal of Polymer Science*. 2011 [cité 25 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2011/290602/>
153. Flégeau K, Pace R, Gautier H, Rethore G, Guicheux J, Le Visage C, et al. Toward the development of biomimetic injectable and macroporous biohydrogels for regenerative medicine. *Advances in Colloid and Interface Science*. 1 sept 2017;247:589-609.
154. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan for bone repair and regeneration. In: *Bone Substitute Biomaterials* [Internet]. Elsevier; 2014 [cité 30 oct 2018]. p. 244-60. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978085709497150010X>
155. Berretta J, Bumgardner JD, Jennings JA. Lyophilized chitosan sponges. In: *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 14 févr 2019]. p. 239-53. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081002308000108>
156. Croisier F, Jérôme C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*. avr 2013;49(4):780-92.
157. Liu X, Ma L, Mao Z, Gao C. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Repair and Regeneration. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, éditeurs. *Chitosan for Biomaterials II* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011 [cité 5 févr 2019]. p. 81-127. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/12\\_2011\\_118](http://link.springer.com/10.1007/12_2011_118)
158. Saravanan S, Leena RS, Selvamurugan N. Chitosan based biocomposite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 déc 2016;93:1354-65.
159. Racine L, Texier I, Auzély-Velty R. Chitosan-based hydrogels: recent design concepts to tailor properties and functions: Chitosan-based hydrogels: tailoring properties and functions. *Polymer International*. juill 2017;66(7):981-98.
160. Ahmed S, Annu, Ali A, Sheikh J. A review on chitosan centred scaffolds and their applications in tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. sept 2018;116:849-62.
161. Vedadghavami A, Minooei F, Mohammadi MH, Khetani S, Rezaei Kolahchi A, Mashayekhan S, et al. Manufacturing of hydrogel biomaterials with controlled mechanical properties for tissue engineering applications. *Acta Biomaterialia*. 15 oct 2017;62:42-63.
162. Felfel RM, Gideon-Adeniyi MJ, Zakir Hossain KM, Roberts GAF, Grant DM. Structural, mechanical and swelling characteristics of 3D scaffolds from chitosan-agarose blends. *Carbohydrate Polymers*. janv 2019;204:59-67.

163. Gil ES, Kluge JA, Rockwood DN, Rajkhowa R, Wang L, Wang X, et al. Mechanical improvements to reinforced porous silk scaffolds. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 2011;99A(1):16-28.
164. Vunain E, Mishra AK, Mamba BB. Fundamentals of chitosan for biomedical applications. In: *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 6 févr 2019]. p. 3-30. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081002308000017>
165. Mittal H, Ray SS, Kaith BS, Bhatia JK, Sukriti, Sharma J, et al. Recent progress in the structural modification of chitosan for applications in diversified biomedical fields. *European Polymer Journal*. déc 2018;109:402-34.
166. Tchobanian A, Van Oosterwyck H, Fardim P. Polysaccharides for tissue engineering: Current landscape and future prospects. *Carbohydrate Polymers*. févr 2019;205:601-25.
167. Rinaudo M. Chitin and chitosan: Properties and applications. *Progress in Polymer Science*. 1 juill 2006;31(7):603-32.
168. Muxika A, Etxabide A, Uranga J, Guerrero P, de la Caba K. Chitosan as a bioactive polymer: Processing, properties and applications. *International Journal of Biological Macromolecules*. déc 2017;105:1358-68.
169. Cheung RCF, Ng TB, Wong JH, Chan WY. Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications. *Mar Drugs*. 14 août 2015;13(8):5156-86.
170. Levengood SL, Zhang M. Chitosan-based scaffolds for bone tissue engineering. *J Mater Chem B Mater Biol Med*. 7 juin 2014;2(21):3161-84.
171. Anitha A, Sowmya S, Kumar PTS, Deepthi S, Chennazhi KP, Ehrlich H, et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. 1 sept 2014;39(9):1644-67.
172. Deepthi S, Venkatesan J, Kim S-K, Bumgardner JD, Jayakumar R. An overview of chitin or chitosan/nano ceramic composite scaffolds for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. déc 2016;93:1338-53.
173. Zhou Y, Gao H-L, Shen L-L, Pan Z, Mao L-B, Wu T, et al. Chitosan microspheres with an extracellular matrix-mimicking nanofibrous structure as cell-carrier building blocks for bottom-up cartilage tissue engineering. *Nanoscale*. 17 déc 2015;8(1):309-17.
174. Kozicki M, Kołodziejczyk M, Szykowska M, Pawlaczyk A, Leśniewska E, Matusiak A, et al. Hydrogels made from chitosan and silver nitrate. *Carbohydrate Polymers*. avr 2016;140:74-87.
175. Aussel A, Thébaud NB, Bérard X, Brizzi V, Delmond S, Bareille R, et al. Chitosan-based hydrogels for developing a small-diameter vascular graft: *in vitro* and *in vivo* evaluation. *Biomedical Materials*. 3 oct 2017;12(6):065003.
176. Ouerghemmi S, Degoutin S, Tabary N, Cazaux F, Maton M, Gaucher V, et al. Triclosan loaded electrospun nanofibers based on a cyclodextrin polymer and chitosan polyelectrolyte complex. *International Journal of Pharmaceutics*. 20 nov 2016;513(1):483-95.
177. Shamekhi MA, Rabiee A, Mirzadeh H, Mahdavi H, Mohebbi-Kalhari D, Baghaban Eslaminejad M. Fabrication and characterization of hydrothermal cross-linked chitosan porous scaffolds for cartilage tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*. nov 2017;80:532-42.
178. Ikeda T, Ikeda K, Yamamoto K, Ishizaki H, Yoshizawa Y, Yanagiguchi K, et al. Fabrication and Characteristics of Chitosan Sponge as a Tissue Engineering Scaffold. *BioMed Research International*. 2014;2014:1-8.

179. Dash M, Chiellini F, Ottenbrite RM, Chiellini E. Chitosan—A versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications. *Progress in Polymer Science*. août 2011;36(8):981-1014.
180. Kean T, Thanou M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. *Advanced Drug Delivery Reviews*. janv 2010;62(1):3-11.
181. Porstmann B, Jung K, Schmechta H, Evers U, Pergande M, Porstmann T, et al. Measurement of lysozyme in human body fluids: Comparison of various enzyme immunoassay techniques and their diagnostic application. *Clinical Biochemistry*. oct 1989;22(5):349-55.
182. Dutta PK, Rinki K, Dutta J. Chitosan: A Promising Biomaterial for Tissue Engineering Scaffolds. In: Jayakumar R, Prabakaran M, Muzzarelli RAA, éditeurs. *Chitosan for Biomaterials II* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2011 [cité 5 févr 2019]. p. 45-79. Disponible sur: [http://link.springer.com/10.1007/12\\_2011\\_112](http://link.springer.com/10.1007/12_2011_112)
183. Richter RP, Baranova NS, Day AJ, Kwok JC. Glycosaminoglycans in extracellular matrix organisation: are concepts from soft matter physics key to understanding the formation of perineuronal nets? *Current Opinion in Structural Biology*. 1 juin 2018;50:65-74.
184. Celikkin N, Rinoldi C, Costantini M, Trombetta M, Rainer A, Świążzkowski W. Naturally derived proteins and glycosaminoglycan scaffolds for tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*. 1 sept 2017;78:1277-99.
185. Kozen BG, Kircher SJ, Henao J, Godinez FS, Johnson AS. An Alternative Hemostatic Dressing: Comparison of CELOX, HemCon, and QuikClot. *Academic Emergency Medicine*. 2008;15(1):74-81.
186. Perinelli DR, Fagioli L, Campana R, Lam JKW, Baffone W, Palmieri GF, et al. Chitosan-based nanosystems and their exploited antimicrobial activity. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*. mai 2018;117:8-20.
187. LogithKumar R, KeshavNarayan A, Dhivya S, Chawla A, Saravanan S, Selvamurugan N. A review of chitosan and its derivatives in bone tissue engineering. *Carbohydrate Polymers*. oct 2016;151:172-88.
188. Aranaz I, Mengibar M, Harris R, Panos I, Miralles B, Acosta N, et al. Functional Characterization of Chitin and Chitosan. *Current Chemical Biology*. 1 mai 2009;3(2):203-30.
189. Domard A, Domard M. Chitosan: Structure-Properties Relationship and Biomedical Applications. In: Dumitriu S, éditeur. *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded* [Internet]. CRC Press; 2001 [cité 5 févr 2019]. Disponible sur: <http://www.crcnetbase.com/doi/10.1201/9780203904671.ch9>
190. Chatelet C. Influence of the degree of acetylation on some biological properties of chitosan films. *Biomaterials*. févr 2001;22(3):261-8.
191. Seda Tıǧlı R, Karakeçili A, Gümüşderelioǧlu M. In vitro characterization of chitosan scaffolds: influence of composition and deacetylation degree. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 7 août 2007;18(9):1665-74.
192. Bumgardner JD, Murali VP, Su H, Jenkins OD, Velasquez-Pulgarin D, Jennings JA, et al. Characterization of chitosan matters. In: *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 10 févr 2019]. p. 81-114. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081002308000042>
193. Jennings JA. Controlling chitosan degradation properties in vitro and in vivo. In: *Chitosan Based Biomaterials Volume 1* [Internet]. Elsevier; 2017 [cité 10 févr 2019]. p. 159-82. Disponible sur: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B9780081002308000078>

194. Padmanabhan A, Nair LS. Chitosan Hydrogels for Regenerative Engineering. In: Chitin and Chitosan for Regenerative Medicine [Internet]. Springer, New Delhi; 2016 [cité 18 févr 2018]. p. 3-40. (Springer Series on Polymer and Composite Materials). Disponible sur: [https://link-springer-com.doc-distant.univ-lille2.fr/chapter/10.1007/978-81-322-2511-9\\_1](https://link-springer-com.doc-distant.univ-lille2.fr/chapter/10.1007/978-81-322-2511-9_1)
195. Fong D, Hoemann CD. Chitosan immunomodulatory properties: perspectives on the impact of structural properties and dosage. *Future Sci OA* [Internet]. 14 sept 2017 [cité 15 mars 2019];4(1). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5729595/>
196. Milosavljević NB, Kljajević LM, Popović IG, Filipović JM, Krušić MTK. Chitosan, itaconic acid and poly(vinyl alcohol) hybrid polymer networks of high degree of swelling and good mechanical strength. *Polymer International*. 2010;59(5):686-94.
197. Singh A, Narvi SS, Dutta PK, Pandey ND. External stimuli response on a novel chitosan hydrogel crosslinked with formaldehyde. *Bull Mater Sci*. 1 juin 2006;29(3):233-8.
198. Muzzarelli RAA. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and pharmaceutical aids. *Carbohydrate Polymers*. 22 mai 2009;77(1):1-9.
199. Tamer TM, Hassan MA, Omer AM, Baset WMA, Hassan ME, El-Shafeey MEA, et al. Synthesis, characterization and antimicrobial evaluation of two aromatic chitosan Schiff base derivatives. *Process Biochemistry*. 1 oct 2016;51(10):1721-30.
200. Gao X, Zhou Y, Ma G, Shi S, Yang D, Lu F, et al. A water-soluble photocrosslinkable chitosan derivative prepared by Michael-addition reaction as a precursor for injectable hydrogel. *Carbohydrate Polymers*. 11 févr 2010;79(3):507-12.
201. Sakai S, Khanmohammadi M, Khoshfetrat AB, Taya M. Horseradish peroxidase-catalyzed formation of hydrogels from chitosan and poly(vinyl alcohol) derivatives both possessing phenolic hydroxyl groups. *Carbohydrate Polymers*. 13 oct 2014;111:404-9.
202. Nilsen-Nygaard J, Strand S, Vårum K, Draget K, Nordgård C. Chitosan: Gels and Interfacial Properties. *Polymers*. 13 mars 2015;7(12):552-79.
203. Pellá MCG, Lima-Tenório MK, Tenório-Neto ET, Guilherme MR, Muniz EC, Rubira AF. Chitosan-based hydrogels: From preparation to biomedical applications. *Carbohydrate Polymers*. 15 sept 2018;196:233-45.
204. Montembault A, Viton C, Domard A. Rheometric study of the gelation of chitosan in a hydroalcoholic medium. *Biomaterials*. 1 mai 2005;26(14):1633-43.
205. Aussel A, Montembault A, Malaise S, Foulc MP, Faure W, Cornet S, et al. In Vitro Mechanical Property Evaluation of Chitosan-Based Hydrogels Intended for Vascular Graft Development. *Journal of Cardiovascular Translational Research*. déc 2017;10(5-6):480-8.
206. Montembault A, Viton C, Domard A. Rheometric Study of the Gelation of Chitosan in Aqueous Solution without Cross-Linking Agent. *Biomacromolecules*. mars 2005;6(2):653-62.
207. Ladet S, David L, Domard A. Multi-membrane hydrogels. *Nature*. mars 2008;452(7183):76-9.
208. Auzély-Velty R, Rinaudo M. New Supramolecular Assemblies of a Cyclodextrin-Grafted Chitosan through Specific Complexation. *Macromolecules*. 1 oct 2002;35(21):7955-62.
209. Yamaguchi I, Iizuka S, Osaka A, Monma H, Tanaka J. The effect of citric acid addition on chitosan/hydroxyapatite composites. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 12 mars 2003;214(1):111-8.

210. Liu Y, Shen X, Zhou H, Wang Y, Deng L. Chemical modification of chitosan film via surface grafting of citric acid molecular to promote the biomineralization. *Applied Surface Science*. 1 mai 2016;370:270-8.
211. Sacco P, Paoletti S, Cok M, Asaro F, Abrami M, Grassi M, et al. Insight into the ionotropic gelation of chitosan using tripolyphosphate and pyrophosphate as cross-linkers. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 nov 2016;92:476-83.
212. Meka VS, Sing MKG, Pichika MR, Nali SR, Kolapalli VRM, Kesharwani P. A comprehensive review on polyelectrolyte complexes. *Drug Discovery Today*. 1 nov 2017;22(11):1697-706.
213. Luo Y, Wang Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 mars 2014;64:353-67.
214. Hamedi H, Moradi S, Hudson SM, Tonelli AE. Chitosan based hydrogels and their applications for drug delivery in wound dressings: A review. *Carbohydrate Polymers*. 1 nov 2018;199:445-60.
215. Buriuli M, Verma D. Polyelectrolyte Complexes (PECs) for Biomedical Applications. In: *Advances in Biomaterials for Biomedical Applications* [Internet]. Springer, Singapore; 2017 [cité 29 juill 2018]. p. 45-93. (Advanced Structured Materials). Disponible sur: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-3328-5\\_2](https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-10-3328-5_2)
216. Voron'ko NG, Derkach SR, Kuchina YA, Sokolan NI. The chitosan–gelatin (bio)polyelectrolyte complexes formation in an acidic medium. *Carbohydrate Polymers*. 15 mars 2016;138:265-72.
217. Ji D-Y, Kuo T-F, Wu H-D, Yang J-C, Lee S-Y. A novel injectable chitosan/polyglutamate polyelectrolyte complex hydrogel with hydroxyapatite for soft-tissue augmentation. *Carbohydrate Polymers*. août 2012;89(4):1123-30.
218. Wu H-D, Yang J-C, Tsai T, Ji D-Y, Chang W-J, Chen C-C, et al. Development of a chitosan–polyglutamate based injectable polyelectrolyte complex scaffold. *Carbohydrate Polymers*. mai 2011;85(2):318-24.
219. Sæther HV, Holme HK, Maurstad G, Smidsrød O, Stokke BT. Polyelectrolyte complex formation using alginate and chitosan. *Carbohydrate Polymers*. 21 nov 2008;74(4):813-21.
220. Rasso G, Salis A, Porcu EP, Giunchedi P, Roldo M, Gavini E. Composite chitosan/alginate hydrogel for controlled release of deferoxamine: A system to potentially treat iron dysregulation diseases. *Carbohydrate Polymers*. 20 janv 2016;136:1338-47.
221. Li X, Xie H, Lin J, Xie W, Ma X. Characterization and biodegradation of chitosan–alginate polyelectrolyte complexes. *Polymer Degradation and Stability*. 1 janv 2009;94(1):1-6.
222. Kaderli S, Boulocher C, Pillet E, Watrelot-Virieux D, Rougemont AL, Roger T, et al. A novel biocompatible hyaluronic acid–chitosan hybrid hydrogel for osteoarthritis therapy. *International Journal of Pharmaceutics*. 10 avr 2015;483(1):158-68.
223. Kim SJ, Lee KJ, Kim SI. Swelling behavior of polyelectrolyte complex hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid. *Journal of Applied Polymer Science*. 2004;93(3):1097-101.
224. Huangqin Chen, Mingwen Fan. Novel Thermally Sensitive pH-dependent Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Hydrogels. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*. janv 2008;23(1):38-48.
225. Neufeld L, Bianco-Peled H. Pectin–chitosan physical hydrogels as potential drug delivery vehicles. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 août 2017;101:852-61.

226. Bernabé P, Peniche C, Argüelles-Monal W. Swelling behavior of chitosan/pectin polyelectrolyte complex membranes. Effect of thermal cross-linking. *Polymer Bulletin*. nov 2005;55(5):367-75.
227. de Oliveira AC, Vilsinski BH, Bonafé EG, Monteiro JP, Kipper MJ, Martins AF. Chitosan content modulates durability and structural homogeneity of chitosan-gellan gum assemblies. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 mai 2019;128:114-23.
228. Volod'ko AV, Davydova VN, Glazunov VP, Likhatskaya GN, Yermak IM. Influence of structural features of carrageenan on the formation of polyelectrolyte complexes with chitosan. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 mars 2016;84:434-41.
229. Maciel DJ, Ferreira IL de M. Properties evaluation of polyelectrolyte complex based on iota carrageenan and chitosan in acidic and basic media. *Materials Letters*. 15 oct 2018;229:142-7.
230. Martínez-Ruvalcaba A, Chornet E, Rodrigue D. Viscoelastic properties of dispersed chitosan/xanthan hydrogels. *Carbohydrate Polymers*. 19 févr 2007;67(4):586-95.
231. Argin-Soysal S, Kofinas P, Lo YM. Effect of complexation conditions on xanthan–chitosan polyelectrolyte complex gels. *Food Hydrocolloids*. 1 janv 2009;23(1):202-9.
232. Zhang J, Ma PX. Cyclodextrin-based supramolecular systems for drug delivery: Recent progress and future perspective. *Adv Drug Deliv Rev* [Internet]. août 2013 [cité 21 févr 2018];65(9). Disponible sur: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3885994/>
233. Jansook P, Ogawa N, Loftsson T. Cyclodextrins: structure, physicochemical properties and pharmaceutical applications. *International Journal of Pharmaceutics*. janv 2018;535(1-2):272-84.
234. Kono H, Teshirogi T. Cyclodextrin-grafted chitosan hydrogels for controlled drug delivery. *International Journal of Biological Macromolecules*. janv 2015;72:299-308.
235. Crini G. Review: A History of Cyclodextrins. *Chemical Reviews*. 12 nov 2014;114(21):10940-75.
236. Davis ME, Brewster ME. Cyclodextrin-based pharmaceuticals: past, present and future. *Nature Reviews Drug Discovery*. déc 2004;3(12):1023-35.
237. Folch-Cano C, Yazdani-Pedram M, Olea-Azar C. Inclusion and Functionalization of Polymers with Cyclodextrins: Current Applications and Future Prospects. *Molecules*. 9 sept 2014;19(9):14066-79.
238. Yang SY, Hoonor R, Jin H-S, Kim J. Synthesis and Characterization of Cationic and Anionic Cyclodextrin Oligomers and Their Use in Layer-by-Layer Film Formation. *Bulletin of the Korean Chemical Society*. 20 juill 2013;34(7):2016-22.
239. Junthip J, Tabary N, Leclercq L, Martel B. Cationic  $\beta$ -cyclodextrin polymer applied to a dual cyclodextrin polyelectrolyte multilayer system. *Carbohydrate Polymers*. 1 août 2015;126:156-67.
240. Simoes SMN, Veiga F, Torres-Labandeira JJ, Ribeiro ACF, Alvarez-Lorenzo AC and C. Syringeable Self-Assembled Cyclodextrin Gels for Drug Delivery [Internet]. *Current Topics in Medicinal Chemistry*. 2014 [cité 22 mars 2019]. Disponible sur: <http://www.eurekaselect.com/119066/article>
241. Martel B, Ruffin D, Weltrowski M, Lekchiri Y, Morcellet M. Water-soluble polymers and gels from the polycondensation between cyclodextrins and poly(carboxylic acid)s: A study of the preparation parameters. *Journal of Applied Polymer Science*. 15 juill 2005;97(2):433-42.
242. Garcia-Fernandez MJ, Tabary N, Chai F, Cazaux F, Blanchemain N, Flament M-P, et al. New multifunctional pharmaceutical excipient in tablet formulation based on citric acid-cyclodextrin polymer. *International Journal of Pharmaceutics*. sept 2016;511(2):913-20.



243. Martin A, Tabary N, Leclercq L, Junthip J, Degoutin S, Aubert-Viard F, et al. Multilayered textile coating based on a  $\beta$ -cyclodextrin polyelectrolyte for the controlled release of drugs. *Carbohydrate Polymers*. 2 avr 2013;93(2):718-30.
244. Martin A, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Junthip J, Aubert-Viard F, et al. Build-up of an antimicrobial multilayer coating on a textile support based on a methylene blue-poly(cyclodextrin) complex. *Biomed Mater*. déc 2013;8(6):065006.
245. Mogrovejo-Valdivia A, Rahmouni O, Tabary N, Maton M, Neut C, Martel B, et al. In vitro evaluation of drug release and antibacterial activity of a silver-loaded wound dressing coated with a multilayer system. *International Journal of Pharmaceutics* [Internet]. 13 déc 2018 [cité 17 déc 2018]; Disponible sur: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517318309244>
246. Junthip J, Tabary N, Chai F, Leclercq L, Maton M, Cazaux F, et al. Layer-by-layer coating of textile with two oppositely charged cyclodextrin polyelectrolytes for extended drug delivery. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. 104(6):1408-24.
247. Pérez-Anes A, Gargouri M, Laure W, Van Den Berghe H, Courcot E, Sobocinski J, et al. Bioinspired Titanium Drug Eluting Platforms Based on a Poly- $\beta$ -cyclodextrin–Chitosan Layer-by-Layer Self-Assembly Targeting Infections. *ACS Appl Mater Interfaces*. 17 juin 2015;7(23):12882-93.
248. Flores C, Lopez M, Tabary N, Neut C, Chai F, Betbeder D, et al. Preparation and characterization of novel chitosan and  $\beta$ -cyclodextrin polymer sponges for wound dressing applications. *Carbohydrate Polymers*. 1 oct 2017;173:535-46.
249. Ladet SG, Tahiri K, Montebault AS, Domard AJ, Corvol M-TM. Multi-membrane chitosan hydrogels as chondrocytic cell bioreactors. *Biomaterials*. 1 août 2011;32(23):5354-64.
250. Nie J, Lu W, Ma J, Yang L, Wang Z, Qin A, et al. Orientation in multi-layer chitosan hydrogel: morphology, mechanism, and design principle. *Scientific Reports*. 6 janv 2015;5:7635.
251. Chenite A, Chaput C, Wang D, Combes C, Buschmann MD, Hoemann CD, et al. Novel injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*. 1 nov 2000;21(21):2155-61.
252. Naderi-Meshkin H, Andreas K, Matin MM, Sittinger M, Bidkhorri HR, Ahmadiankia N, et al. Chitosan-based injectable hydrogel as a promising in situ forming scaffold for cartilage tissue engineering. *Cell Biol Int*. 1 janv 2014;38(1):72-84.
253. Moura MJ, Faneca H, Lima MP, Gil MH, Figueiredo MM. In Situ Forming Chitosan Hydrogels Prepared via Ionic/Covalent Co-Cross-Linking. *Biomacromolecules*. 12 sept 2011;12(9):3275-84.
254. Liu Z, Yao P. Versatile injectable supramolecular hydrogels containing drug loaded micelles for delivery of various drugs. *Polym Chem*. 24 déc 2013;5(3):1072-81.
255. Liu WC, Chen S, Zheng L, Qin L. Angiogenesis Assays for the Evaluation of Angiogenic Properties of Orthopaedic Biomaterials - A General Review. *Advanced Healthcare Materials*. mars 2017;6(5):1600434.
256. Morais DS, Rodrigues MA, Silva TI, Lopes MA, Santos M, Santos JD, et al. Development and characterization of novel alginate-based hydrogels as vehicles for bone substitutes. *Carbohydrate Polymers*. 5 juin 2013;95(1):134-42.
257. Ressler A, Ródenas-Rochina J, Ivanković M, Ivanković H, Rogina A, Gallego Ferrer G. Injectable chitosan-hydroxyapatite hydrogels promote the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells. *Carbohydrate Polymers*. oct 2018;197:469-77.

258. Seol Y-J, Lee J-Y, Park Y-J, Lee Y-M, -Ku Y, Rhyu I-C, et al. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation. *Biotechnology Letters*. 1 juill 2004;26(13):1037-41.
259. Ahsan SM, Thomas M, Reddy KK, Sooraparaju SG, Asthana A, Bhatnagar I. Chitosan as biomaterial in drug delivery and tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 15 avr 2018;110:97-109.
260. Beşkardeş IG, Demirtaş TT, Durukan MD, Gümüşderelioğlu M. Microwave-assisted fabrication of chitosan–hydroxyapatite superporous hydrogel composites as bone scaffolds. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 9(11):1233-46.
261. Shavandi A, Bekhit AE-DA, Sun Z, Ali A, Gould M. A novel squid pen chitosan/hydroxyapatite/ $\beta$ -tricalcium phosphate composite for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. 1 oct 2015;55:373-83.
262. Lee JS, Baek SD, Venkatesan J, Bhatnagar I, Chang HK, Kim HT, et al. In vivo study of chitosan-natural nano hydroxyapatite scaffolds for bone tissue regeneration. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 juin 2014;67:360-6.
263. Haider A, Haider S, Han SS, Kang I-K. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review. *RSC Adv*. 20 janv 2017;7(13):7442-58.
264. VEGF-165, human, recombinant (E. coli) [Internet]. PromoCell. [cité 14 déc 2018]. Disponible sur: <https://www.promocell.com/product/vegf-165-human-recombinant-e-coli/>
265. Gnani S, Blasio L di, Tonda-Turo C, Mancardi A, Primo L, Ciardelli G, et al. Gelatin-based hydrogel for vascular endothelial growth factor release in peripheral nerve tissue engineering. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. 11(2):459-70.
266. Yan X-Z, Yang W, Yang F, Kersten-Niessen M, Jansen JA, Both SK. Effects of Continuous Passaging on Mineralization of MC3T3-E1 Cells with Improved Osteogenic Culture Protocol. *Tissue Engineering Part C: Methods*. mars 2014;20(3):198-204.
267. HUVEC: Human Umbilical Vein Endothelial Cells [Internet]. PromoCell. [cité 15 déc 2018]. Disponible sur: <https://www.promocell.com/product/human-umbilical-vein-endothelial-cells-huvec/>
268. Lopez-Heredia MA, Sariibrahimoglu K, Yang W, Bohner M, Yamashita D, Kunstar A, et al. Influence of the pore generator on the evolution of the mechanical properties and the porosity and interconnectivity of a calcium phosphate cement. *Acta Biomaterialia*. 1 janv 2012;8(1):404-14.
269. alamarBlue Cell Viability Reagent - Thermo Fisher Scientific [Internet]. [cité 9 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/DAL1025>
270. Amirian J, Linh NTB, Min YK, Lee B-T. The effect of BMP-2 and VEGF loading of gelatin-pectin-BCP scaffolds to enhance osteoblast proliferation. *Journal of Applied Polymer Science* [Internet]. [cité 5 juill 2018];132(2). Disponible sur: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/app.41241>
271. Protocols - ELISA: Sandwich ABTS [Internet]. [cité 9 févr 2019]. Disponible sur: <https://www.peprotech.com/en/support-protocols-elisa-sandwich-abts>
272. Goodwin AM. In vitro assays of angiogenesis for assessment of angiogenic and anti-angiogenic agents. *Microvascular Research*. sept 2007;74(2-3):172-83.
273. Irvin MW, Zijlstra A, Wikswa JP, Pozzi A. Techniques and assays for the study of angiogenesis. *Experimental Biology and Medicine*. nov 2014;239(11):1476-88.

274. ImageJ [Internet]. [cité 9 févr 2019]. Disponible sur: <https://imagej.nih.gov/ij/>
275. Raghavan SR, Cipriano BH. Gel Formation: Phase Diagrams Using Tabletop Rheology and Calorimetry. In: *Molecular Gels* [Internet]. Springer, Dordrecht; 2006 [cité 31 janv 2018]. p. 241-52. Disponible sur: [https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3689-2\\_9](https://link.springer.com/chapter/10.1007/1-4020-3689-2_9)
276. Wahid F, Zhou Y-N, Wang H-S, Wan T, Zhong C, Chu L-Q. Injectable self-healing carboxymethyl chitosan-zinc supramolecular hydrogels and their antibacterial activity. *International Journal of Biological Macromolecules*. juill 2018;114:1233-9.
277. Anraku M, Iohara D, Hiraga A, Uekama K, Ifuku S, Pipkin JD, et al. Formation of Elastic Gels from Deacetylated Chitin Nanofibers Reinforced with Sulfobutyl Ether  $\beta$ -Cyclodextrin. *Chemistry Letters*. 5 mars 2015;44(3):285-7.
278. Lim LY, Khor E, Ling CE. Effects of dry heat and saturated steam on the physical properties of chitosan. *J Biomed Mater Res*. 1999;48(2):111-6.
279. Ji C, Shi J. Thermal-crosslinked porous chitosan scaffolds for soft tissue engineering applications. *Materials Science and Engineering: C*. 1 oct 2013;33(7):3780-5.
280. Lejardi A, Hernández R, Criado M, Santos JI, Etxeberria A, Sarasua JR, et al. Novel hydrogels of chitosan and poly(vinyl alcohol)-g-glycolic acid copolymer with enhanced rheological properties. *Carbohydrate Polymers*. 15 mars 2014;103:267-73.
281. Dimzon IKD, Knepper TP. Degree of deacetylation of chitosan by infrared spectroscopy and partial least squares. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 janv 2015;72:939-45.
282. Hernandez-Montelongo J, Naveas N, Degoutin S, Tabary N, Chai F, Spampinato V, et al. Porous silicon-cyclodextrin based polymer composites for drug delivery applications. *Carbohydrate Polymers*. 22 sept 2014;110:238-52.
283. Wang Q, Chen D. Synthesis and characterization of a chitosan based nanocomposite injectable hydrogel. *Carbohydrate Polymers*. 20 janv 2016;136:1228-37.
284. Niranjana R, Koushik C, Saravanan S, Moorthi A, Vairamani M, Selvamurugan N. A novel injectable temperature-sensitive zinc doped chitosan/ $\beta$ -glycerophosphate hydrogel for bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. 1 mars 2013;54:24-9.
285. Wegst UGK, Schechter M, Donius AE, Hunger PM. Biomaterials by freeze casting. *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences*. 28 avr 2010;368(1917):2099-121.
286. Nematollahi Z, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran, Tafazzoli-Shadpour Mohammad, Faculty of Biomedical Engineering, Amirkabir University of Technology, Tehran, Iran, Zamanian A, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran, et al. Fabrication of Chitosan Silk-based Tracheal Scaffold Using Freeze-Casting Method. *Iranian Biomedical Journal*. 1 juill 2017;21(4):228-39.
287. Laasri S, Taha M, Hajjaji A, Laghzizil A, Hlil EK. Mechanical properties of calcium phosphate biomaterials. *Molecular Crystals and Liquid Crystals*. 23 mars 2016;628(1):198-203.
288. Kuo Z-K, Lai P-L, Toh EK-W, Weng C-H, Tseng H-W, Chang P-Z, et al. Osteogenic differentiation of preosteoblasts on a hemostatic gelatin sponge. *Scientific Reports* [Internet]. déc 2016 [cité 7 mars 2019];6(1). Disponible sur: <http://www.nature.com/articles/srep32884>
289. Zhang T, Lin S, Shao X, Zhang Q, Xue C, Zhang S, et al. Effect of matrix stiffness on osteoblast functionalization. *Cell Proliferation*. 2017;50(3):e12338.

290. Szymańska E, Winnicka K. Stability of Chitosan—A Challenge for Pharmaceutical and Biomedical Applications. *Marine Drugs*. 1 avr 2015;13(4):1819-46.
291. Amaral IF, Sampaio P, Barbosa MA. Three-dimensional culture of human osteoblastic cells in chitosan sponges: The effect of the degree of acetylation. *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. févr 2006;76A(2):335-46.
292. Ran J, Xie L, Sun G, Hu J, Chen S, Jiang P, et al. A facile method for the preparation of chitosan-based scaffolds with anisotropic pores for tissue engineering applications. *Carbohydrate Polymers*. nov 2016;152:615-23.
293. Mohandas A, Anisha BS, Chennazhi KP, Jayakumar R. Chitosan–hyaluronic acid/VEGF loaded fibrin nanoparticles composite sponges for enhancing angiogenesis in wounds. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 1 mars 2015;127:105-13.
294. Finn TE, Nunez AC, Sunde M, Easterbrook-Smith SB. Serum Albumin Prevents Protein Aggregation and Amyloid Formation and Retains Chaperone-like Activity in the Presence of Physiological Ligands. *J Biol Chem*. 15 juin 2012;287(25):21530-40.
295. Rogina A, Ressler A, Matić I, Gallego Ferrer G, Marijanović I, Ivanković M, et al. Cellular hydrogels based on pH-responsive chitosan-hydroxyapatite system. *Carbohydrate Polymers*. juin 2017;166:173-82.
296. Vishnu Priya M, Sivshanmugam A, Boccaccini AR, Goudouri OM, Sun W, Hwang N, et al. Injectable osteogenic and angiogenic nanocomposite hydrogels for irregular bone defects. *Biomedical Materials*. 15 juin 2016;11(3):035017.
297. Dyondi, Webster, Banerjee R. A nanoparticulate injectable hydrogel as a tissue engineering scaffold for multiple growth factor delivery for bone regeneration. *International Journal of Nanomedicine*. déc 2012;47.
298. Herbois R, Noël S, Léger B, Tilloy S, Manuel S, Addad A, et al. Ruthenium-containing  $\beta$ -cyclodextrin polymer globules for the catalytic hydrogenation of biomass-derived furanic compounds. *Green Chem*. 7 avr 2015;17(4):2444-54.
299. Alarçin E, Lee TY, Karuthedom S, Mohammadi M, Brennan MA, Lee DH, et al. Injectable shear-thinning hydrogels for delivering osteogenic and angiogenic cells and growth factors. *Biomater Sci*. 29 mai 2018;6(6):1604-15.
300. Sivashanmugam A, Charoenlarp P, Deepthi S, Rajendran A, Nair SV, Iseki S, et al. Injectable Shear-Thinning CaSO<sub>4</sub>/FGF-18-Incorporated Chitin–PLGA Hydrogel Enhances Bone Regeneration in Mice Cranial Bone Defect Model. *ACS Appl Mater Interfaces*. 13 déc 2017;9(49):42639-52.
301. Ren B, Chen X, Du S, Ma Y, Chen H, Yuan G, et al. Injectable polysaccharide hydrogel embedded with hydroxyapatite and calcium carbonate for drug delivery and bone tissue engineering. *International Journal of Biological Macromolecules*. oct 2018;118:1257-66.
302. Serra IR, Fradique R, Vallejo MCS, Correia TR, Miguel SP, Correia IJ. Production and characterization of chitosan/gelatin/ $\beta$ -TCP scaffolds for improved bone tissue regeneration. *Materials Science and Engineering: C*. oct 2015;55:592-604.
303. Bose S, Tarafder S. Calcium phosphate ceramic systems in growth factor and drug delivery for bone tissue engineering: A review. *Acta Biomater*. avr 2012;8(4):1401-21.
304. Sionkowska A, Kozłowska J. Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as a potential bone substitute. *International Journal of Biological Macromolecules*. nov 2010;47(4):483-7.

305. Türk S, Altınsoy I, Çelebi Efe G, Ipek M, Özacar M, Bindal C. 3D porous collagen/functionalized multiwalled carbon nanotube/chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering. *Materials Science and Engineering: C*. nov 2018;92:757-68.
306. Cai X, Chen L, Jiang T, Shen X, Hu J, Tong H. Facile synthesis of anisotropic porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds for bone tissue engineering. *Journal of Materials Chemistry*. 2011;21(32):12015.

## **ANNEXES**

---



## Annexe 1

### Détermination du degré de desacétylation (DD) du chitosane

#### 1. Par spectroscopie Infrarouge à transformée de Fourier (IRTF)

Afin de trouver le DD du CHT, l'équation proposé par Czechowska-Biskup *et al.* qui correspond aux bandes d'absorbance à 1650 cm<sup>-1</sup> et 2870 cm<sup>-1</sup> a été utilisée :

$$\% DA = \frac{A_{1665}}{A_{2870}} \times \frac{100}{1,33} \quad (7)$$

$$\% DD = 100 - \% DA \quad (8)$$

Soit DA degré d'acétylation et DD degré de desacétylation.

#### 2. Par résonance magnétique nucléaire (RMN-H<sup>1</sup>)

$$\% DD = \frac{1 - (\frac{1}{3} \times Aire(CH_3))}{(\frac{1}{6} \times Aire(H_2)) - Aire(H_6)} \quad (9)$$

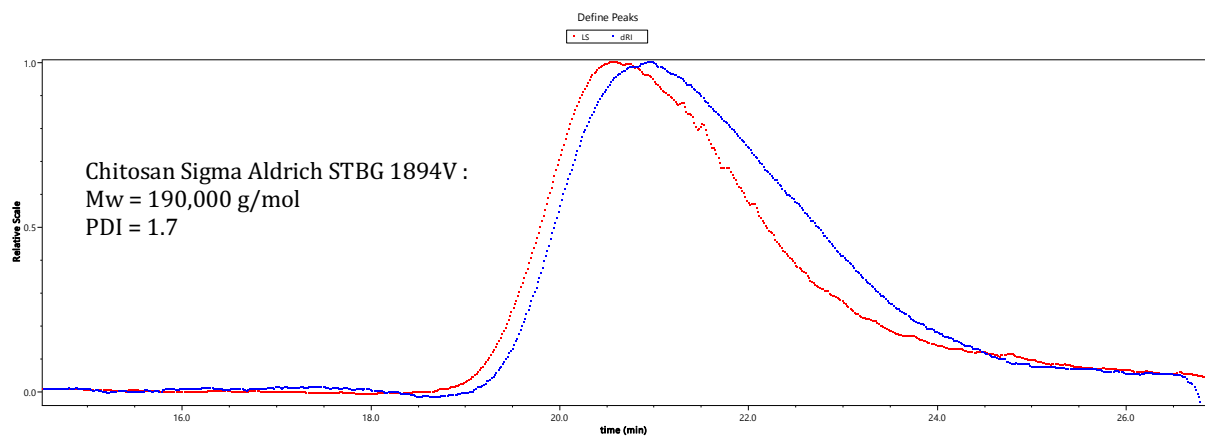


## Annexe 2

### Chromatogramme obtenu par Chromatographie par perméation de gel (GPC) du chitosane

Conditions expérimentales :

- 2 colonnes SHODEX 806-M
- Acide acétique 50 mM + nitrate sodium 0.3 M ; pH 3
- Échantillons dissous à 1% (w/v) ;  $dn/dc = 0.15$ .



### Annexe 3

#### Préparation des solutions pour la fixation des cellules dans un support

##### Tampon Millonig

Solution A : 31,2 g de phosphate monosodique ( $\text{NaH}_2\text{PO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ ) dans 1 L d'eau distillée

Solution B : 35,6 g de phosphate disodique ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4 - 2\text{H}_2\text{O}$ ) dans 1 L d'eau distillée

- Prendre 500 mL de solution B dans un bécher de 1 L et ajouter la solution jusqu'à l'obtention d'une solution à pH 7
- Conserver la solution au réfrigérateur. Stable pendant plusieurs semaines à 4°C

##### Solution de fixation de cellules

Mélanger aux rapports suivants :

- 5 vol. de tampon Millonig à 0,13 M
- 1 vol. de glutaraldehyde 25%
- 4 vol. d'eau ultrapure



## **Liste de publications et de communications**

---



## Publications

- Palomino-Durand, C.; Lopez, M.; Cazaux, F.; Martel, B.; Blanchemain, N.; Chai, F. Influence of the Soluble–Insoluble Ratios of Cyclodextrins Polymers on the Viscoelastic Properties of Injectable Chitosan–Based Hydrogels for Biomedical Application. *Polymers* **2019**, *11*, 214. Doi : [10.3390/polym11020214](https://doi.org/10.3390/polym11020214)

## Communications Orales

### Colloques/Congres nationaux

- C. Palomino-Durand, C. Flores, F. Chai, J.C. Hornez, F. Cazaux, N. Blanchemain, B. Martel. Étude sur un hydrogel de chitosane incorpore dans une pièce 3D d'hydroxyapatite macroporeuse pour une libération prolongée de la ciprofloxacine. *Secondes Journées Annuelles de la commission mixte Matériaux pour la Santé*. Limoges, France. **2016**.
- C. Palomino-Durand, C. Flores, F. Chai, J.C. Hornez, F. Cazaux, N. Blanchemain, B. Martel. Study on the chitosan hydrogel incorporated in 3D macroporous hydroxyapatite for sustained release of ciprofloxacin. SINAPSIS 2016. *I Encuentro de científicos peruanos en Europa*. Paris, France. **2016**.
- M. Lopez, C. Palomino-Durand, J-C. Hornez, F. Chai, G. Raoul, N. Tabary, F. Cazaux, J. Ferri, B. Martel et N. Blanchemain. Développement d'hydrogels à base de chitosan/ $\beta$ -cyclodextrine et d'hydroxyapatite pour la chirurgie mini invasive. *17èmes Journées Cyclodextrines*. Nancy, France. **2016**.
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Effect of the molecular weight of chitosan on the properties of the chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering. *2nd BIOMAT Congress*. Ambleteuse, France. **2017**.
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering application. *17e Journee Andre VERBERT - Colloque Annuel des Doctorants*. Lille, France. **2017**.
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Formation d'hydrogels et d'éponges à base de chitosane et poly- $\beta$ -cyclodextrine pour l'application dans l'ingénierie tissulaire osseuse. *18èmes journées CYCLODEXTRINES*. Lens, France. **2017**.

### **Congres Internationaux**

- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering application. SINAPSIS 2017. *II Encuentro de científicos peruanos en Europa*. Berlin, Germany. **2017**.
- A. Gauzit Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, C. Neut, B. Foligne, B. Martel, N. Blanchemain. Ciprofloxacin loaded sponges (Chitosan/Cyclodextrin polymer) for bone infection treatment. *ICS 2018 - 19<sup>th</sup> International Cyclodextrin Symposium*. Tokio, Japon. **2018**.

### **Communications par affiche**

#### **Colloques/Congrès Nationaux**

- A. Gauzit-Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, C. Neut, B. Martel, N. Blanchemain. Ciprofloxacin loaded sponges (Chitosan/Cyclodextrin polymer) for bone infection. *2nd BIOMAT Congress*. Ambleteuse, France. **2017**.
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. López, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Development of chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering application. *2<sup>ème</sup> journée Recherche de la faculté de Pharmacie*. Lille, France. **2018**. (Prix de la meilleure présentation flash-poster)
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. López, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Development of chitosan/poly-cyclodextrin hydrogels and sponges for bone tissue engineering application. THERMEC 2018. International Conference on Processing & Manufacturing of Advanced Materials. Paris, France. **2018**

### **Congres Internationaux**

- A. Gauzit-Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, C. Neut, B. Martel, N. Blanchemain. Ciprofloxacin loaded sponge (Chitosan/Cyclodextrin polymer) for bone infection treatment. *ESB 2017 - 28th European Conference on Biomaterials*. Athens, Greece. **2017**
- A. Gauzit-Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, C. Neut, B. Martel, N. Blanchemain. Physical hydrogel of chitosan and cyclodextrin polymer for the formation of a drug release device for bone infections treatment. *5th European Conference on Cyclodextrins*. Lisbon, Portugal. **2017**.

- C. Palomino-Durand, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. VEGF delivery by chitosan/poly-cyclodextrin composite sponges for bone tissue engineering. *TERMIS World Congress 2018*. Kyoto, Japon. **2018**
- C. Palomino-Durand, A. Gauzit-Amiel, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Development of chitosan/poly- $\beta$ -cyclodextrin sponges for bone tissue engineering application. *ESB 2018 - 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials*. Maastricht, Pays bas. **2018**.
- C. Palomino-Durand, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. Influence of different cyclodextrin polymers on the properties of chitosan-hydrogels for tissue engineering application. *ESB 2018 - 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials*. Maastricht, Pays bas. **2018**.
- A. Gauzit Amiel, C. Palomino-Durand, M. Lopez, M. Maton, F. Cazaux, F. Chai, C. Neut, B. Martel, B. Foligne, N. Blanchemain. Chitosan-polycyclodextrin physical sponge for anti infectious drug release device. *ESB 2018 - 29th Annual Meeting of the European Society for Biomaterials*. Maastricht, Pays bas. **2018**.
- C. Palomino Durand, M. Lopez, F. Cazaux, B. Martel, N. Blanchemain, F. Chai. VEGF delivery by chitosan/poly-cyclodextrin sponges for bone tissue engineering. *Sinapsis 2018. III Encuentro de Científicos Peruanos en Europa*. Barcelone, Espagne. **2018**. (Troisième prix du meilleur poster)

## Prix

- Prix de la meilleure présentation flash-poster. *2ème journée Recherche de la faculté de Pharmacie*. Lille, France. 2018
- Troisième prix du meilleur poster. *Sinapsis 2018. III Encuentro de Científicos Peruanos en Europa*. Barcelone, Espagne. 2018.

## Formations

- **D.U. Dispositifs Médicaux Implantables**, Université de Lille, France. 2018





# RESUME

---

La réparation de défauts osseux par les techniques de l'ingénierie tissulaire osseuse (ITO) est considérée comme une alternative aux greffes conventionnelles. L'objectif de ce projet de thèse fut de développer des matériaux destinés à servir de *scaffolds* pour le comblement et la régénération osseuse, ces derniers étant sous la forme d'hydrogels injectables d'une part, et d'éponges, d'autre part. Ces deux types de matériaux ont été obtenus par mélange de chitosane (CHT, cationique), et de polymère de cyclodextrine réticulé par l'acide citrique (PCD, anionique), interagissant via des liaisons ioniques et formant des *complexes polyélectrolytes*. La première partie de la thèse a été consacrée au développement et caractérisation d'une éponge CHT/PCDs qui a été chargée avec le facteur de croissance de l'endothélium vasculaire (VEFG) dans le but de favoriser sa vascularisation. Le second volet de la thèse a eu pour objectif d'optimiser la formulation d'un hydrogel injectable destiné à la chirurgie mini-invasive, composé de CHT et de PCD sous sa forme soluble (PCDs) et insoluble (PCDi) [CHT/PCDi/PCDs]. L'étude a été concentrée sur l'optimisation et la caractérisation des propriétés rhéologiques de l'hydrogel. Enfin, une étude prospective sur le développement de l'hydrogel/éponge composite en ajoutant une phase minérale - l'hydroxyapatite (HAp) dans la formulation a été réalisée afin d'améliorer les propriétés mécaniques et ostéoconductrices.

L'éponge CHT/PCDs à ratio 3 :3 a été obtenue par lyophilisation des hydrogels et a subi un traitement thermique (TT) afin d'améliorer leur stabilité par la formation des liaisons covalentes. L'éponge CHT/PCDs avec un TT à 160°C a montré des propriétés de gonflement élevé (~600%) et une biodégradation ralenti induite par le lysozyme (~12% perte masse dans un mois). Sa microstructure, ses propriétés mécaniques de compression et sa cytocompatibilité avec deux types de cellules (pré-ostéoblastes (MC3T3-E1) et endothéliales primaires (HUVECs) ont été étudiées. Une porosité élevée (~87%) avec des pores interconnectés a été observée par microtomographie de rayons X, ainsi qu'une bonne adhésion et colonisation cellulaire au sein de l'éponge par microscopie électronique à balayage (MEB). Le VEGF a été incorporé dans l'éponge, et son profil de libération a été suivi, ainsi que la bio-activité du VEGF libéré. La libération du VEGF a été rapide pendant les trois premiers jours, puis ralenti jusqu'à devenir non-déTECTABLE par la méthode ELISA jusqu'à 7 jours. Le VEGF libéré pendant les deux premiers jours a montré un effet pro-prolifération et pro-migration significatif sur les HUVECs.

Les hydrogels injectables de CHT/PCDi/PCDs à différents ratios ont été optimisés et caractérisés en fonction de leurs propriétés rhéologiques, leur injectabilité, et leur cytotoxicité. L'impact de l'ajoute du PCDi dans l'hydrogel a été clairement observé par analyses rhéologiques. Ainsi, l'hydrogel CHT/PCD, composé à parts égales de PCDi et de PCDs, a démontré le meilleur compromis entre stabilité structurelle, propriétés rhéofluidifiantes et auto-réparantes, et injectabilité. En plus, l'hydrogel a montré une excellente cytocompatibilité vis-à-vis les cellules pré-ostéoblastes MC3T3-E1.

Basés sur la formulation optimisée, l'HAp a été incorporée à différentes concentrations dans l'hydrogel. L'ajout de la phase minérale n'a pas perturbé la formation ni la stabilité structurelle des hydrogels, mais a amélioré les propriétés viscoélastiques. Les éponges composites, élaborées par lyophilisation de ces hydrogels, ont montré que les particules de HAp étaient dispersées de manière homogène dans la structure macroporeuse de l'éponge. Ces résultats encourageants ont montré qu'il était possible de fournir un hydrogel injectable ou une éponge composite comme scaffold pour l'ITO.

En conclusion, nous avons développé deux biomatériaux basés sur la formation d'un complexe polyélectrolyte entre le CHT et le PCD : une éponge (dit hydrogel macroporeux) pour combler les défauts osseux relativement larges, et un hydrogel injectable pour la chirurgie mini-invasive. De plus, la faisabilité d'obtenir des hydrogels/éponges composites a été montrée. Des études supplémentaires seront faites afin de leur optimiser.



## ABSTRACT

---

Repair of bone defects by bone tissue engineering (BTE) methods is considered as an alternative to conventional grafts. The aim of this PhD project was to develop two types of BTE scaffolds for bone regeneration: one is in the form of injectable hydrogel, and the other is in the form of sponge. Both scaffolds based on the formation of polyelectrolyte complexes by mixing chitosan (CHT, cationic) and polymer of cyclodextrin (PCD, anionic). Besides developing the sponge scaffold, the vascularization of 3D scaffold (a challenge of BTE) was specially investigated in the first part of the work, for which vascular endothelial growth factor (VEGF) was loaded on the CHT/PCDs sponge to promote the vascularization. The second part of the thesis was dedicated to the elaboration of an injectable CHT/PCD hydrogel, which was intended for minimally invasive surgery. The formulation optimization of hydrogel was performed by tuning the composition ratios of two PCD components: soluble-form PCD (PCDs) and insoluble-form PCD (PCDi), in order to better reach the specific requirement (e.g. rheological properties) of injectable hydrogel for regenerative medicine. Finally, a prospective study on developing the composite hydrogel/sponge by adding a mineral phase - hydroxyapatite (HAp) in the formulation was realized to improve the mechanical and osteoconductive properties.

CHT/PCDs sponges were obtained by freeze-drying the hydrogels CHT/PCDs 3:3. The thermal treatment (TT) at different temperatures was further applied on the sponge to improve the mechanical stability. The CHT/PCDs sponge treated at 160°C was opted for further study thanks to high swelling capacity (~ 600%) and moderate lysozyme-induced biodegradation rate in vitro (~ 12% mass loss 21 days). This sponge of choice was further evaluated for the microstructure, the mechanical property (compressive strength) and the cytocompatibility with pre-osteoblasts (MC3T3-E1) and endothelial cells (HUVEC). Results of X-ray microtomography showed a high porosity (~87%) in the sponge with interconnected pores. Good cell adhesion and in-growth (colonization) in the sponge were observed by scanning electron microscopy (SEM). After loading VEGF on the sponge, the release profile of VEGF and the bioactivity of released VEGF were thoroughly studied. It showed that the release of VEGF was rapid (burst) during the first two days, then slowed down up to non-detectable by ELISA method after 7 days. The released VEGF during the first two days showed a significant pro-proliferation and pro-migration effect on HUVECs.

For the injectable CHT/PCDi/PCDs hydrogels, optimization of composition ratio was based on evaluating their rheological properties, injectability, and cytotoxicity. The beneficial effect of combining both PCDi and PCDs in the formula of the hydrogel was clearly observed on the properties of hydrogel. Namely, the CHT/PCD hydrogel, composed of equal quantity of PCDi and PCDs, demonstrated the best compromise between structural stability, shear-thinning and self-healing properties, and injectability. An excellent cytocompatibility with pre-osteoblast cells (MC3T3-E1) was also confirmed for the hydrogel with this composition.

Based on the optimized formulation, HAp was incorporated at different concentrations, which didn't disturb the formation or the structural stability of the hydrogels, but improved the viscoelastic properties. The composite sponges, elaborated by lyophilization of these hydrogels, showed that the HAp particles homogeneously dispersed within the macroporous structure of the sponge. These encouraging results showed the feasibility of providing an injectable hydrogel or a composite sponge for BTE scaffold.

In conclusion, the developed sponge and injectable hydrogel, which based on the formation of polyelectrolyte complex between CHT and PCD, showed promising potential for application as scaffold in BTE. Further study is expected to focus on the optimization of composite CHT/PCD hydrogel/sponge to fulfill the requirement of clinical application.

