



HAL
open science

Implant ligamentaire bioactif et biodégradable : élaboration, fonctionnalisation et étude des mécanismes

Amélie Leroux

► **To cite this version:**

Amélie Leroux. Implant ligamentaire bioactif et biodégradable : élaboration, fonctionnalisation et étude des mécanismes. Biomateriaux. Université Sorbonne Paris Cité, 2019. Français. NNT : 2019USPCD054 . tel-04213541

HAL Id: tel-04213541

<https://theses.hal.science/tel-04213541v1>

Submitted on 21 Sep 2023

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.

Laboratoire Biomatériaux pour la Santé
Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques
UMR CNRS 7244, Institut Galilée, Université Paris XIII

THESE

Présentée par

Amélie LEROUX

Pour l'obtention du grade de docteur de l'Université Paris XIII

Discipline : Doctorat de Chimie

Mention : Biomatériaux

IMPLANT LIGAMENTAIRE BIOACTIF ET BIODEGRADABLE

Élaboration, fonctionnalisation et étude des mécanismes

Soutenue le 29 mars 2019 devant la commission d'examen :

Membres du jury :

Rapporteurs :

Mr D. MITTON – Directeur de Recherche, IFSTTAR, Lyon

Rapporteur

Mr J. COUDANE – Professeur à l'Université de Montpellier

Rapporteur

Examineurs :

Mme V. MIGONNEY – Professeur à l'Université Paris XIII

Directrice de thèse

Mme V. VIATEAU – Professeur à l'École Nationale Vétérinaire d'Alfort

Examinatrice

Mme M. CUCCHIARINI – Professeur à l'Université de la Sarre, Allemagne

Examinatrice

Membres Invités :

Mr D. CASTNER - Professeur à l'Université de Washington, USA

Invité

Mme C. FALENTIN-DAUDRE – Enseignant-Chercheur à l'Université Paris XIII

Invitée

*« Le succès n'est pas final,
l'échec n'est pas fatal,
c'est le courage de continuer qui compte. »*

Winston Churchill

Remerciement

Cette thèse a été réalisée au sein de l'unité Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques UMR CNRS 7244, Laboratoire Biomatériaux pour la Santé, Institut Galilée, Université Paris XIII.

Mes plus grands remerciements vont au Pr Véronique Migonney qui a dirigé ces travaux de thèse. Sa passion, son expertise, sa rigueur, son enthousiasme et son humanité ont constitué une source inépuisable de motivation au quotidien. Cette thèse n'aurait pas pu être plus stimulante sans votre présence, à la fois d'un point de vue professionnel et personnel. Travailler à vos côtés durant ces années aura été un réel plaisir et sans vous ce travail n'aurait pas été possible.

Je remercie Mr David Mitton, Directeur de Recherche, à l'IFSTAR (Institut Français des Sciences et Technologies des Transports, de l'Aménagement et des Réseaux) de l'Université de Lyon, et Mr Jean Coudane, professeur à l'Institut des Biomolécules Max Mousseron de l'Université de Montpellier, d'avoir accepté d'être rapporteurs de mes travaux de thèse.

Je remercie les partenaires industriels du projet Liga2bio avec lesquels j'ai pu être en relation au sein de la société LARS et de la société Texinov MDB, notamment la Pr Nadège Boucard et Mme Marie Vandesteene, pour leur dynamisme dans le projet, leur réactivité et leur professionnalisme à la fois d'un point de vue technique et relationnel.

Je remercie les partenaires académiques du projet Liga2bio, le Pr Christophe Egles de l'Université de Technologie de Compiègne, le Dr Delphine Duprez du laboratoire de biologie du développement de l'Université Pierre et Marie Curie, et tout particulièrement la Pr Véronique Viateau, vétérinaire à l'École Nationale Vétérinaire de Maisons-Alfort, pour son implication dans le projet et son accueil convivial au sein des blocs opératoires.

Je souhaite remercier chaleureusement la Pr Magali Cucchiaroni, du Centre d'Orthopédie Expérimentale du CHU de la Sarre, à Homburg en Allemagne, de m'avoir accueillie à trois reprises et de m'avoir conseillée avec autant de jovialité. J'ai apprécié chaque échange que nous avons pu avoir que ce soit en face à face ou à distance ; ta joie de vivre et ta bienveillance ont été réconfortes plus d'une fois. Je remercie également le Pr Henning Madry, chirurgien orthopédique au CHU de la Sarre, pour son accueil chaleureux, ses précieux conseils scientifiques et nos discussions de voyages.

Je remercie le Pr Dave Castner, de l'Université de Washington, pour toutes les analyses XPS présentes dans cette thèse et pour son aide dans la rédaction de nos travaux communs. Je remercie

la Pr Najet Yagoubi du laboratoire Matériaux et Santé de la faculté de pharmacie de Chatenay-Malabry, de m'avoir permis d'utiliser leur enceinte de vieillissement accéléré.

Je remercie sincèrement les stagiaires que j'ai pu encadrer : Clémence Héraud, Jade Chura et Anastasiia Markitantova, pour leur aide précieuse dans la réalisation de cette thèse et pour leur extrême bonne volonté et motivation tout au long de leurs stages. Je remercie également Tuan Nguyen, doctorant au LBPS, pour son aide, notamment dans la réalisation des tests de caractérisation de surface (AFM, angle de contact et FTIR) de l'étude de dégradation, ainsi que pour son sourire et sa joie de vivre.

Je souhaite remercier tout particulièrement le Dr André Rangel pour son soutien quotidien, sa gentillesse et son aide importante de back-up (entre autres pour les nombreux changements de milieux de dégradation !). Merci aussi pour nos nombreuses discussions des plus sérieuses aux plus loufoques.

Je remercie amicalement le Dr Céline Falentin-Daudré pour le réconfort de nos échanges et pour les discussions bienveillantes et personnelles que nous avons pu avoir. Je remercie également le Dr Jean-Sébastien Baumann pour les discussions high-tech, science-fiction et pâtisserie de nos pauses-café. Je remercie Jagi, Ana et Tamás de m'avoir accueillie au sein du laboratoire en Allemagne, de m'avoir formée et autant intégrée dans leur quotidien.

Je remercie l'ensemble des membres du laboratoire CPSBAT.

Je souhaite remercier spécialement mes amis Agathe, Quentin, Théotime, Lena et Julie pour ne citer qu'eux ; mon frère Stéphane et ma sœur Coraline ; et bien évidemment mes parents. Je vous remercie tous pour vos discours d'encouragement, pour votre écoute dans les moments difficiles et votre présence tout simplement. Enfin, je remercie singulièrement Aurélien d'avoir cru en moi durant toutes ces années, de m'avoir portée et supportée toujours avec humour, et d'avoir été aussi patient et compréhensif.

Abréviations

ADN	Acide DésoxyriboNucléique
AFM	Microscopie à force atomique
ALP	Alkaline Phosphatase
BPA	Polyamine ramifiée
BPI	Banque Publique d'Investissement
BSA	Bovin Serum Albumin
BT	Bleu de Toluidine
COL I	Collagène de type I
COL II	Collagène de type II
COL III	Collagène de type III
CSPBAT	Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques
DIDT	Tendon du Droit Interne et du Demi Tendineux
DMEM	Dulbecco's Modify Eagle Medium
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSC	Calorimétrie différentielle à balayage
E	Module d'Young
EDTA	Ethylène Diamine Tétraacétique
ENVA	Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort
EtOH	Ethanol
FDA	Food and Drug Administration
Fg	Fibrinogène
FGF	Fibroblast Growth Factor
Fn	Fibronectine
G	Surface greffée
GAG	Glycosaminoglycane
GAPDH	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GPC	Chromatographie d'exclusion stérique
IL-1 β	Interleukine-1 β
IRBM	Innovation and Research in BioMedical engineering
IRM	Imagerie à Résonance Magnétique
LAD	Ligament Augmentation Device
LBPS	Laboratoire Biomatériaux Pour la Santé
LCA	Ligament Croisé Antérieur
LCM	Ligament collatéral médial
LCP	Ligament Croisé Postérieur
MEB	Microscopie Electronique à Balayage
MEC	Matrice extracellulaire
MMP	Métalloprotéase Matricielle
MMP-1	Métalloprotéase Matricielle 1
MMP-13	Métalloprotéase Matricielle 13
Mn	Masse molaire moyenne en nombre
MTT	Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide
Mw	Masse molaire moyenne en masse
NaSS	Styrène sulfonate de sodium
NG	Surface non greffée
OE	Oxyde d'éthylène

PBS	Phosphate Buffered Saline
PC12	PCL de grade médical
PC60	PCL de grade technique
PCL	Polycaprolactone
PDLA	Acide poly(D-lactique)
PDO ou	
PDS	Poly(dioxanone)
PET	Poly(téréphtalate d'éthylène glycol)
PGA	Acide poly(glycolique)
PLA	Acide poly(lactique)
PLLA	Acide poly(L-lactique)
pNaSS	Poly(styrène sulfonate de sodium)
PP	Polypropylène
PTFE	Polytétrafluoroéthylène
rAAV	adeno-associated virus recombiné
RGD	Tripeptide arginine-glycine-acide aspartique
RT-PCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
Scx	Scleraxis
SD	Standard Deviation
SVF	Sérum de Veau Foetal
Tf	Température de fusion
TG	Taux de greffage
Tg	Température de transition vitreuse
TGF- β	Transforming Growth Factor β
TNF- α	Tumor Necrosis Factor α
Tnmd	Tenomoduline
UPMC	Université Pierre et Marie Curie
XPS	Spectrométrie photoélectronique par rayons X
ϵ	Déformation élastique
σ	Contrainte mécanique
χ	Taux de cristallinité

Liste des figures

Figure 1 : (A) Cellules fibroblastiques issues de la lignée NIH3T3 observées au microscope à contraste de phase (source : site internet ATTC lignée CRL-1658) ; (B) Section histologique, colorée à l'hématoxyline et à l'éosine, de la reconstruction d'un ligament après 15 semaines de cicatrisation (GX400)[4]	22
Figure 2 : Représentation schématique d'un fibroblaste (à gauche) et d'un fibrocyte (à droite) (source : https://www.memorangapp.com/flashcards/49294/Connective+Tissue).....	23
Figure 3 : Représentation schématique du positionnement des fibroblastes sur les fibres de collagène de la MEC[5].....	23
Figure 4 : Structure fibrillaire d'un ligament par assemblage de fibres de collagène[8]	25
Figure 5 : Structure d'une fibre élastique (A) et de l'élastine (B) [10]	26
Figure 6 : Articulation tibio-fémorale d'un genou droit en flexion – vue antérieure [13]	28
Figure 7 : Structure ligamentaire du genou. A. Genou en flexion à 90° ; B. Vue axiale d'un genou droit au-dessus de la surface méniscale. ALL = ligament antéro-latéral ; LCL = ligament collatéral latéral ; PCL = ligament croisé postérieur ; ACL = ligament croisé antérieur ; LM = ménisque latéral ; MM = ménisque médial ; MCL = ligament collatéral médial ; PFL = ligament poplitéo-fibulaire[11].....	28
Figure 8 : Genou observé en IRM, exemple de mesure d'angle (a) sur le plan coronal (b) sur la plan sagittal.[16]	29
Figure 9 : Vues sagittales des faisceaux du LCA (A) en hyper-extension (B) en flexion. [14]	30
Figure 10 : Articulation du genou avec résection du condyle médial. Représentation schématique de la position intracapsulaire mais extra-synoviale des ligaments croisés.[21]	31
Figure 11 : Courbes contrainte-déformation d'un ligament croisé antérieur humain (modifiées d'après[24], [25])	32
Figure 12 : (A) Mécanisme de chargement du LCA[34]. (B) Forces agissant sur le LCA pendant la simulation du cycle de la marche et les changements de l'angle du genou associés[1].....	35
Figure 13 : Cas de rupture du LCA. (A) torsion axiale (B) hyperextension (C) hyperflexion (D) choc latéral[35]..	36
Figure 14 : Les 3 phases de la cicatrisation [44]	37
Figure 15 : Sites de prélèvement des tendons dans les deux techniques de ligamentoplastie les plus employées	42
Figure 16 : Ligaments artificiels commercialisés dans les années 80-90 : (1) ligament en fibres de carbone ; (2) ligament Surgicraft ; (3) ligament Leeds-Keio ; (4) ligament Dacron-Stryker ; (5) tendon bovin ; (6) ligament Gore-Tex ; (7) ligament LARS (adapté de [64], [67])	46
Figure 17 : Courbe de force en fonction de l'allongement des différents ligaments synthétiques[63]	47
Figure 18 : (A) localisation IDEAL du tunnel fémoral[53] ; (B) les deux types d'empîement : le « roof impingement » et le « PCL impingement »[75]	49
Figure 19 : Réaction de l'hôte à l'introduction d'un corps étranger[82]	52
Figure 20 : Conformation et orientation des protéines adsorbées. Le schéma en haut montre la dénaturation d'une protéine avec le temps d'adsorption. Le schéma en bas montre une protéine adsorbée dans différentes orientations.[82]	53
Figure 21 : (A) Schéma de l'interaction intégrines-collagène et intégrine-fibronectine[85] (B) Structure de la fibronectine[86]	55
Figure 22 : Représentation schématique de l'organisation d'une fibre de soie[91]	58
Figure 23 : Etapes de mise en place du dispositif BEAR	59
Figure 24 : Mécanismes de polymérisation par ouverture de cycle de la PCL[101]	62
Figure 25 : Mécanisme de dégradation des polymères résorbables (a) dégradation en surface ; (b) dégradation en masse ; (c) dégradation en masse suivi d'une autocatalyse interne[100]	65
Figure 26 : Mécanisme de dégradation de la PCL[106].....	65

Figure 27 : Exemple de différentes architectures pour la reconstruction ligamentaire (A) structure torsadée en fibres de soie[93] ; (B) structure tressée en PLLA [76] ; (C) structure mixte avec une partie extra-articulaire tricotée[112]	68
Figure 28 : (A) schéma du packaging d'un gène d'intérêt dans un adénovirus (B) schéma représentant la transduction du rAAV créé au sein d'une cellule	77
Figure 29 : évaluation de la cytotoxicité des films de PCL sur les fibroblastes L929.....	81
Figure 30 : évaluation de la cytotoxicité des films de PCL sur les fibroblastes NIH3T3	82
Figure 31. AFM images of (A) a non-grafted PC60 film, (B) a non-grafted PC12 film, (C) a grafted PC60 film, and (D) a grafted PC12 film.	96
Figure 32. Evolution of atomic concentration percentages of the (A) PC60 and (B) PC12 films (GR: grafting rate).	97
Figure 33. Viability of sACL fibroblasts in the presence of the PCL films. An MTT assay was performed after 24 h of contact between the cells and the various films as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films).....	98
Figure 34. Prolifération de sACL fibroblastes over time in the presence of the PCL films. The numbers of adherent cells (A) and the cell doubling time (days) (B) were measured at the denoted time points as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films).	99
Figure 35. Characterization of sACL fibroblasts over time in the presence of the PCL films (PC60). Phalloidin (green)/DAPI (blue) labelling and H&E staining (insets) with corresponding cell densities (cell/cm ²) (G-I) were performed at the denoted time points (day 1: A, D, G; day 3: B, E, H; day 7: C, F, I) as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films). *Statistically significant relative to the corresponding NG condition.	100
Figure 36. Characterization of sACL fibroblasts over time in the presence of the PCL films (PC12). Phalloidin (green)/DAPI (blue) and H&E staining (insets) with corresponding cell densities (cell/cm ²) (G-I) were performed at the denoted time points (day 1: A, D, G; day 3: B, E, H; day 7: C, F, I) as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films). *Statistically significant relative to the corresponding NG condition.	101
Figure 37. Production of FGF-2 (A,B) and TGF- β (C,D) from sACL fibroblasts over time in the presence of the PCL films (PC60 films: A,C; PC12 films: B,D). Growth factor expression was measured at the denoted time points by ELISA as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films). (*p \leq 0.05 and ** p \leq 0.005).	102
Figure 38. Gene expression in sACL fibroblasts over time in the presence of the PCL films. Samples were processed at the denoted time points for total cellular RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time RT-PCR amplification as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films). The genes analyzed included type-I collagen (A,D), type-III collagen (B,E), and TNF- α (C,F), with GAPDH serving as a housekeeping gene and internal control. Ct values were obtained for each target and GAPDH as a control for normalization, and fold inductions (relative to cells maintained in absence of films) were measured using the 2 ^{-$\Delta\Delta$Ct} method. (*p \leq 0.05 and ** p \leq 0.005).	103
Figure 39. Kinetics of sACL fibroblast adhesion on PC12 films pre-incubated with 10% FBS (NG: non-grafted films; G: grafted films). (A) Static adhesion over cell incubation time. (B) Dynamic adhesion after 30 min of incubation and over increasing centrifugal force applied. (C) Dynamic adhesion over cell incubation time upon force application (17.5 dynes/cm ²).	104
Figure 40. Percentages of static (A) and dynamic (B) adhesion of sACL fibroblasts seeded on proteins pre-adsorbed PC12 films (NG: non-grafted films; G: grafted films).....	105
Figure 41 : Cinétique de prolifération de cellulaires primaires d'ACL de brebis transduites ou non par rAAV-FGF-2 et ensemencées sur PC12 greffé ou non greffé	109
Figure 42 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis sur fonds de puits observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge)) après 1 jour (A) ; 3 jours (B) et 7 jours (C) de culture (barre d'échelle : 50 μ m)	109

Figure 43 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis non transduites (A,C,E,G) et transduites par rAAV TGF- β et rAAV-RFP (B,D,F,H) ensemencées sur PC60 NG (A et B) ; PC60 G (E et F) ; PC12 NG (C et D) et PC12 G (G et H) observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge)) après 1 jour de culture (barre d'échelle : 50 μ m).....	110
Figure 44 : Molécule de BPA-C8.....	111
Figure 45 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis sur fonds de puits observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge)) après 1 jour de culture. A : cellules non transduites, sans BPA ; B : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) ; C : cellules non-transduites mais avec BPA (50 μ M) ; D : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) et avec BPA (50 μ M) (barre d'échelle : 50 μ m).....	111
Figure 46 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis sur PC12 NG observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge)) après 1 jour de culture. A : cellules non transduites, sans BPA ; B : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) ; C : cellules non-transduites mais avec BPA (50 μ M) ; D : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) et avec BPA (50 μ M) (barre d'échelle : 50 μ m).....	112
Figure 47 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis sur PC12 G observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge)) après 1 jour de culture. A : cellules non transduites, sans BPA ; B : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) ; C : cellules non-transduites mais avec BPA (50 μ M) ; D : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) et avec BPA (50 μ M) (barre d'échelle : 50 μ m).....	113
Figure 48 : pourcentage de cellules adhérentes (A) en statique et (B) en dynamique après 15min de contrainte à 17,7 dynes/cm ² en présence de BPA ou non.....	114
Figure 49 : Système homemade de création de faisceaux de PCL contenant 20 fils.....	118
Figure 50 : Représentation schématique du greffage radicalaire du pNaSS sur les faisceaux de PCL.....	119
Figure 51 : Représentation schématique et photo du système pour le greffage UV.....	119
Figure 52 : Taux de greffage obtenus par polymérisation UV des faisceaux de PCL.....	120
Figure 53 : impacts du mode de greffage (thermique ou UV) sur les caractéristiques physico-chimiques des faisceaux de PCL. (A) résultats des analyses GPC ; (B) résultats des analyses DSC.....	121
Figure 54 : Images of primary sheep ACL cells seeded onto ungrafted (left) and grafted (right) PCL fibers bundles after 3 days of culture.....	131
Figure 55 : Young's modulus, elastic strain and ultimate tensile stress obtained from stress-strain curve after different chemical and physical treatments (NS = Not Significant / *p \leq 0,005).....	133
Figure 56 : Typical strain-stress curves and delimitation of domains for bundles after spin finish removal (dashed line curve) and thermal grafted bundles (full line curve).....	135
Figure 57 : Deformation in time of bundles which endured loading of either 3.5N, 24N or 51N.....	136
Figure 58 : Hysteresis loops obtained after load-unload experiments onto grafted samples.....	136
Figure 59 : Comparaison of the hysteresis loops for ungrafted (dashed line curve) and grafted (full line curve) samples after a load of 24N.....	137
Figure 60 : SEM images of spin-coating PCL films after 1 night at room temperature (A) ; after 4 days at 45°C (B) ; after quenching (C) (Scale bar = 50 μ m).....	137
Figure 61 : évaluation de la cytotoxicité des faisceaux de PCL sur les fibroblastes L929, NIH3T3 et primaires de brebis (sACL).....	140
Figure 62 : Résultats MTT avec l'huile d'ensimage seule.....	141
Figure 63 : Taux de survie des cellules primaires de brebis en contact direct avec les faisceaux de PCL.....	142
Figure 64 : Prolifération de fibroblastes primaires de brebis sur des faisceaux de PCL non greffés (NG), greffés de pNaSS par voie thermique (G Th) et greffés par voie UV (G UV).....	143
Figure 65 : Prolifération de fibroblastes primaires de brebis sur faisceaux de PCL non greffés (NG) et greffés de pNaSS par voie UV avec activation (G UV ozonés) et sans activation (G UV non ozonés).....	144
Figure 66 : Prolifération de fibroblastes primaires de brebis sur faisceaux de PCL non greffés (NG) et greffés de pNaSS par voie UV avec taux de greffage croissants.....	145

Figure 67 : Observation microscopique de cellules primaires de brebis après 7 jours de culture sur faisceaux de PCL.....	146
Figure 68 : Observation microscopique de fibroblastes primaires d'ACL de brebis après 7 jours de culture sur faisceaux de PCL non greffés (A) et greffés de pNaSS (G) après coloration au bleu de toluidine. Densité d'ensemencement : 5.10^4 cellules/puits. Barre d'échelle : 100 μm	146
Figure 69 : Observation en microscopie confocale à épifluorescence d'une fibre de PCL ensemencée de cellules marquées au DAPI pour l'observation des noyaux cellulaires	147
Figure 70 : (A) pH variation of the saline solution used for degradation of PCL films (B) Weight loss percentage for 120 weeks of degradation for grafted and non-grafted films kept at 25 °C and 37 °C.	165
Figure 71 : SEC analysis results. (A) evolution of M_n over degradation time, (B) evolution of PDI over degradation time.....	166
Figure 72 : Crystallinity (A) and melting temperature (B) of PCL films over degradation time	166
Figure 73 : (A) Evolution of Young Modulus for PCL bundles over degradation time; (B) Evolution of elastic deformation percentage for PCL bundles over degradation time.	167
Figure 74 : (A) Evolution of the ultimate stress with degradation time; (B) Strain stress curves for grafted samples degraded at 37 °C.....	168
Figure 75 : SEM images of non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C for 0-, 24-, 48-, 72-, 96- and 120 weeks. Scale bar = 300 μm . Legend: circle: amorphous part / arrow: cracks / star: hole	169
Figure 76 : Nano-topography of non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C for 24, 96 and 120 weeks (500x500 nm^2).	170
Figure 77 : C1s peak fit parameters - percentages of atomic bonds for (A) non-grafted PCL films degraded overtime at 37°C and (B) grafted PCL films degraded overtime at 37°C.....	172
Figure 78 : Fourier Transforms Infrared Spectra of non-grafted (A) and grafted (B) PCL films degraded at 37°C over time.	173
Figure 79 : (A) The C-O-C peak of FTIR spectrum showing the blue shift with degradation time for the grafted PCL samples degraded at 37°C and (B) evolution of $-\text{SO}_3^-$ groups on grafted-PCL films degraded at 37°C over time.	174
Figure 80 : Morphologies of sACL fibroblasts seeded for 7 days on non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C over the time period shown. Phalloidin (green)/DAPI (blue) labelling (scale bar = 100 μm) and H&E staining (insets).	175
Figure 81 : RT-qPCR analysis of the expression levels of COL1A1, COL3A1 and COL2A1 genes in sheep ACL cells, cultured during 7 days, on non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C for 24, 48, 84 and 96 weeks. Graphs show means +/- standard deviations of 1 to 3 samples of gene expression. The relative mRNA levels for each gene in the different experimental conditions were calculated as described in the Materials and methods. For all genes and experimental conditions, the COL2A1 values of NG PCL at T=0 were used as control and normalized to 1. Consequently, all the relative mRNA levels are comparable between them. Cts of COL2A1, COL3A1 and COL1A1 were around 33 cycles, 20 cycles and 19 cycles, respectively. COL2A1 was not expressed in the ACL cells, while COL3A1 and COL1A1 displayed high levels of expression in all the experimental conditions.	176
Figure 82 : Degradation mechanisms of PCL surfaces (a) non-grafted and (b) grafted with pNaSS	179
Figure 83 : (A) Enceinte de vieillissement à arc au xénon Q-SUN Xe-1 ; (B) positionnement des échantillons à l'intérieur de l'enceinte.....	183
Figure 84 : (A) évolution du pH de la solution de dégradation au cours du temps ; (B) évolution du poids des faisceaux de PCL greffés et non greffés exprimé en pourcentage de perte par rapport au poids initial (n=3) ..	184
Figure 85 : Suivi de la masse molaire moyenne en nombre (A) et de l'indice de polydispersité (B) des faisceaux de PCL greffés (G) et non greffés (NG) en fonction du nombre d'heures dans l'enceinte de vieillissement (n=3)	184
Figure 86 : Suivi de la cristallinité χ (lignes) et de la température de fusion T_f (barres) des faisceaux de PCL greffés (G – en bleu) et non greffés (NG – en vert) en fonction du nombre d'heures dans l'enceinte de vieillissement (n=3)	185

Figure 87 : Taux de greffage mesurés par dosage colorimétrique au bleu de toluidine sur les faisceaux de PCL non greffés (NG) et greffés (G) avant et après leur passage dans l'enceinte de vieillissement (n=3)	186
Figure 88 : Module d'Young (E), contrainte à rupture (σ_{max}) et déformation élastique (ϵ) des faisceaux greffés de pNaSS par voie thermique non stérilisés ; stérilisés à l'éthanol ; stérilisés à l'oxyde d'éthylène ou stérilisés par rayonnements β	191
Figure 89 : Analyses calorimétriques des faisceaux de PCL suivant le mode de stérilisation utilisé	192
Figure 90 : Taux de greffage mesurés par dosage colorimétrique au bleu de toluidine des faisceaux de PCL stérilisés suivant les différents modes étudiés	192
Figure 91 : Taux de greffage de pNaSS obtenus sur faisceaux de PCL – étude cinétique de polymérisation radicalaire amorcée par voie thermique.....	194
Figure 92 : étude dimensionnelle de l'articulation du genou d'un rat.....	195
Figure 93 : Charge à rupture en fonction du nombre de fils de PCL par faisceaux.....	196
Figure 94 : SEM images of free fibers (A) and braided (B) prototypes.....	203
Figure 95 : Grating rates of the two types of prototypes obtained with the toluidine blue colorimetric method	203
Figure 96 : schematic representation of the placement of the prototypes in the jaws (in gray) of the traction machine.....	204
Figure 97 : ESEM images of ungrafted (A, B,C) and grafted (D,E,F) free fibers prototypes cultured with primary fibroblasts during 1 month.....	205
Figure 98 : ESEM images of ungrafted (A, B,C) and grafted (D,E,F) braided prototypes cultured with primary fibroblasts during 1 month.....	205
Figure 99 : implanted limb of the rat (A) and prototype implanted (B) after 1 month	206
Figure 100 : ESEM images of the pNaSS-grafted braided prototype. A and B present the intra-articular part; C and D focus on the intra-osseous part.....	207
Figure 101 : Technique opératoire employée pour l'implantation des implants ligamentaires chez le rat	209
Figure 102 : Ligament prothétique pour le rat (A) photographie de l'implant entrant dans l'aiguille guide ; (B) observation par MEB de l'implant montrant sa structure tricotée.....	210
Figure 103 : observations cliniques après 3 mois d'implantation (A) de la boiterie de l'animal ; (B) de la laxité articulaire ; (C) de l'amplitude de mouvement	211
Figure 104 : résultats de tomодensitométrie de (A) l'épaisseur trabéculaire ; (B) le volume osseux/volume total ; (C) la densité minérale osseuse	212
Figure 105 : résultats de tomодensitométrie du diamètres des tunnels fémoraux (A), des tunnels tibiaux (B) et score arthrosique (C).....	213
Figure 106 : Images IRM en séquence FISP et en coupes axiales de ligaments en PCL (A) intact (cercle rouge) et (B) rompu à plus de 50% (cercle rouge) ; (C) comparaison du nombre de ruptures de prothèse en fonction des groupes	213
Figure 107 : Coupes histologiques en site intra-osseux sur 3 animaux différents par groupe	214
Figure 108 : Coupes histologiques en site intra articulaire sur 3 animaux différents par groupe	215
Figure 109 : Coupes histologiques intra-osseuses montrant la cellularité plus importante (noyaux colorés en bleu) pour le ligament synthétique (B) que pour l'autogreffe (A). Noter également la résorption osseuse au contact de l'autogreffe (flèche noire).	216
Figure 110 : évaluation de la cellularité (A et D), de la vascularisation (B et E) et de l'organisation des fibres de collagènes (C et F) d'après des coupes histologiques réalisées en zone intra-osseuse (A,B et C) et intra articulaire (D,E et F).	216
Figure 111 : étude de la réponse inflammatoire locale pour les 3 groupes étudiés avec l'épaisseur de la membrane synoviale (A) ; le score de cellules géantes en site intra-osseux (B) et le score de cellules géantes en site intra articulaire (C)	217
Figure 112 : Expressions géniques des marqueurs spécifiques de la lignée ligamentaire (A) ; et des marqueurs de reconstruction tissulaire (B).	218
Figure 113 : Expressions géniques des métalloprotéases et IL-1 β (A) ; et du gène de la Fn (B).	219

Liste des tableaux

Tableau 1: Propriétés mécaniques du LCA humain[23]	35
Tableau 2 : Résumé des matériaux et structures des prothèses ligamentaires[67], [71].....	46
Tableau 3 : Principales propriétés mécaniques des ligaments synthétiques [63], [72]	47
Tableau 4 : Bilan des causes principales d'échecs des prothèses ligamentaires[67], [80]	51
Tableau 5 : Concentration en protéines dans le plasma/sérum et dans le liquide synovial[81]	53
Tableau 6 : Polyesters aliphatiques utilisés dans le domaine biomédical	60
Tableau 7 : Essais de solubilité de PCL réalisés par A.Augé, laboratoire CSPBAT (résultats non publiés)	63
Tableau 8 : Principaux facteurs de croissance utilisés en ingénierie tissulaire du ligament[65], [90], [116], [132]	75
Table 9. Molecular weights of the films (NG: non-grafted films; G: grafted films; Mn: average weight; Mw: molecular weight; PDI: polydispersity index).....	95
Table 10. DSC analysis of the films (NG: non-grafted films; G: grafted films).....	96
Table 11. Grafting rates (NG: non-grafted films; G: grafted films; GR: grafting rate; XPS: X-Ray photoelectron analysis).....	97
Table 12: Experiment times and percentages of sample deformation per second at different strain rates tested	132
Tableau 13 : Mechanical data obtained from experimental curves	132
Tableau 14 : Pourcentages de cellules vivantes après test MTT - contact indirect	143
Tableau 15 : Taux de greffage de pNaSS (méthode colorimétrique) des faisceaux de PCL utilisés pour l'étude de prolifération	144
Table 16 : primers used for q-PCR.....	164
Table 17 : Water contact angle on PCL film degraded over time at 25°C and 37°C.....	171
Table 18 : Surface energy (total) of non-grafted and grafted films degraded at 25°C and 37°C	171
Table 19 : Polar fraction of non-grafted and grafted films degraded at 25°C and 37°C	171
Table 20 : Grafting rates (GR) determined according to equation 5 (see materials and methods) and surface concentration (XPS atomic percent) for non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C for 0, 24, 72 or 96 weeks	173
Tableau 21: Propriétés mécaniques des échantillons non greffés (NG) et greffés (G) des faisceaux de PCL ayant été placés 0, 100, 200, 300 ou 400 heures dans l'enceinte de vieillissement (n=8)	185
Tableau 22 : Analyses GPC des faisceaux de PCL suivant le mode de stérilisation utilisé	191
Tableau 23 : Module d'Young (E), la déformation élastique (ϵ) et contrainte à rupture (σ_{max}) déterminés sur des faisceaux non greffés et greffés « sec » ou « humide » (PBS).....	193
Tableau 24 : Module d'Young (E), déformation (ϵ) et contrainte à rupture (σ_{max}) des faisceaux de PCL non greffés et greffés de pNaSS par greffage amorcée par voie thermique – influence du temps de polymérisation : 1h ou 3h à 45°C	194
Tableau 25 : Revue de la littérature des caractéristiques mécaniques du LCCr natif chez le rat d'après [204], [244]–[246].....	196
Tableau 26 : Mechanical properties of the two PCL prototypes.....	204
Tableau 27 : Description des différents groupes étudiés.....	209

Sommaire

Remerciement.....	1
Abréviations	3
Liste des figures.....	5
Liste des tableaux.....	10
Sommaire	11
Introduction générale.....	17
Chapitre I – Revue bibliographique.....	21
I-Partie 1 : Le ligament	22
I.1.1. Fonction et composition du tissu ligamentaire.....	22
A. Cellules constitutives.....	22
B. Matrice extracellulaire	24
A.1. Structure fibreuse.....	24
A.2. Substance fondamentale.....	26
I.1.2. Anatomie et physiologie.....	27
A. Le genou	27
B. Le ligament croisé antérieur.....	29
B.1. L’orientation des fibres et leur insertion osseuse	29
B.2. La vascularisation	30
B.3. L’innervation.....	31
I.1.3. Biomécanique du ligament.....	31
A. Propriétés mécaniques du LCA.....	31
B. Cinématique et cinétique du genou	35
B.1. Situation normale	35
B.2. Situations à risque entraînant la rupture du LCA.....	36
I-Partie 2 : La reconstruction du LCA.....	37
I.2.1. Processus de cicatrisation spontanée	37
A. Saignement et réponse inflammatoire	38
B. Réparation et remodelage	38
I.2.2. Reconstruction chirurgicale.....	39
A. Reconnaître l’instabilité	39
B. Ligamentoplastie	40
C. Implants synthétiques	42
C.1. Généralités	42
a) Historique	43

b) Design et matériaux	44
c) Propriétés mécaniques.....	46
C.2. Problématique de l'échec des implants ligamentaires	47
a) Technique chirurgicale	48
b) Causes mécaniques	49
c) Synovites	50
I.2.3. Réponse de l'hôte aux biomatériaux.....	51
A. Interactions surface-protéines	53
B. Interactions protéines-cellules.....	54
I-Partie 3 : Médecine régénérative du LCA	55
I.3.1. Support de croissance tissulaire.....	56
A. Matériaux biodégradables	57
A.1. Polymères naturels.....	57
A.2. Polymères synthétiques	59
A.3. Cas de la PCL.....	61
a) Synthèse	61
b) Propriétés	62
c) Dégradation.....	64
B. Architecture du scaffold	66
I.3.2. Source cellulaire	68
A. Fibroblastes	68
B. Cellules souches mésenchymateuses.....	69
I.3.3. Modes de stimulation.....	70
A. Traitements de surface.....	70
A.1. Immobilisation de protéines de la MEC.....	70
A.2. Immobilisation de séquences de récepteurs membranaires.....	71
A.3. Modulation de la couche protéique interfacial	72
B. Facteurs de croissance	74
C. Thérapie génique.....	75
I-Partie 4 : Bilan bibliographique.....	77
Chapitre II – Etudes sur films.....	79
II-Partie 1 : étude préliminaire de cytotoxicité	81
II-Partie 2 : Analyse de la réponse cellulaire précoce	83
II.2.1. Résumé.....	83

A.	Caractérisation physico-chimique	83
B.	Impacts biologiques.....	84
II.2.2.	Article soumis à la revue scientifique « Materials Science and Engineering : C »	86
	Abstract	87
	Introduction.....	87
	Materials and methods	89
	Results	95
	Discussion	105
	Conclusion	107
	Acknowledgments	107
II-Partie 3 :	Etudes mécanistiques complémentaires.....	108
Chapitre III –	Etudes chimiques, mécaniques et biologiques sur faisceaux de fibres de PCL	117
III-Partie 1 :	Greffage de pNaSS par voie UV	119
III-Partie 2 :	Caractérisations mécaniques après différents traitements chimiques et physiques.....	122
III.2.1.	Résumé.....	122
A.	Essais de traction à rupture.....	123
B.	Impacts du traitement thermique.....	124
III.2.2.	Article paru dans la revue scientifique « Plos One ».....	126
	Abstract	127
	Introduction.....	127
	Material and methods.....	129
	Results	131
	Discussion	137
	Conclusion	139
	Acknowledgments	139
III-Partie 3 :	Études biologiques.....	140
III.3.1.	Etude de cytotoxicité.....	140
A.	Essais de cytotoxicité – influence du type cellulaire	140
B.	Essais de cytotoxicité - effet de l’huile d’ensimage et des procédés de désensimage	140
III.3.2.	Prolifération.....	143
A.	Influence du mode de greffage	143
B.	Influence du taux de greffage	144
III.3.3.	Morphologie.....	145
Chapitre IV –	Etude de la dégradation hydrolytique de la PCL	149

IV-Partie 1 : Etude de la dégradation naturelle de films et de faisceaux de PCL	150
IV.1.1. Résumé.....	150
A. Analyses de la dégradation générale des surfaces de PCL.....	151
B. Analyses de surface des échantillons de PCL dégradés	152
C. Impact biologique.....	153
IV.1.2. Article en cours de soumission dans la revue scientifique «Advanced Materials»	154
Abstract	155
Introduction.....	155
Materials and methods	157
Results	164
Discussion	177
Conclusion	179
Acknowledgments	180
Appendix.....	180
IV-Partie 2 : Etude de la dégradation accélérée en enceinte de vieillissement de faisceaux de PCL .	183
Chapitre V – Études in vivo chez le rat	189
V-Partie 1 : Études préliminaires	190
V.1.1. Impact de la stérilisation sur les faisceaux de PCL.....	190
A. Effet de la stérilisation sur les caractéristiques mécaniques des faisceaux de PCL	190
B. Effet de la stérilisation sur les caractéristiques physico-chimiques des faisceaux de PCL..	191
V.1.2. Études mécaniques	193
V.1.3. Dimensionnement.....	194
V-Partie 2 : Étude de faisabilité d’implantation	196
V.2.1. Résumé.....	196
V.2.2. Article paru dans la revue scientifique « IRBM »	198
Abstract	199
Introduction.....	199
Material and methods.....	200
Results	202
Discussion	207
Conclusion	208
Acknowledgments	208
V-Partie 3 : essais <i>in vivo</i>	209
V.3.1. Suivi clinique post-opératoire	211

V.3.2. Résultats tomodensitométriques.....	212
V.3.3. Résultats IRM	213
V.3.4. Résultats histologiques	214
V.3.5. Résultats de biologie moléculaire	218
Conclusion générale	221
References.....	227

Introduction générale

Le ligament croisé antérieur (LCA) joue un rôle fondamental dans le maintien et la stabilisation de l'articulaire du genou en s'opposant au déplacement du tibia vers l'avant ainsi qu'à une rotation interne excessive du tibia par rapport au fémur. Une lésion du LCA est généralement causée par une hyper extension soudaine ou une torsion brusque appliquée à l'articulation. Le mécanisme exact de la lésion du LCA diffère selon les sports ou les activités pratiquées mais la rupture est suivie par l'apparition soudaine d'une douleur, d'une instabilité du genou et d'un gonflement de l'articulation.

Une fois rompu, en raison de sa localisation intra articulaire et de la pauvreté de sa vascularisation, le LCA ne cicatrise pas spontanément et l'évolution se fait vers une rétraction et une dégénérescence des extrémités rompues. La laxité du genou qui en résulte entraîne une perte fonctionnelle associée à une instabilité qui va gêner ou empêcher la pratique des activités sportives, voire de la vie professionnelle ou de la vie courante du patient. À terme, cette laxité favorise la survenue de lésions méniscales puis une dégradation arthrosique du genou.

La rupture du LCA du genou est une affection fréquente avec une incidence évaluée à 1 pour 3 000 habitants par an en Europe et aux Etats-Unis. Elle survient majoritairement chez des sujets jeunes et sportifs, pratiquant particulièrement des sports de pivot tels que le ski, le football, le rugby, ou encore les sports de combat. Quel que soit le patient, la rupture du LCA présente un caractère invalidant et des séquelles peuvent apparaître si aucune intervention n'est envisagée. Pour toutes ces raisons, le recours à une intervention chirurgicale est fréquent voire primordial, en particulier chez les sujets jeunes. Ainsi, en France, environ 35 000 patients subissent chaque année une intervention chirurgicale à la suite d'une rupture du LCA. Les lésions des ligaments croisés représentent ainsi un enjeu de santé publique significatif et ce d'autant plus qu'elles atteignent une population jeune et active.

Le traitement chirurgical de référence ou « gold standard » employé actuellement à travers le monde dans 90% des cas est l'autogreffe à partir de tendon autologue. Toutefois, l'utilisation d'une greffe n'est pas dénuée d'inconvénients : morbidité liée au prélèvement tissulaire, défaut d'ancrage du greffon au niveau osseux et taux de rupture encore important avec un taux d'échec estimé à environ 15%. Tout cela induit ainsi des délais de récupération importants pour la reprise des activités sportives.

Ainsi, face aux enjeux médicaux, économiques et sociétaux que représente la rupture du ligament croisé antérieur, l'équipe du Laboratoire des Biomatériaux pour la Santé (LBPS), attachée à l'unité UMR CNRS 7244 « Chimie, Structures, Propriétés de Biomatériaux et d'Agents Thérapeutiques » (CSPBAT) de l'Université Paris 13, ainsi que deux PME françaises, les sociétés LARS™ et MDB Texinov™, se sont regroupées autour d'un objectif commun : développer une prothèse ligamentaire

« bioactive », « biointégrable » et « biodégradable ». Ce projet, dénommé « LIGA2BIO », a obtenu un financement du Programme d'Investissements d'Avenir, opéré par la Banque Publique d'Investissement « BPI France », en mai 2017. Dans ce contexte, la future prothèse développée devra ainsi permettre :

- une reprise rapide des activités physiques du patient ;
- d'éviter les réactions hostiles de l'hôte ;
- de supprimer le caractère permanent de la prothèse.

Dans le cadre de ce projet, la société MDB Texinov™ est en charge de la réalisation du textile médical qui composera la prothèse ; la société LARS™ est en charge de l'industrialisation des procédés et de la mise sur le marché du futur implant ; enfin le laboratoire LBPS-CSPBAT est en charge de l'ensemble des connaissances techniques et fondamentales en termes de chimie des polymères, de la bio-fonctionnalisation de l'implant et de son impact biologique une fois intégré dans le système vivant.

Les travaux précédemment menés au sein de l'équipe LBPS du laboratoire CSPBAT sur le développement d'une prothèse bioactive ont montré d'excellents résultats *in vitro* et *in vivo* du greffage radicalaire de poly(styrène sulfonate de sodium) (pNaSS) sur prothèse ligamentaire LARS en poly(téréphtalate d'éthylène glycol) (PET). Dans le cadre de ce nouveau projet, il a donc été décidé de changer le matériau de l'implant en un matériau biodégradable et de conserver la bioactivité donnée par le greffage chimique du pNaSS. Grâce à ses propriétés de dégradation très lente, à l'absence de produits de dégradation acides, à son innocuité biologique, à la possibilité de moduler ses propriétés mécaniques et à son utilisation actuelle dans des dispositifs médicaux déjà commercialisés, le choix de la polycaprolactone (PCL) a été retenu.

C'est dans ce contexte que s'inscrivent les travaux de thèse présentés dans ce manuscrit intitulé « Implant ligamentaire bioactif et biodégradable : élaboration, fonctionnalisation et étude des mécanismes ». Ces travaux ayant débuté avant l'obtention du financement BPI, se placent en amont du projet LIGA2BIO et partent ainsi du choix initial des granulés de PCL avant toute transformation industrielle (réalisée ici par une société extérieure au projet, la société Luxilon™) et vont jusqu'à l'implantation chez le petit animal d'un implant biodégradable et bioactif en PCL greffé de pNaSS. Les résultats de ces travaux sont présentés sous forme d'une thèse sur articles : quatre articles, publiés ou en cours de soumission, font chacun l'objet d'un chapitre distinct, complété par des études préliminaires ou complémentaires. Ainsi, ce manuscrit est articulé en cinq chapitres :

- (i) une revue bibliographique détaillant le LCA, sa rupture, sa reconstruction, l'état de l'art des solutions proposés historiquement, la raison de leurs échecs et les solutions actuellement développées dans la littérature en médecine régénérative du LCA ;

- (ii) un chapitre dédié aux études physico-chimiques et biologiques réalisées sur des films de PCL greffés de pNaSS au travers de l'analyse de la réponse cellulaire précoce et d'études mécanistiques sur le fonctionnement de la bioactivité du pNaSS ;
- (iii) un chapitre dédié aux études chimiques, mécaniques et biologiques réalisées sur des faisceaux de fils de PCL greffés de pNaSS au travers du développement du greffage radicalaire du pNaSS sur fibres, de l'analyse de l'impact de ce procédé de greffage sur les propriétés mécaniques des faisceaux, de l'étude de la cytotoxicité et des activités biologiques – prolifération et morphologie cellulaires ;
- (iv) un chapitre consacré aux études de dégradation hydrolytique de la PCL – films et faisceaux – greffés de pNaSS au travers de la dégradation naturelle de ces échantillons en milieu physiologique simulé (en solution saline à 37°C) et de la dégradation accélérée en enceinte de vieillissement ;
- (v) un chapitre présentant des études *in vivo* d'implantation chez le rat au travers d'une étude de faisabilité d'implantation puis d'un essai *in vivo* mené chez une vingtaine de rats.

L'ensemble des résultats de ces travaux de thèse a été résumé dans une conclusion générale qui permet d'ouvrir des perspectives très prometteuses au développement de ce futur implant ligamentaire bioactif, bio-intégrable et biodégradable orienté vers une nouvelle stratégie d'ingénierie tissulaire appliquée à la régénération du LCA mais aussi pourquoi pas à d'autres ligaments et tendons.

Chapitre I – Revue bibliographique

I-Partie 1 : Le ligament

I.1.1. Fonction et composition du tissu ligamentaire

Les ligaments sont des tissus conjonctifs fibreux de couleur nacré permettant de relier deux os entre eux afin d'assurer la stabilité et de contribuer à la mobilité des articulations. L'insertion du ligament dans l'os peut se faire (i) soit de manière directe, on aura alors à la suite du ligament, du fibrocartilage, du fibrocartilage minéralisé, puis de l'os ; (ii) soit de manière indirecte, des fibres superficielles seront attachées au périoste, membrane à la surface externe des os, et des fibres profondes seront directement attachées à l'os[1]. Ce tissu ligamentaire est à la fois solide et flexible. Ces deux caractéristiques sont possibles grâce à sa constitution. Le ligament est formé d'un réseau de tissu dense composé à environ 20% de cellules appelées fibroblastes, ou plus rarement ligamentocytes, enchevêtrées dans un réseau tridimensionnel de macromolécules et d'eau, formant la matrice extracellulaire (MEC).

A. Cellules constitutives

Comme tous les tissus conjonctifs, le tissu ligamentaire est composé majoritairement de cellules fibroblastiques. Les fibroblastes sont des cellules immatures, ou peu différenciées, issues des cellules souches mésenchymateuses (CSM) et ayant conservées leur capacité à se diviser[1]. Ces cellules possèdent une morphologie caractéristique dite « fusiforme » grâce à de longs prolongements cytoplasmiques et possèdent un cytoplasme étoilé (cf. Fig.1). Leur taille est comprise entre 20 et 70 μm de longueur et 5 à 10 μm de largeur. Leur noyau ovoïde contient de la chromatine peu condensée et leur cytoplasme basophile, particulièrement développé grâce à un réseau de microfilaments d'actine et de vimentine, contient de manière abondante des réticulums endoplasmiques rugueux, des ribosomes libres et des mitochondries[2], [3].

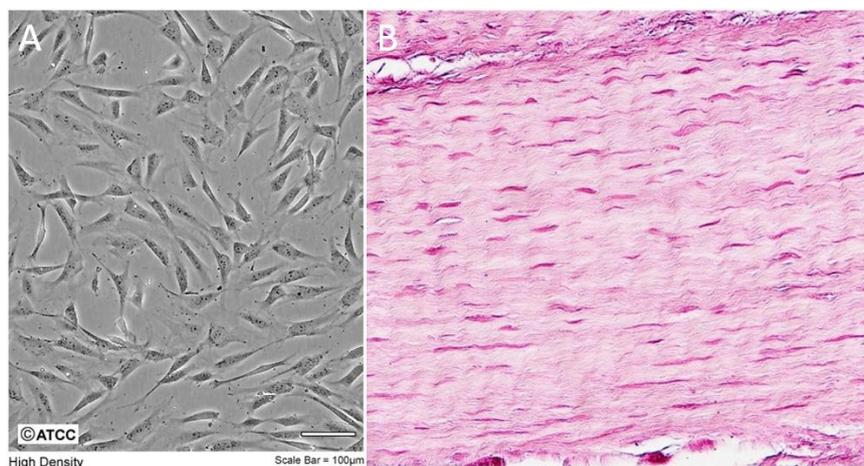


Figure 1 : (A) Cellules fibroblastiques issues de la lignée NIH3T3 observées au microscope à contraste de phase (source : site internet ATCC lignée CRL-1658) ; (B) Section histologique, colorée à l'hématoxyline et à l'éosine, de la reconstruction d'un ligament après 15 semaines de cicatrisation (GX400)[4]

Les fibroblastes sont des cellules jeunes et très actives, capables de se transformer par la suite en fibrocytes moins actifs mais pouvant être réactivés en cas de processus de réparation et de cicatrisation. Les fibrocytes sont légèrement plus petits que les fibroblastes et ont un aspect fusiforme non étoilé[3]. Leur noyau est plus condensé que les fibroblastes et leur cytoplasme éosinophile contient les mêmes organites mais en plus faible proportion (cf.Fig.2). La distinction entre fibroblaste et fibrocyte étant très minime, nous parlerons par la suite uniquement de fibroblaste.

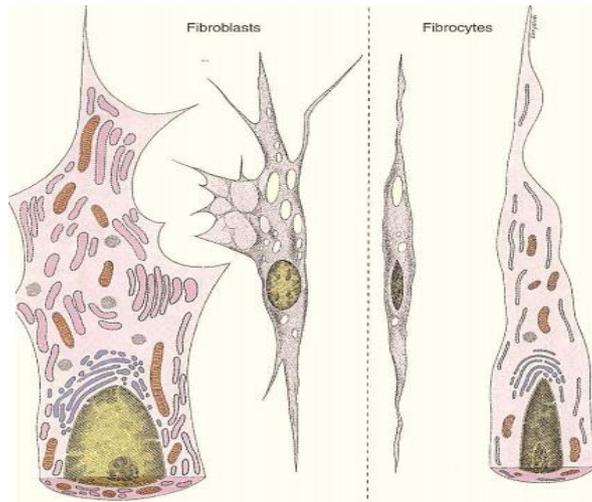


Figure 2 : Représentation schématique d'un fibroblaste (à gauche) et d'un fibrocyte (à droite) (source : <https://www.memorangapp.com/flashcards/49294/Connective+Tissue>)

Au sein des ligaments, les fibroblastes vont s'orienter dans le sens des fibres de la MEC et en particulier des fibres de collagène auxquelles ils sont liés (cf. Fig.3). Présentes en très faible quantité, ces cellules seront séparées les unes des autres par les constituants de la MEC, formant ainsi un réseau cellulaire jouant un rôle important dans les propriétés mécaniques du tissu.

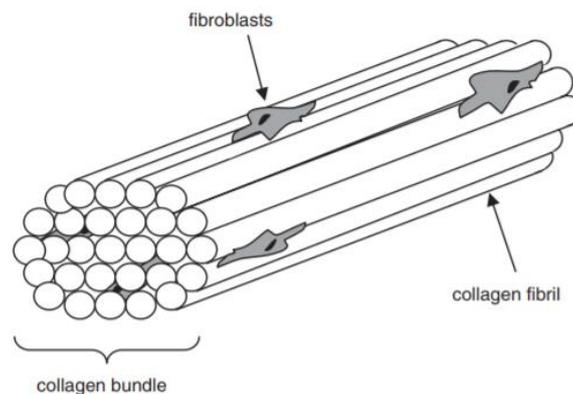


Figure 3 : Représentation schématique du positionnement des fibroblastes sur les fibres de collagène de la MEC[5]

Les fibroblastes ont un rôle essentiel de sécrétion et de renouvellement de la MEC. En effet, elles vont synthétiser toutes les macromolécules de la MEC, mais également des métalloprotéases capables de la dégrader afin d'assurer son renouvellement ainsi que des cytokines capable d'activer

le système immunitaire et la réponse inflammatoire[6]. De plus, les fibroblastes sont des cellules mécanosensibles qui vont donc être capables de répondre à un stimuli mécanique et ainsi assurer le maintien de l'équilibre entre synthèse et dégradation des constituants de la MEC[7]. À noter, qu'un déséquilibre en faveur de la sursécrétion des constituants de la MEC peut aboutir à une fibrose.

Enfin, de manière exceptionnelle, des cellules graisseuses, immunitaires ou nerveuses peuvent être retrouvées au niveau des ligaments, tout comme des cellules inflammatoires (neutrophile, macrophage ou lymphocyte) en cas de processus de cicatrisation.

B. Matrice extracellulaire

La matrice extracellulaire (MEC) constitue 80% du tissu ligamentaire et forme un réseau tridimensionnel autour des fibroblastes. Elle représente ainsi un support d'adhésion et de migration cellulaire, qui, suivant l'environnement des cellules, génère des signaux de survie, de prolifération, de synthèse moléculaire ou d'apoptose. Les macromolécules qui constituent la MEC, peuvent être séparées en trois catégories :

- Les protéines fibreuses à rôle structural : telles que le collagène et l'élastine ;
- Les polysaccharides : les glycosaminoglycanes (GAG) et les protéoglycanes tels que l'acide hyaluronique, la fibromoduline, la décorine, le lumican...etc ;
- Les glycoprotéines à rôle adhésif : telles que la fibronectine, la vitronectine, le facteur Von Willebrand, le fibrinogène, la laminine, la tenascine-C ou la thrombospondine.

A.1. Structure fibreuse

Les protéines fibreuses constituent une matrice de soutien assurant les propriétés mécaniques du ligament, à savoir une grande résistance à la traction et une élasticité inégalable grâce à l'association des fibres de collagène et des fibres élastiques.

Le **collagène** est le constituant majoritaire de la MEC du ligament. C'est la protéine la plus abondante du corps humain, représentant ainsi un tiers de la masse protéique totale[5]. Il existe 26 types de collagène différents en fonction de la taille, de la fonction et de la distribution tissulaire de cette protéine de structure supramoléculaire. Le collagène de type I est le plus commun dans le corps humain.

Le ligament est composé de collagène de type I, de type III et dans une moindre mesure de type V[7]. Le collagène de type I étant plutôt résistant et celui de type III étant plutôt élastique, leur abondance respective a une influence cruciale sur les propriétés mécaniques finales du tissu. La possibilité du collagène de moduler ses propriétés mécaniques est directement liée à la structure de la molécule.

En effet, les 3 types de collagène constitutifs du ligament font partie de la catégorie des collagènes fibrillaires. Les molécules de collagène fibrillaire sont issues de l'assemblage spontané d'une unité structurale, la molécule de **tropocollagène**, elle-même issue du **procollagène**. Les molécules de procollagène forment des fibres longues qui grâce à leur organisation et leur diamètre modulent la force et la rigidité de la structure. Le procollagène est une super-hélice constituée de trois chaînes α de polypeptides enroulées les unes autour des autres (cf. Fig.4). La séquence peptidique de base consiste en une répétition des acides aminés Glycine-Proline-Hydroxyproline. La petite taille de l'acide aminé de glycine permet un compactage serré des hélices de collagène tandis que la proline et l'hydroxyproline influencent la structure de la spirale, affectant ainsi la rigidité de la protéine[5]. Le collagène de type I possède deux chaînes α différentes sur ces 3 chaînes, tandis que le collagène de type III possède ces trois chaînes α différentes[5]. Pour tous les types de collagène fibrillaire, cette triple hélice d'environ 1000 acides aminés mesure 280 nm de long et 1,5 nm de diamètre.

Après sécrétion par exocytose du procollagène dans la MEC, cette triple hélice subit une scission de ses extrémités conduisant ainsi à la formation du tropocollagène. Les fibres de tropocollagène vont alors s'assembler en fibrilles à striation périodique (alternance de régions « gap » et de régions « overlap ») par auto-réticulation de la lysine[5]. Ces réticulations vont stabiliser les fibrilles de collagène et améliorer la résistance à la traction du tissu. Puis ces fibrilles vont s'assembler parallèlement pour former des fibres, des faisceaux primaires, des faisceaux secondaires et enfin un ligament (cf. Fig.4). Cette imbrication de structures parallèles permet une résistance mécanique à la force de traction le long de l'axe des fibres mais également un caractère élastique à la structure. Bien qu'intrinsèquement peu extensible, cette organisation en rangées parallèles légèrement ondulées d'une part et oblique d'autre part permet une certaine extensibilité de la structure et offre une capacité d'absorption des chocs[5].

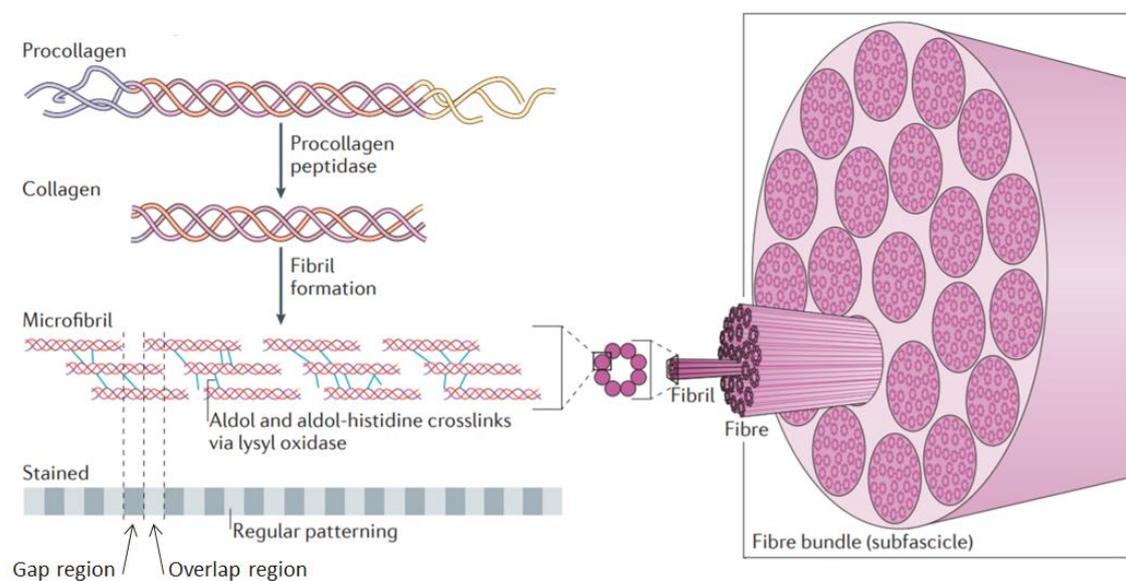


Figure 4 : Structure fibrillaire d'un ligament par assemblage de fibres de collagène[8]

La seconde origine de l'élasticité du tissu ligamentaire provient de la présence de **fibres élastiques** composées de macromolécules d'élastine et de fibrilline (cf. Fig.5). La biosynthèse de l'élastine est comparable à celle du collagène. Cependant, l'élastine est une protéine insoluble possédant une composition inhabituelle et très répétitive de séquences d'acides aminés hydrophobes[9]. En présence de molécules d'eau, il va y avoir mobilité des chaînes, ce qui va conférer de l'élasticité à la structure. Noyées dans cette matrice de molécules d'élastines réticulées entre elles, les molécules de fibrille vont s'organiser en microfibrilles alignées. Semblable à un matériau composite, cette architecture particulière ainsi que la réticulation de l'élastine, capable de se dérouler de façon réversible sous étirement, confèrent son élasticité à la fibre élastique ainsi formée.

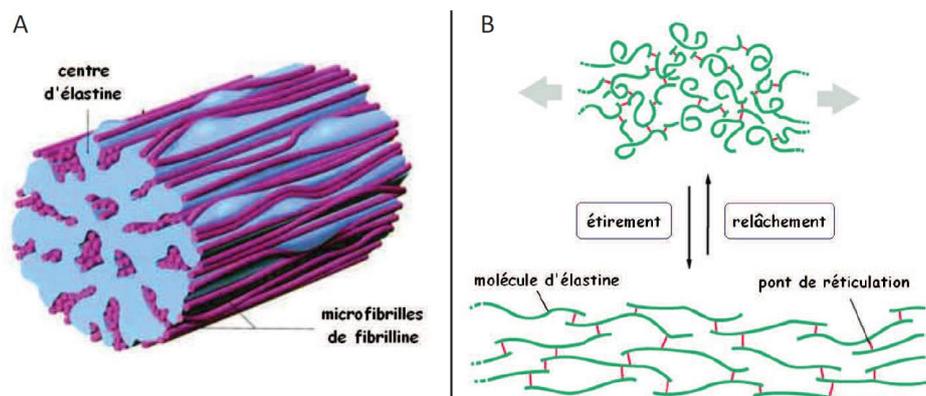


Figure 5 : Structure d'une fibre élastique (A) et de l'élastine (B) [10]

A.2.Substance fondamentale

Les glycoprotéines et les polysaccharides constituent la substance fondamentale amorphe. Cette substance fortement hydratée est semblable à un gel [1]; elle comble l'espace existant entre les fibres, stabilise l'ensemble de la structure et apporte une résistance en compression au tissu. Elle a aussi pour rôle de supporter et de relier les cellules les unes entre elles, servant ainsi de plateforme d'échange permettant le contrôle de l'activité métabolique des cellules.

Cette substance est principalement composée de glycosaminoglycanes (GAG) qui associés à une protéine vont former des protéoglycanes. Les protéoglycanes sont des macromolécules très hydrophiles qui vont attirer et piéger les molécules d'eau[7]. Cette hydratation va alors provoquer leur gonflement, ce qui va entraîner leur piégeage dans les fibres de collagène, lubrifiant ainsi la structure et permettant une augmentation de la résistance à la compression[5]. Par ailleurs, ce mécanisme va également permettre une diffusion rapide des molécules hydrosolubles et va apporter des propriétés viscoélastiques à la MEC. Les protéoglycanes les plus abondants dans les ligaments sont la décorine et l'aggrécane, particulièrement présents au niveau de la zone du tissu la plus soumise à des forces de compression[5].

La substance fondamentale contient également des glycoprotéines qui ont un rôle essentiel dans l'adhésion des cellules aux composants de la MEC. Parmi les plus importantes, on peut citer la **fibronectine**, qui permet l'adhésion des fibroblastes aux fibres de collagènes de la matrice par l'intermédiaire des intégrines (famille de protéines membranaires)[5].

La fibronectine est une des protéines de la MEC les plus étudiées car elle joue un rôle central dans différents processus, tels que :

- a) des processus cellulaires : adhésion (aussi bien sur supports synthétiques que sur la MEC), communication intra et extra cellulaire, prolifération, différenciation, apoptose...
- b) des processus physiologiques: cicatrisation, thrombose...
- c) des processus pathologiques : métastase, artériosclérose, infections bactériennes, arthrite rhumatoïde...

Enfin, on peut également souligner le rôle de la **ténascine-C**, qui se retrouve surexprimée en cas de sollicitation mécanique. Cette protéine va moduler l'activité de facteurs de croissance et ainsi inhiber l'adhésion des cellules par la voie des intégrines $\beta 1$. Cette protéine a donc un effet antiadhésif qui limite l'attachement des cellules à la fibronectine. La ténascine-C est trouvée en plus grande quantités dans les ligaments et les tendons que dans les autres tissus ostéoarticulaires, ce qui fait d'elle, un marqueur spécifique de ces tissus[5].

I.1.2. Anatomie et physiologie

A. Le genou

Le genou permet de supporter le poids du corps et facilite la locomotion de l'être humain. Il s'agit de la structure articulaire la plus large du système musculo-squelettique, comportant dans les faits, deux articulations distinctes : l'articulation tibio-fémorale et l'articulation patello-fémorale[11]. Ce système articulaire assure la liaison entre le fémur, légèrement oblique, et le tibia, quasiment vertical, avec un angle naturel de 170° à 175° en externe, appelé également « valgus » physiologique.

L'articulation tibio-fémorale, qui est une articulation synoviale, est l'une des plus complexes du corps car elle fait intervenir (cf. Fig.6):

- trois os différents : le fémur, le tibia et la patella (ou rotule) ;
- du cartilage articulaire : deux condyles et deux ménisques ;
- six ligaments (cf. Fig.7) : un ligament collatéral médial, trois ligaments collatéraux latéraux (le ligament antéro-latéral mis en évidence récemment par *Claes et al.* [12], le ligament collatéral latéral et le ligament poplitéo-fibulaire), un ligament croisé antérieur (LCA) et un ligament croisé postérieur (LCP).

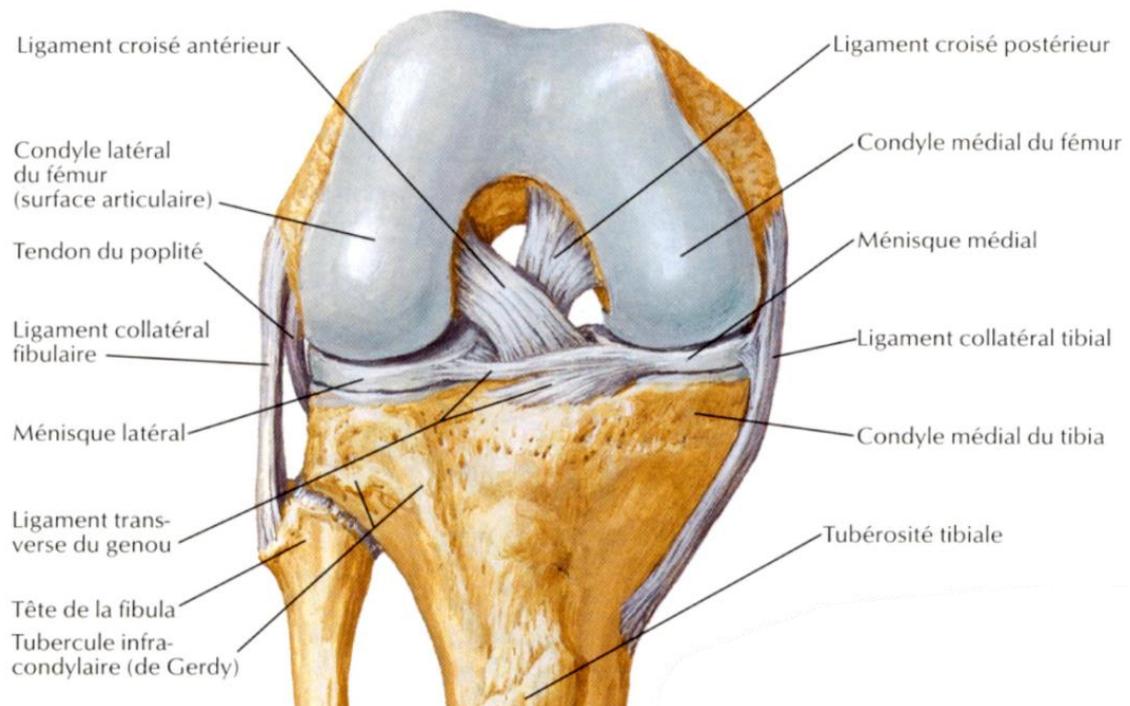


Figure 6 : Articulation tibio-fémorale d'un genou droit en flexion – vue antérieure [13]

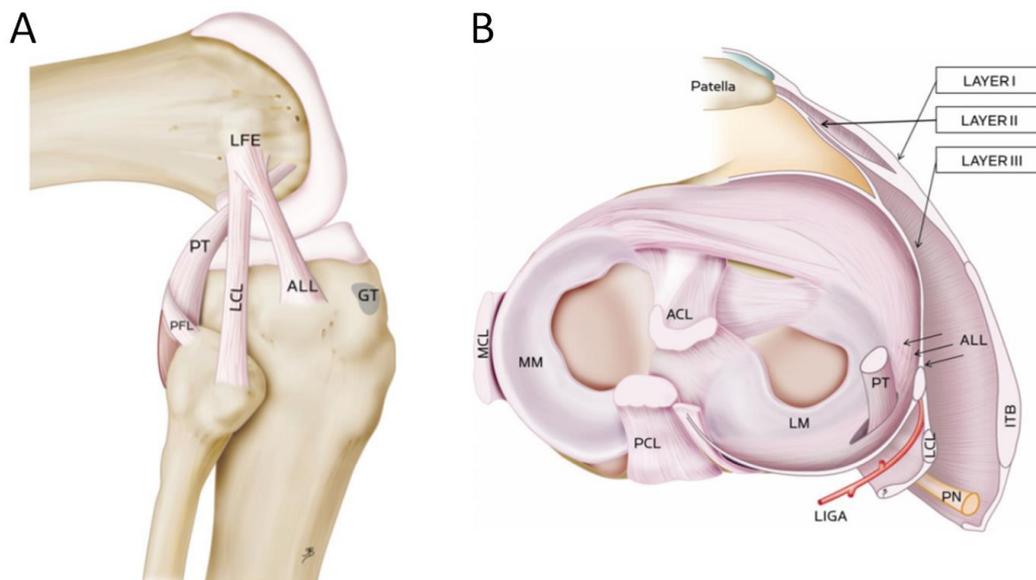


Figure 7 : Structure ligamentaire du genou. A. Genou en flexion à 90° ; B. Vue axiale d'un genou droit au-dessus de la surface méniscale. ALL = ligament antéro-latéral ; LCL = ligament collatéral latéral ; PCL = ligament croisé postérieur ; ACL = ligament croisé antérieur ; LM = ménisque latéral ; MM = ménisque médial ; MCL = ligament collatéral médial ; PFL = ligament poplitéo-fibulaire[11]

Le fémur sur sa partie distale présente deux fortes protubérances qui sont recouvertes de cartilage articulaire appelés condyles. En opposition se présente la partie proximale du tibia ayant une forme de plateau. Entre les deux, deux ménisques en forme de croissant et composés de fibrocartilage, viennent compenser les inégalités et les vides, et amortir le contact entre les surfaces articulaires du fémur et du tibia et ainsi permettre une meilleure répartition de la force dans le genou. L'ensemble

des ligaments vient alors stabiliser cette articulation. Les ligaments latéraux s'occupent de la stabilité du genou sur le plan médial et latéral. Les ligaments croisés eux stabilisent le genou contre les mouvements de translation du tibia qui peuvent se produire dans le plan sagittal[1].

B. Le ligament croisé antérieur

B.1. L'orientation des fibres et leur insertion osseuse

Le ligament croisé antérieur (LCA) est composé de multiples faisceaux de collagène qui relie le fémur au tibia à travers une interface ligament-fibrocartilage-os, appelée insertion directe[14]. Il s'agit d'un ligament intracapsulaire mais extra-synovial dont l'origine commence à la surface médiale du condyle fémoral latéral sur 2 cm² et se dirige vers l'avant en diagonale pour s'insérer en dedans de la crête inter-tuberculaire tibiale médiale sur 2,5 à 3 cm². On peut appeler cette orientation distalo-antéro-médiale. Ainsi l'insertion tibiale est plus forte et plus large que la fémorale et l'on constate par ailleurs une torsion des fibres de collagène sur elles-mêmes de 90° lors d'une flexion de 140° du genou[15]. L'angle d'inclinaison global du LCA par rapport au plateau tibial, et donc son insertion au niveau fémorale, est de $74^\circ \pm 5^\circ$ dans le plan coronal et de $47^\circ \pm 5^\circ$ dans le plan sagittal (cf.Fig.8)[16].

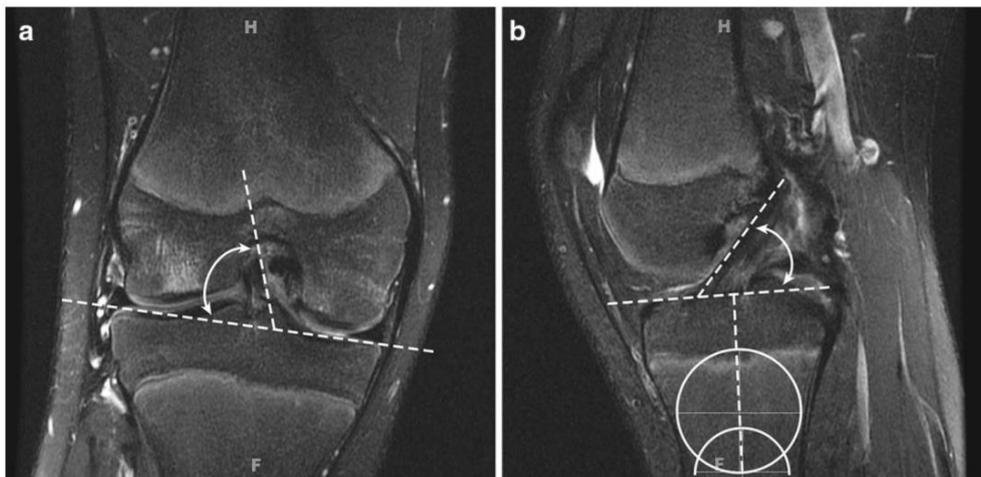


Figure 8 : Genou observé en IRM, exemple de mesure d'angle (a) sur le plan coronal (b) sur la plan sagittal.[16]

D'un point de vue dimensionnel, le LCA varie de 23 à 45 mm en longueur, avec une moyenne de 33 ± 4 mm, et possède une largeur comprise entre 5 à 13 mm, avec une moyenne de 8 ± 2 mm[17]. Il est à noter que la largeur du LCA n'est pas uniforme sur toute sa longueur avec un diamètre plus petit en son centre qu'au niveau de ses insertions osseuses.

Composé à 90% de collagène de type I et à 10% de collagène de type III, le ligament croisé antérieur n'est pas qu'une simple bande de tissu ligamentaire[18]. En effet, plusieurs études scientifiques s'accordent à dire qu'il peut être divisé en deux faisceaux fonctionnels, dénommés suivant leur site d'insertion tibiale, le faisceau antéro-médial (AM) et le faisceau postéro-latéral (PL)[19], [14], [15]. Le

faisceau AM part de la partie proximale du site d'insertion fémorale du LCA pour s'insérer dans la portion antéro-médiale du plateau tibial, alors que le faisceau PL part de manière plus proximale sur le fémur pour atteindre une position plus postéro-latérale sur le tibia. À partir de 60° de flexion du genou, le faisceau AM va être tendu tandis que le faisceau PL sera relâché, et inversement lors de l'extension, et cela avec une torsion des fibres de collagène qui les constituent. Ces deux faisceaux seront donc parallèles dans le plan sagittal lors d'une extension totale du genou (cf. Fig 9.A), et croisés lors d'une flexion (cf. Fig 9.B).

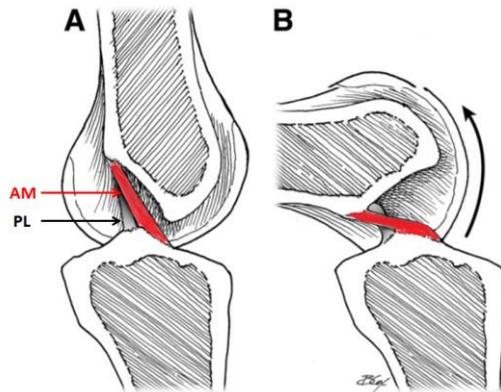


Figure 9 : Vues sagittales des faisceaux du LCA (A) en hyper-extension (B) en flexion. [14]

Cette double structure ainsi que l'orientation particulière du LCA à l'intérieur de l'articulation, va permettre au LCA d'être le frein principal à la translation antérieure tibiale et à la rotation interne du genou[19].

B.2. La vascularisation

L'articulation du genou est partiellement divisée dans le plan sagittal par une membrane synoviale qui n'enveloppe pas les ligaments croisés. Cependant, grâce à l'échancrure inter-condylienne du fémur, et de par son inclinaison dans le plan sagittal, le LCA se retrouve recouvert par un repli de la membrane synoviale (cf. Fig 10). Or cette membrane est richement vascularisée par des vaisseaux issus de l'artère géniculée moyenne à partir desquelles naissent des branches pénétrant transversalement le ligament et s'anastomosant avec les faisceaux de collagènes[14], [19]. Ceux-ci s'orientent alors longitudinalement et dans l'axe des fibres, et forment ainsi un réseau péri-ligamentaire qui assure la nutrition de l'ensemble du ligament. Toutefois, cette nutrition n'est pas homogène. En effet, la partie proximale du ligament reçoit beaucoup de sang tandis que la région fibro-cartilagineuse de la partie antéro-médiale est considérée comme avasculaire[20]. En effet, les zones fibro-cartilagineuse du LCA n'ont pas de vaisseaux sanguins issus de leurs insertions osseuses, il n'y a donc pas de pénétration vasculaire de l'os sous-chondral. De ce fait, la vascularisation du LCA est essentiellement originaire des tissus mous avoisinants, sa nutrition se faisant par diffusion à partir du liquide synovial.

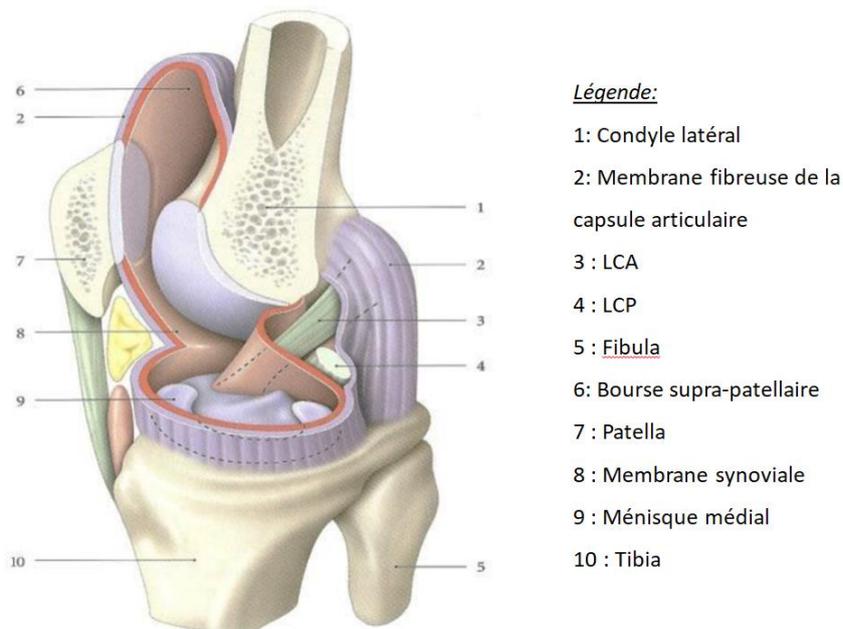


Figure 10 : Articulation du genou avec résection du condyle médial. Représentation schématique de la position intracapsulaire mais extra-synoviale des ligaments croisés.[21]

B.3. L'innervation

Les fibres articulaires du nerf tibial assurent l'innervation du LCA. Au niveau postérieur de la capsule synoviale, et au côté des vaisseaux péri-ligamenteux, on retrouve des ramifications nerveuses qui s'infiltrèrent dans l'articulation. Sous la membrane synoviale, à la surface du ligament, la présence de mécanorécepteurs a été montrée. Ces récepteurs sont classés suivant leur adaptabilité aux signaux qu'ils reçoivent. Au sein du LCA, il a été identifié : (i) des mécanorécepteurs dits « lents » (Ruffini et Pilo-Ruffini) qui présentent une activité continue en réponse aux changements de mouvement, de position et d'angle de rotation de l'articulation[19] ; et (ii) des mécanorécepteurs dits « rapides » (Pacinni) qui sont les indicateurs les plus sensibles des changements de tension dans le ligament, ils identifient la vélocité et sont excités quelle que soit la position de l'articulation[22]. Enfin, un petit nombre de terminaisons nerveuses libres ont été identifiées. Ces terminaisons agissent comme nocicepteurs et sont responsables de la transmission d'impulsions de la douleur et peuvent également jouer un rôle dans le contrôle vasomoteur. L'ensemble de ce tissu neural occupe 1% de la surface du LCA[20].

I.1.3. Biomécanique du ligament

A. Propriétés mécaniques du LCA

Avant toutes choses, il est important de rappeler quelques notions de mécanique. Le LCA peut être décrit d'après les paramètres suivant :

- la **déformation**, qui transcrit l'allongement du ligament par rapport à sa longueur initiale suite à une sollicitation mécanique ;
- la **contrainte**, qui correspond à la force appliquée sur le LCA par rapport à sa section transversale ;
- la **rigidité**, qui est le changement de la longueur du LCA par rapport à la force appliquée ;
- le module d'élasticité, ou **module d'Young**, qui décrit la relation entre la contrainte et la déformation et qui traduit les propriétés intrinsèques du LCA. Plus le module d'élasticité est élevé plus le tissu est rigide.

Dans la plupart des cas, le LCA est naturellement sollicité suivant son axe longitudinal. La caractérisation de ce tissu a donc essentiellement lieu grâce à des essais de traction à rupture ou en fatigue. Lors d'un essai de traction à rupture, la courbe de contrainte en fonction de la déformation du LCA peut être décrite suivant trois phases : (i) la « toe region », (ii) le domaine élastique et (iii) le domaine plastique (cf. Fig.11)[23].

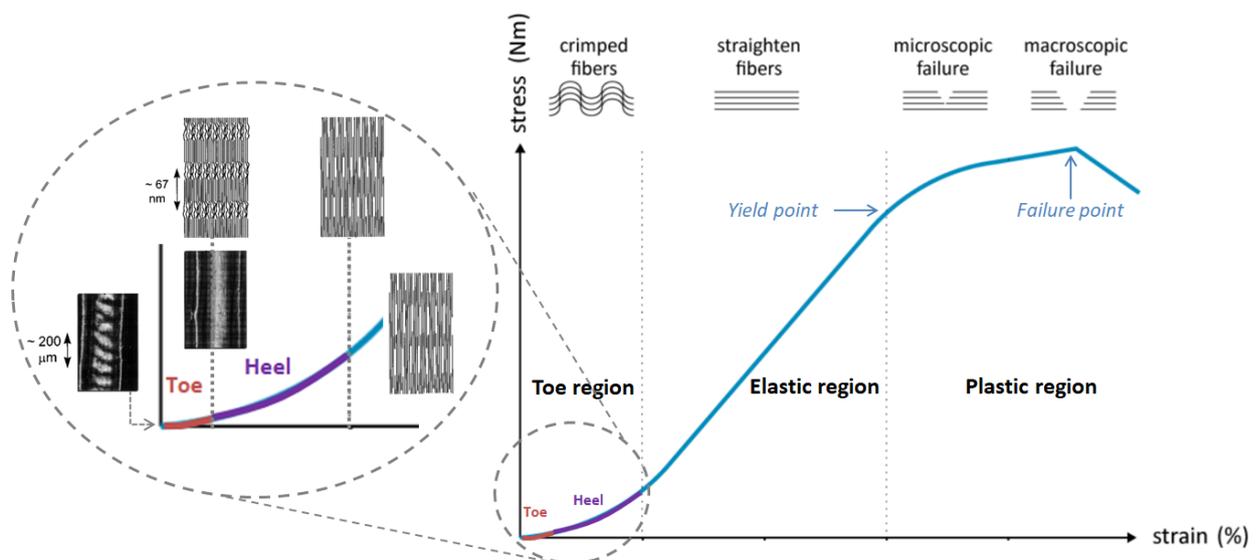


Figure 11 : Courbes contrainte-déformation d'un ligament croisé antérieur humain (modifiées d'après[24], [25])

La différence entre ces régions peut être expliquée par l'étude des mécanismes microstructuraux qui interviennent. En effet, comme évoqué au paragraphe I.1.1., le ligament est composé de plusieurs éléments (collagène, élastine, protéoglycanes, substance fondamentale, molécules d'eau...etc) assemblés dans une structure géométrique complexe allant des fibres de tropocollagène (échelle de l'Angström) jusqu'à un niveau fibrillaire (échelle du centimètre). Les déformations du LCA vont donc être médiées par les déformations de cette structure à différents niveaux.

Le premier domaine de faibles déformations, appelé « **toe region** », de la courbe contrainte-déformation du LCA peut être divisée en deux parties d'après *Fratzl et al* [24]. La première partie

correspondant à une faible contrainte par unité de déformation, coïncide avec l'alignement macroscopique de la structure ondulée des fibres de collagène. Comme un ressort de faible raideur, ces fibres vont se tendre assez facilement, ce qui explique que cette partie de la courbe montre une faible contrainte pour une déformation relativement importante à cette échelle. La seconde partie de ce domaine, appelée « heel region », voit sa contrainte augmenter de manière quasiment exponentielle par rapport à sa déformation. La force appliquée au ligament va être transférée aux fibrilles de collagène qui vont se contracter latéralement et donc se tendre elles aussi. Cette élongation va être possible grâce à un changement structural de ces fibrilles. Pour rappel, celles-ci sont composées de fibres de tropocollagène qui s'organisent de manière parallèle mais avec une alternance de zones de chevauchement (« overlap region ») et de zones de creux (« gap region ») (cf. Fig.4). À ce niveau fibrillaire, il va alors y avoir un étirement des défauts moléculaires au niveau des « gap regions », entraînant une diminution de l'entropie, ayant pour conséquence une élongation des fibrilles. Or c'est cette entropie qui fournit la force allant contre l'allongement du ligament. Ces forces entropiques diminuant avec la disparition des défauts structurels, on retrouve cette allure typique exponentielle de la « toe region ». Enfin, ce sont ces zones de creux qui vont être touchées en premier car elles possèdent un niveau plus faible de proline et d'hydroxyproline et ont donc une densité de compactage augmentée par rapport aux zones de chevauchement[24].

Le second domaine de cette courbe contrainte-déformation est le **domaine élastique**. Étant donné que les fibres de collagène sont tendues à leur maximum, et que l'ensemble des défauts sont étirés, le mécanisme entropique décrit plus tôt n'est plus possible. La force appliquée sur le ligament est alors maintenant transférée à la triple hélice des molécules de tropocollagène. Un glissement interfibrillaire se produit entre les réticulations, ce qui entraîne une élongation de ces fibres, se traduisant par une augmentation linéaire de la contrainte par unité de déformation[24]. Dans ce domaine, si le ligament est relâché mécaniquement, il retrouvera sa longueur initiale : on parle de déformation réversible, ou d'élasticité linéaire. Le module d'Young va pouvoir être calculé sur cette partie de la courbe.

Enfin, le dernier domaine de cette courbe est le **domaine plastique**. Tout au long de l'augmentation de la force appliquée, le LCA a modifié l'ensemble de ces nombreux niveaux structurels afin d'absorber cette contrainte. Toutefois, au-delà d'une certaine force, il va y avoir rupture des réticulations intramoléculaires des fibres de collagènes, entraînant des microfissures. L'accumulation de ces dernières va entraîner l'affaiblissement des fibres - on parle de « défibrillation- ; une diminution de la rigidité sera enregistrée et les fibres, et donc le ligament, vont casser[26].

Grâce à cette organisation structurale à plusieurs niveaux, le LCA est considéré comme isométrique. En effet, comme nous venons de le voir il permet une distribution de la force appliquée sur l'ensemble des fibres, maximisant ainsi sa résistance mécanique. C'est cette structure particulière ainsi que la composition en deux faisceaux (AM et PL) qui permet au LCA de supporter une charge élevée à tous les degrés de mouvement de l'articulation du genou. De plus, cet assemblage géométrique de fibrilles disjointes incorporées dans une substance amorphe, permet à la pression exercée de faire en sorte que le fluide s'échappe de la structure, ce qui ajoute un comportement viscoélastique crucial au LCA[27].

Le comportement **viscoélastique** peut être caractérisé par des essais de fluage et/ou des essais de relaxation. Les essais de fluage permettent d'identifier une potentielle déformation de l'échantillon sous une charge constante appliquée. Pour un matériau purement élastique par exemple, aucune élongation n'est mesurée et cela quelle que soit la durée d'application de la charge. Les essais de relaxation permettent eux d'étudier, sous une déformation constante, la réponse de l'échantillon à la contrainte exercée. Lorsqu'un matériau viscoélastique est chargé et déchargé, la courbe de déchargement est différente de la courbe de chargement. C'est ce qu'on appelle une hystérésis. L'aire entre les deux courbes représente la quantité d'énergie dissipée ou perdue lors du chargement[7]. De nombreuses études ont été menées afin de mettre en évidence le caractère viscoélastique du LCA[28]–[31]. Il a été estimé que le LCA natif, suivant l'âge du patient, peut résister à des charges cycliques d'environ 300 N sur une durée de 1 à 2 millions de fois par an. D'autres calculs ont permis d'estimer que le LCA est régulièrement soumis à des forces allant de 67 N lors de la montée d'un escalier à 630 N lors d'un jogging[32]. Les principales propriétés mécaniques du LCA sont résumées dans le Tableau 1.

Propriétés	Valeurs	Moyenne	Références
Longueur (mm)	27 à 32 mm	32 ± 4,5 mm	Freeman et al. 2006
	31 à 38 mm		Karmani and Ember. 2003
Déformation de la toe région	2,0% à 4,8%	3,1 ± 1,6%	Chen and Black. 1980
	1,5% à 4,0%		Karmani and Ember. 2003
Déformation à endommagement	7% à 16%	12,0 ± 4,2%	Chen and Black, 1980
	10% à 15%		Karmani and Ember. 2003
Déformation à rupture	Homme : 24 à 36%	28,5 ± 8,4%	Chandrashekar et al., 2006
	Femme : 19 à 35%		
Allongement à rupture	Homme : 6,8 à 11 mm	8,2 ± 2,8 mm	Chandrashekar et al., 2006
	Femme : 4,9 à 10 mm		

Propriétés	Valeurs	Moyenne	Références
Charge à rupture	Homme : 1119 à 2517 N	1799 ± 604 N	Chandrashekar et al., 2006
	Femme : 739 à 1793 N		Karmani and Ember. 2003
	1725 à 2195 N		Woo et al. 1991
	2000 à 2300 N		
Contrainte à rupture	Homme : 16,3 à 36,4 MPa	24,5 ± 11,2 MPa	Chandrashekar et al., 2006
	Femme : 13,7 à 31,5 MPa		
Rigidité	Homme : 219 à 397 N/mm	249 ± 95 N/mm	Chandrashekar et al., 2006
	Femme : 111 à 287 N/mm		Woo et al. 1991
	210 à 270 N/mm		
Module d'Young	Homme : 93 à 163 MPa	114 ± 53 MPa	Chandrashekar et al., 2006
	Femme : 49 à 149 MPa		

Tableau 1: Propriétés mécaniques du LCA humain[23]

B. Cinématique et cinétique du genou

B.1. Situation normale

Lors d'une activité physique quotidienne telle que la marche ou la montée d'un escalier, notre genou est sollicité en flexion et en extension. L'angle de flexion sera d'environ 30° au cours de la marche, contre 60° à 135° lors de la montée d'un escalier, suivant la hauteur de la marche (cf. Fig.12)[33]. Pour réussir à effectuer ces mouvements, notre articulation est entre autres renforcée par deux muscles antagonistes : le quadriceps (situé sur le devant de la cuisse) et le muscle ischio-jambier (situé à l'arrière de la cuisse). Ces muscles viennent exercées des forces de cisaillement sur notre articulation, les plus fortes étant celles provenant du quadriceps via le tendon rotulien. Ce sont ces forces de cisaillement antérieur et postérieur qui traduisent le fémur sur le tibia et que le LCA doit restreindre au quotidien[1].

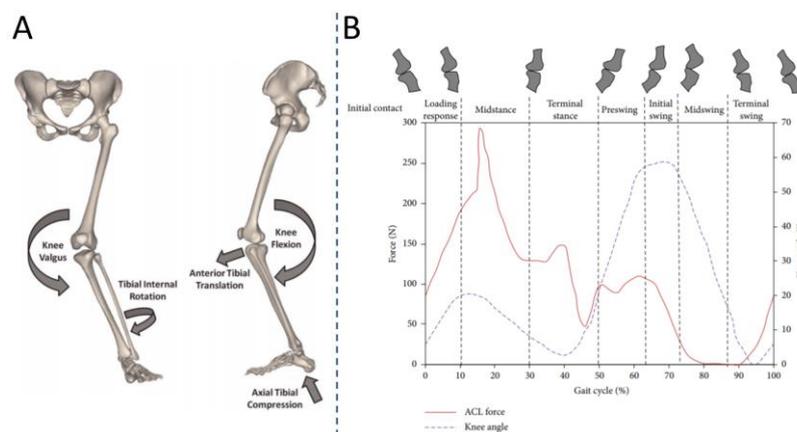


Figure 12 : (A) Mécanisme de chargement du LCA[34]. (B) Forces agissant sur le LCA pendant la simulation du cycle de la marche et les changements de l'angle du genou associés[1]

B.2. Situations à risque entraînant la rupture du LCA

La rupture du LCA intervient lors d'un mouvement anormal pour le genou et peut provenir de quatre situations différentes : (i) une hyper-torsion du tibia, (ii) une hyper-extension des ligaments croisés, (iii) une hyper-flexion ou (iv) un choc latéral entraînant une valgus rotation (cf. Fig.12.A et 13). L'hyper-torsion du tibia arrive généralement lors d'un changement de direction brutal et avec une légère flexion du genou. L'hyper-extension a lieu lorsque le tibia est propulsé en avant par rapport au fémur. L'hyper-flexion peut survenir à la réception d'un saut sur une jambe en flexion complète. Enfin, le choc latéral intervient le plus souvent de l'extérieur vers l'intérieur du genou, et peut, en plus de rompre le LCA, provoquer des lésions du ménisque interne et du ligament collatéral médial[35]. Cependant, 70% des lésions du LCA se produisent sans coup direct sur l'articulation[36]. Les mécanismes de lésion sans contact du LCA sont de nature multi-planaire et impliquent l'articulation dans les trois plans anatomiques. Le pire scénario étant celui qui combine, sous chargement, le cisaillement antérieur du tibia, le valgus du genou et la rotation tibiale interne (cf. Fig.12.A). Certaines études supposent que la principale cause de ces mouvements anormaux serait un déficit de contrôle neuromusculaire, engendrant une charge articulaire excessive, ce qui conduirait à l'application d'une contrainte anormale sur le LCA entraînant sa rupture[37], [38].

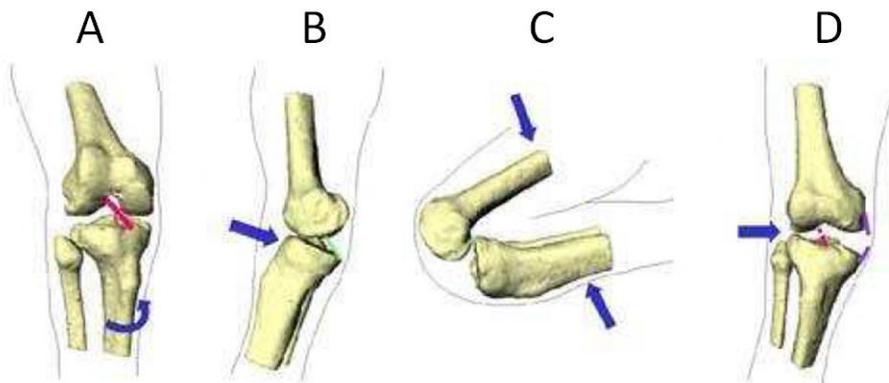


Figure 13 : Cas de rupture du LCA. (A) torsion axiale (B) hyperextension (C) hyperflexion (D) choc latéral[35]

Bien que l'ensemble de la population soit touché par ce problème, la population jeune et active est la plus concernée. En effet, les lésions du LCA décrites précédemment interviennent principalement lors de la pratique d'un sport, tel que le ski, le football, l'athlétisme...etc. Par ailleurs, les femmes sont plus touchées que les hommes. De nombreuses études ont désormais démontré que le risque d'une blessure du LCA était deux à trois fois plus élevé chez les femmes que chez les hommes pour la pratique du même sport[39]–[41]. De plus, le LCA est l'un des ligaments du genou le plus fréquemment blessé, avec une prévalence de 1 pour 3000 habitants aux Etats-Unis, soit plus de 120 000 reconstructions chirurgicales par an[34]. En plus de la douleur liée à la blessure du LCA, les patients sont confrontés à des conséquences à long terme, telles qu'une diminution du niveau de

leur activité sportive, un risque élevé de récurrence et des séquelles cliniques comprenant des déchirures méniscales, des lésions chondrales et un risque accru d'arthrose post-traumatique précoce[37]. Le coût estimé du traitement des patients ayant un LCA blessé aux États-Unis est de plus de 1,7 milliard de dollars par an, et cela sans prendre en compte le coût des complications à long terme[34].

I-Partie 2 : La reconstruction du LCA

I.2.1. Processus de cicatrisation spontanée

La réparation d'un ligament après sa rupture va dépendre de plusieurs facteurs. Certains ligaments, tel que le ligament collatéral médial (LCM), ont un bon potentiel de cicatrisation, tandis que d'autres, comme le LCA, ont de faibles chances de guérison après une rupture totale[42]. Plusieurs hypothèses sont évoquées pour expliquer l'incapacité du LCA à cicatriser spontanément, telles que (i) un déficit en cellules fibroblastiques intrinsèque au LCA ; (ii) un manque de vascularisation ; (iii) ou des facteurs environnementaux locaux. Parmi ces derniers, on pourra citer, par exemple, le fait qu'en cas de rupture totale, les deux extrémités de ligament vont se rétracter et donc ne seront plus à proximité l'un de l'autre ; ou encore que ces extrémités vont baigner dans le liquide synovial, qui en temps normal sert à lubrifier l'articulation, mais qui ici va laver le caillot sanguin qui pourrait éventuellement se former et qui normalement permet la réparation du ligament[43]. Compte-tenu de ces difficultés, l'étude du processus de cicatrisation des ligaments dans la littérature est plutôt menée sur le LCM. Cependant, Murray et al.[43], ont montré que les cellules issues de LCM et de LCA blessés avaient des taux de prolifération similaire et que les fibroblastes et la vascularisation du LCA étaient capables de montrer une même réponse fonctionnelle de guérison que celle du LCM. Cette étude valide donc la transposition du mécanisme de cicatrisation du LCM au LCA. Ainsi, de manière générale, la cicatrisation d'un ligament peut être résumée en trois phases séquentielles se chevauchant : une phase d'inflammation, une phase de réparation et une phase de remodelage (cf. Fig.14)[42].

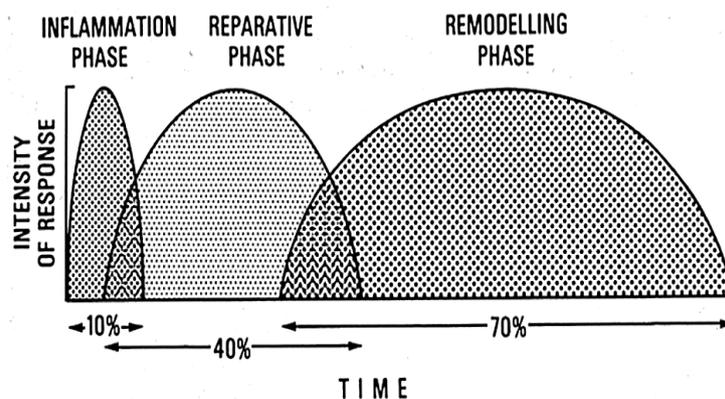


Figure 14 : Les 3 phases de la cicatrisation [44]

A. Saignement et réponse inflammatoire

Lorsqu'une blessure intervient, si celle-ci n'est pas prise en charge correctement immédiatement avec une mise au repos du genou, de la glace, une compression et une élévation, il va y avoir un saignement incontrôlé et un œdème au niveau de l'articulation du genou. Cela va avoir pour conséquence, un réarrangement anormal des fibres de collagène résultant en un tissu cicatriciel devenant hypertrophique, rigide et douloureux. En effet, une analyse quantitative des fibrilles de collagène a montré que l'immobilisation précoce du genou dans les 3 premières semaines pourrait nuire à l'orientation du collagène, alors qu'après cette période, l'immobilisation augmenterait la résistance à la traction du ligament réparé[45].

Néanmoins, même si la blessure est bien prise en charge, une phase d'inflammation apparaîtra dès les premières heures après la lésion et cela pendant plusieurs jours voire plusieurs semaines. Cette première phase de cicatrisation est la réponse cellulaire la plus précoce de l'organisme et consiste en l'accumulation de neutrophiles, de monocytes/macrophages et de lymphocytes T. Cet afflux de cellules immunitaires va permettre de débarrasser les tissus lésés des débris et va provoquer la sécrétion de cytokines qui auront un rôle majeur dans la régulation du processus de cicatrisation. Au cours des dernières phases de l'inflammation, un tissu de granulation va se former. Riche en vaisseaux et en cellules, ce tissu permet le début de l'organisation d'un nouveau tissu conjonctif. Il va alors se dilater afin de remodeler la matrice extracellulaire résiduelle (MEC) et ainsi combler la perte de substance tissulaire[46].

B. Réparation et remodelage

La phase de réparation suit la phase inflammatoire, et dure plusieurs semaines à plusieurs mois. Pendant cette phase, une accumulation de liquide dans le ligament et les tissus environnant la blessure est observée. Fibroblastes, myofibroblastes, cellules endothéliales et macrophages supplémentaires envahissent le tissu de granulation afin de reconstruire un tissu mature. Dans un premier temps, les fibroblastes se divisent et synthétisent des protéoglycanes qui serviront de matrice à l'élaboration des fibres collagène[46]. Puis le taux de synthèse du collagène atteint son apogée environ 3 semaines après l'apparition de la lésion. Toutefois, au fur et à mesure de la cicatrisation, le procollagène de type I diminue alors que le collagène de type III augmente. Ce dernier permet de reconstruire rapidement un tissu temporaire faible[47].

Le remodelage est la phase finale de la cicatrisation, phase critique de récupération fonctionnelle, elle peut durer de plusieurs mois à plusieurs années. Durant cette phase, la quantité de fibroblastes, de cellules inflammatoires et de cellules endothéliales diminue à un niveau basal et la teneur en eau revient à la normale[48]. À mesure que le remodelage se poursuit, le tissu cicatriciel se développe et

le rapport entre le collagène de type I et le collagène de type III se normalise, améliorant la résistance à la traction du néo-tissu[46]. Les fibres de collagène commencent également à s'aligner parallèlement et leur réticulation se produit marquant ainsi la maturation du tissu. Le tissu cicatriciel se rapproche lentement des propriétés des tissus normaux, mais le ligament ne revient jamais complètement à son état initial. Il va y avoir une augmentation du nombre de fibrilles de collagène du ligament cicatrisé, mais le diamètre de ces fibrilles est plus petit que ceux d'un ligament normal. De plus, la cicatrisation du LCA est souvent limitée par une faible vascularisation. Ainsi, même après 1 an de remodelage, le ligament cicatrisé n'a pas encore des propriétés mécaniques comparables au ligament natif et ses constituants sont anormaux (quantité accrue de protéoglycanes, apport plus élevé entre le collagène de type V et le collagène de type I, diminution du nombre de réticulations de collagènes matures...)[49]. Le profil du ligament cicatrisé est plus proche de la normale que lors des précédentes phases, mais une récupération complète peut ne jamais se produire.

Cette cicatrisation spontanée est possible en cas de rupture partielle du LCA. Dans ce cas on parle de reconstruction non chirurgicale, et l'emploi d'orthèse afin d'immobiliser l'articulation, ainsi qu'une rééducation intense, sont d'usage. Ce processus d'autoréparation a également été utilisé au tout début de la chirurgie ligamentaire en suturant simplement les deux extrémités de LCA rompu. Cependant, les résultats peu concluants de cette méthode ont engendré le développement de techniques de reconstruction chirurgicale plus complexes telles que la ligamentoplastie ou encore la pose de ligament synthétique.

1.2.2. Reconstruction chirurgicale

A. Reconnaître l'instabilité

La mise en évidence de la rupture du LCA passe par l'examen clinique du patient. Deux cas de figure sont possibles : (i) la rupture du LCA est aiguë ou (ii) le patient présente une instabilité chronique suite à une rupture ancienne du LCA. Dans le premier cas un craquement est souvent audible, la douleur est importante et accompagnée d'un gonflement de l'articulation, ce qui engendre une impotence fonctionnelle totale. Dans le second cas, il n'y a pas de craquement audible, le patient ne se plaint pas nécessairement de douleur, il n'y a qu'un faible gonflement et l'impotence est partielle. Le praticien va alors devoir déterminer si la rupture du LCA est totale et si elle nécessite une prise en charge chirurgicale. Pour commencer, un examen de palpation, pour localiser les douleurs du patient et évaluer l'intégrité osseuse, est réalisé. La rupture du LCA se caractérise par une douleur postérieure en barre. Puis des examens de la mobilité de l'articulation du genou sont réalisés, ainsi qu'une étude de la laxité articulaire, avec notamment un test de Lachman, un test de recherche de tiroir antérieur et un test de recherche d'un ressaut rotatoire[50].

Le test de Lachman consiste à rechercher une translation anormale du tibia par rapport au fémur, ce qui indiquerait une lésion du LCA. Pour ce faire, le patient est allongé sur le dos, jambe fléchit entre 0 et 30°, muscles relâchés, l'examineur vient alors empoigner d'une main l'extrémité distale du fémur, de l'autre main l'extrémité proximale du tibia, puis réalise une traction vers l'avant sur le segment jambier tout en immobilisant la cuisse[50]. Cet examen est comparatif et doit être réalisé sur les deux genoux. L'absence ou la présence d'une translation antérieure du tibia, ainsi que la nature de l'arrêt du déplacement, mou ou dur, permettent de dégager un premier diagnostic de rupture. Ce test est le plus sensible pour déterminer une rupture du LCA.

Le test du tiroir antérieur est pratiqué sur genou fléchi entre 60 et 90°, le pied du patient est fixé à plat, les muscles de la jambe relâchés. Le praticien cherche, comme pour le test de Lachman, à faire avancer le tibia sous le fémur. Si le test est positif, l'aspect de l'articulation se modifie de façon nette car les plateaux tibiaux s'avancent et tendent la peau qui les recouvre[51].

L'existence d'un ressaut rotatoire témoigne également de la rupture du LCA. La recherche d'un ressaut de ce type s'effectue en passant de la position d'extension vers la flexion en associant un mouvement de valgus et de rotation interne du pied. Cet examen dynamique peut être pratiqué par une manœuvre de Macintosh ou pivot de shift[50]. Le patient est allongé sur le dos, le praticien saisit d'une main le pied du patient avec une faible rotation interne. L'autre main plaquée contre le tiers supérieur de la jambe du patient, il applique une contrainte en valgus forcé sur la face externe de l'extrémité supérieure de la jambe. Dès les premiers degrés de flexion, le plateau tibial externe se déplace en avant.

Malgré un examen clinique approfondi, ces différents tests ne permettent pas à 100% de conclure à une rupture totale du LCA. En effet, alors que le test de Lachman a une sensibilité de 84%, le test du tiroir antérieur et celui du pivot de shift, n'ont une sensibilité que de 62%[52]. C'est pour cela qu'en plus de l'examen clinique, des examens d'imagerie sont à réaliser. La réalisation d'une radiographie à rayons X va permettre d'éliminer toute éventuelle fracture des éléments osseux avoisinants ; tandis qu'une IRM pourra être réalisée dans le mois après le traumatisme, après résorption de l'œdème, et permettra objectivement de conclure à la rupture du LCA. Le chirurgien prendra alors la décision du mode de reconstruction chirurgicale : la ligamentoplastie ou la pose d'un ligament synthétique.

B. Ligamentoplastie

La ligamentoplastie désigne la procédure chirurgicale remplaçant un ligament rompu par une greffe. Il existe plusieurs techniques, mais les deux les plus couramment utilisées sont : (i) la ligamentoplastie de Kenneth-Jones (KJ) et (ii) la ligamentoplastie DIDT[53].

Dans ces deux techniques, la greffe utilisée peut être d'origine autologue (le donneur et le receveur sont la même personne) ou allogène (le donneur est différent du receveur). La greffe autologue, également appelée autogreffe, permet de pallier le risque de rejet du greffon. Cependant, elle présente le principal inconvénient d'une possible morbidité du site de prélèvement, ainsi que la nécessité de deux sites anatomiques traités chirurgicalement, ce qui augmente le temps opératoire pour le patient. L'allogreffe permet de pallier ces problèmes, mais de son côté présente des risques de transmission de maladie infectieuse et des risques immunologiques pour le patient receveur[53]. La sélection du donneur, l'approvisionnement en tissus, les techniques de stérilisation et la méthode de stockage de ces greffons sont également des paramètres importants à considérer[54], [55]. Le choix de l'origine de la greffe sera fait par le chirurgien en fonction des données patient dont il dispose : âge, sport pratiqué, niveau sportif, état du genou avant l'accident, laxité préopératoire...etc.

Une fois l'origine du greffon choisi, la première technique possible est celle de Kenneth-Jones qui consiste à utiliser le tendon rotulien afin de remplacer le LCA rompu. Il s'agit de prélever le tiers central du tendon en prenant également une partie d'os rotulien et une partie d'os de l'insertion tibiale (cf. Fig.15). Ce greffon os-tendon-os présente deux avantages majeurs : (i) une résistance mécanique proche du LCA natif et inégalée par aucun autre greffon[53] et (ii) des extrémités osseuses qui permettent d'augmenter le remodelage os-os et permettent une fixation suffisante du greffon dans l'articulation. Toutefois, il est important de noter que l'autogreffe du tendon rotulien peut être contre-indiquée pour les patients présentant une luxation patellaire symptomatique ou des symptômes patello-fémoraux préopératoires. De plus, les inconvénients de cette technique, si elle est autologue, sont des épisodes de tendinite rotulienne et un affaiblissement du quadriceps au cours de la première année post-opératoire[56].

La deuxième technique possible consiste à utiliser les tendons ischio-jambiers, à savoir le tendon droit interne et le demi-tendineux (DIDT) (cf.Fig.15), pour remplacer le LCA rompu. Ces tendons peuvent être utilisés ensemble repliés sur eux-mêmes en forme de boucle, ou indépendamment[56]. L'avantage de cette technique est que le site de prélèvement ne se situe pas dans l'articulation fémoro-patellaire, ni dans les tissus antérieurs environnants, ce qui engendre moins d'effet sur le quadriceps à court terme. Cependant, ce greffon a une résistance mécanique nettement inférieure à celle du tendon rotulien[57]. Sa fixation osseuse et sa cicatrisation sont également moins bonnes que pour la technique KJ. Des études montrent que le risque de récurrence d'une rupture d'un greffon biologique, varie de 5 à 10% environ[58]–[61]. Ces dernières montrent également une tendance à la récurrence plus fréquente pour la technique du DIDT que pour la technique KJ, sans différence significative toutefois[62].

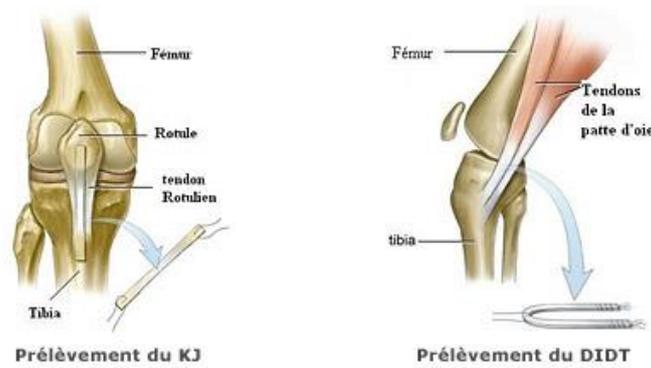


Figure 15 : Sites de prélèvement des tendons dans les deux techniques de ligamentoplastie les plus employées

Le greffon idéal pour le remplacement du LCA n'a pas encore été trouvé à l'heure d'aujourd'hui. S'il devait exister, il devrait: (i) avoir une tenue mécanique au moins équivalente à celle du LCA ; (ii) permettre un bon ancrage osseux ; (iii) conduire à une absence de morbidité du site de prélèvement ; (iv) conduire à une absence de rejet, de transmission infectieuse et de risque immunologique ; (v) induire une recolonisation précoce des cellules de l'hôte ; (vi) restaurer une stabilité satisfaisante pour permettre une rééducation sans restriction ; et enfin (vii) permettre un retour rapide du patient à des activités quotidiennes et sportives[56], [57]. Devant ce cahier des charges complexe à satisfaire, le développement de ligaments synthétiques a vu le jour.

C. Implants synthétiques

C.1. Généralités

L'emploi de ligaments artificiels permet de pallier les inconvénients de la greffe évoqués précédemment. En effet, la pose de cet implant permet de restaurer immédiatement la stabilité du genou, ce qui amène à une rééducation immédiate et à une reprise rapide des activités sportives. De plus, l'absence de nécessité de prélever un tissu sur un autre lieu anatomique limite une détérioration accrue de l'articulation et élimine les risques de morbidité et immunologique.

L'utilisation de ces implants peut être faite suivant trois objectifs[63] :

- un remplacement définitif : remplacement total du LCA nécessitant des propriétés mécaniques suffisantes mais aussi un excellent maintien dans le temps de la prothèse ;
- un remplacement servant de tuteur : le ligament synthétique va guider et stimuler la formation d'un néo-ligament natif. Il est donc nécessaire que la prothèse soit suffisamment solide pour assurer la stabilité du genou après l'opération et qu'elle soit bien tolérée par le corps afin d'être recolonisée par un tissu fibreux de qualité ;
- un renfort temporaire : l'implant est utilisé conjointement à une ligamentoplastie et va renforcer et protéger l'articulation le temps que la revascularisation et le remodelage se fassent.

a) Historique

Avant les années 1970, les matériaux synthétiques n'étaient que très rarement utilisés dans le domaine de la reconstruction ligamentaire. Plusieurs tentatives ont vu le jour avec des fils d'argent, des sutures en soie ou encore des cylindres de silicone[64]. L'idée principale était d'essayer de trouver un matériau ayant un comportement quasi-élastique afin de se rapprocher au maximum du ligament natif. Toutefois, le design de ces premiers ligaments synthétiques n'était pas pratique et surtout l'emploi de ces matériaux n'était pas bien toléré par le corps humain.

À partir du milieu des années 80, l'industrie du ligament artificiel a connu un essor sans précédent. De nombreuses compagnies se sont lancées dans le développement de la **première génération** de ligament artificiel[65]. Les prothèses qui ont été le plus posées et qui sont donc le plus documentées dans la littérature sont :

- en tant que renfort : les fibres de carbones et le ligament Kennedy-LAD® ;
- en tant que prothèse définitive : les ligaments Dacron®-Stryker et Gore-Tex® ;
- en tant que tuteur : le ligament Leeds-Keio.

À la même époque, l'arthroscopie connaît un bond phénoménal et se démocratise à travers le monde. Il s'agit d'une technique chirurgicale permettant d'accéder à l'articulation de manière mini-invasive. Les ligaments artificiels vont alors profiter de cette avancée chirurgicale et leurs fabricants vont insister sur le caractère simple, rapide et mini-invasif de la mise en place de leur produit. Ainsi, rien que pour la prothèse Leeds-Keio, 22 000 patients seront implantés à travers le monde (hors USA) entre 1982 et 1992[66] ; pour la prothèse Gore-Tex® ce sera 18 000 patients entre 1985 et 1993[65]. Les premiers résultats à court terme qui se dégagent de l'utilisation de ces produits sont plutôt bons, et la communauté scientifique justifie les quelques échecs qui apparaissent comme étant dues à la courbe d'apprentissage des chirurgiens[63]. Cependant, plus le nombre de patients implantés est important, plus on commence à avoir du recul sur ces produits, et le taux d'échec et de complications ne cessent d'augmenter. Une étude a révélé que sur 855 prothèses ligamentaires suivi sur 15 ans, le taux d'échec étant de 40 à 78%[65]. Les raisons de ces échecs seront évoquées au paragraphe I.2.2.C.2.

Au début des années 90, le secteur s'essouffle et devant un nombre d'échecs croissant, de nombreux fabricants se retirent du marché. La société française L.A.R.S. développe alors un nouveau ligament biomimétique, constituant ainsi un ligament de **deuxième génération**[67]. Celui-ci possède un taux d'échec de seulement 4 à 8% et un niveau de satisfaction du patient de 73,5 à 93% d'après l'échelle KOOS (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score)[68]. En comparaison, l'autogreffe DIDT

présente un taux d'échec de 1,8 à 10,1%[67]. Le ligament LARS® est aujourd'hui le seul ligament artificiel encore sur le marché.

b) Design et matériaux

L'évolution du ligament synthétique a donné lieu à de nombreux design et à l'utilisation de matériaux différents. Le tableau 2, ainsi que les paragraphes suivants, résument ces différentes caractéristiques pour les prothèses les plus connues.

Les premiers ligaments développés étaient de simples structures torsadées de fibres de carbone (cf. Fig.16). Ces dispositifs étaient conçus comme un support pour permettre la croissance tissulaire par la recolonisation fibroblastique et la production de nouveau collagène[65]. Ces prothèses étaient constituées de faisceaux de fibres de carbone qui avaient pour but de répartir et de réduire uniformément les contraintes à l'interface de l'implant et des tissus mous avoisinants[69]. Des modèles composites étaient également développés, associant par exemple fibres de carbone et fibres de polyester orientées dans une tresse partielle par un motif en zigzag (ex. Surgicraft®)[69] ; ou encore l'association de fibres de carbone recouvertes de collagène ou de polymères résorbables (ex.Plastafil®)[65].

Le ligament Kennedy-LAD® était conçu comme un Dispositif d'Augmentation Ligamentaire, ou renfort. Composé d'un ruban de polypropylène (PP) tissé à partir de huit tresses, il a été initialement développé pour renforcer la zone du tissu pré-patellaire considérée comme une zone faible des autogreffes de tendon rotulien[65]. Ce ligament synthétique devait protéger le greffon des contraintes excessives subies au cours de la phase initiale de remodelage tissulaire, permettant une reprise plus rapide de l'activité du patient. Afin tout de même de permettre la reconstruction du ligament natif par l'activation des mécanorécepteurs, le Kennedy-LAD n'était attaché à l'os qu'à une seule extrémité[69].

Le ligament Leeds-Keio avait la structure d'un treillis fait de fibres de polyester (cf. Fig.16). Il était mis en place à travers deux tunnels osseux puis fixé par des chevilles osseuses. L'objectif de ce design était d'établir un échafaudage à la fois au niveau intra articulaire et au niveau intra-osseux, afin de favoriser la croissance néo-ligamentaire[69]. Des études à long terme ont montré que les nouvelles fibres de collagène formées n'étaient pas correctement orientées pour restaurer la fonction ligamentaire. Par conséquent, les prothèses Leeds-Keio ont continué à supporter des charges de plus en plus importantes entraînant des taux de rupture élevés[70].

La prothèse ligamentaire Gore-Tex® a été principalement utilisée aux Etats-Unis. Sa structure multifilamentaire organisée en une tresse est faite en polytétrafluoroéthylène expansé (PTFE). Les extrémités de la tresse se terminent par un œillet afin de permettre la fixation du ligament par des vis osseuses (cf. Fig.16)[63]. Cette prothèse a été conçue pour permettre une fixation immédiate avec des capacités de chargement rapides, promettant ainsi une rééducation et un retour à l'activité précoce. Cependant, malgré de bons résultats sur le court terme, un recul à moyen terme, montrait des signes de relâchement progressif de la prothèse. Le taux de réussite était de 90% à 2 ans mais tombait à 76% après 3 ans et au-delà[69]. Cette prothèse a été approuvée par la FDA pour être utilisée uniquement dans les cas de reconstruction de reprise après un échec d'une autogreffe[65].

Le ligament Dacron® a été conçu comme une prothèse hybride pour résoudre les problèmes de rigidité qui ont conduit à des taux de défaillance élevés dans les dispositifs précédents. L'implant est composé de quatre bandes de polyester tissées serrées et enveloppées dans une gaine de velours tissée de manière lâche (cf. Fig.16)[65]. Au sein de chacune des 4 bandes, un fil radio-opaque était placé afin de visualiser une éventuelle rupture[63]. Cet implant a été conçu pour minimiser l'abrasion et agir comme un échafaudage pour la croissance tissulaire[69]. Bien qu'il ait été observé que la recolonisation de l'implant était significative, celle-ci était une nouvelle fois désorganisée, et l'implant ne rétablissait pas une bonne stabilité du genou. Le taux d'échec après 4 ans, estimé suivant des tests de laxité latérale, de tiroir antérieur, le test de Lachman et le test de pivot shift, était de 40 à 60%[70].

Le ligament LARS® est composé de fibres de polyéthylène téréphtalate (PET) et possède une structure en deux parties (cf. Fig.16). Il est en effet constitué d'une partie intra-osseuse composée de fibres longitudinales reliées entre elles par une structure tricotée transversale ; et d'une partie intra-articulaire composée de fibres libres parallèles et torsadées à 90° dans le sens des aiguilles d'une montre ou dans le sens inverse suivant s'il s'agit d'un ligament pour le genou droit ou pour le genou gauche[69]. Cette torsion permet d'imiter l'orientation des fibres de collagène du LCA natif et constitue la principale innovation de ce ligament. Les forces de cisaillement sont alors réduites, puisque qu'alternativement 50% des fibres vont travailler en extension et 50% vont travailler en flexion. De plus, les fibres libres de PET de la partie intra-articulaire permettent à la structure d'avoir une certaine porosité, ce qui favorise la croissance tissulaire. Idéalement, une telle croissance tissulaire entre les fibres du ligament contribuerait à la viscoélasticité de l'implant et protégerait du frottement des fibres contre l'os au niveau de son insertion et du frottement des fibres sur elles-mêmes[70].

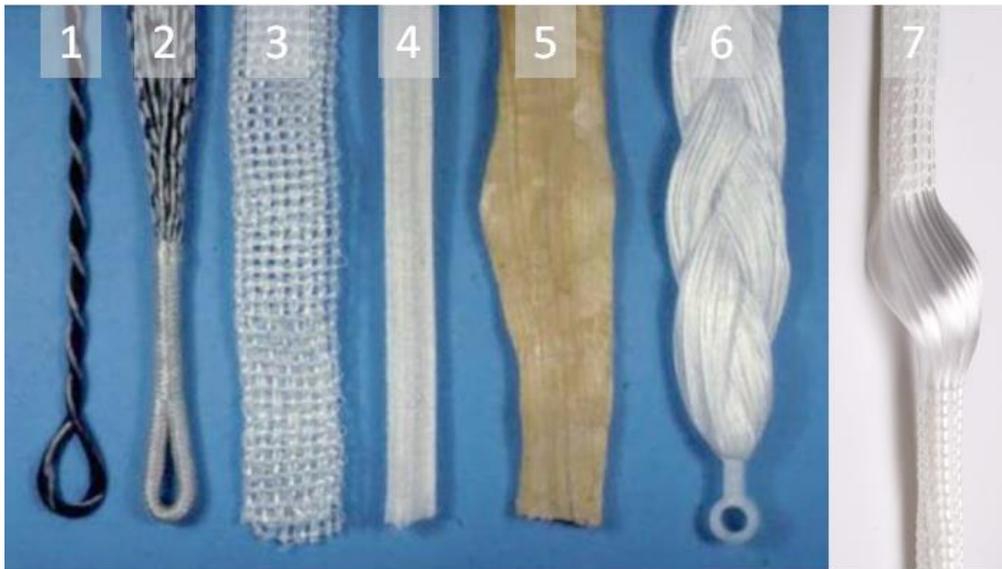


Figure 16 : Ligaments artificiels commercialisés dans les années 80-90 : (1) ligament en fibres de carbone ; (2) ligament Surgicraft ; (3) ligament Leeds-Keio ; (4) ligament Dacron-Stryker ; (5) tendon bovin ; (6) ligament Gore-Tex ; (7) ligament LARS (adapté de [64], [67])

	Fabricant	Matériau	Structure	Année d'utilisation	Type d'implant
Kennedy-LAD®	3M, USA	PP	ruban tissé à partir de 8 tresses	1980	Renfort temporaire
Leeds-Keio®	Université de Leeds (UK) et Université de Keio (JPN)	PET	treillis	1982	Prothèse tuteur
Gore-Tex®	W.L.Gore, USA	PTFE	multi-filaments organisés en tresse	1986-1993	Prothèse de remplacement définitive
Dacron Stryker®	Stryker, USA	PET/PP	4 bandes tissées enveloppées dans une gaine	1989-1994	
LARS® <i>Ligament Advanced Reinforcement System</i>	LARS, France	PET	tricotée au niveau intra-osseux ; fibres libres en intra-articulaire	1992- aujourd'hui	

Tableau 2 : Résumé des matériaux et structures des prothèses ligamentaires[67], [71]

c) Propriétés mécaniques

Le tableau 3 résume les principales caractéristiques mécaniques des différentes prothèses évoquées précédemment, comparées aux valeurs pour le LCA natif. Les chiffres cités sont ceux des fabricants (sauf pour le ligament LARS®) et il convient de les prendre avec prudence, notamment en ce qui concerne la rigidité qui est proportionnelle à la longueur testée, or cette longueur n'est pas toujours précisée et quand elle l'est, n'est pas toujours égale à celle du ligament natif. La Figure 17, ainsi que l'observation des données chiffrées, nous montre bien que toutes les prothèses, hormis le renfort

Kennedy-LAD®, sont beaucoup plus solides que le LCA natif. Cependant, lorsque l'on trace la courbe de forces en fonction de la déformation, on observe qu'excepté le ligament Leeds-Keio, ces prothèses s'allongent beaucoup moins que le ligament humain, surtout en-dessous de 1000N, qui est la zone de sollicitation la plus fréquente du LCA.

	Elongation à la rupture (%)	Force à la rupture (N)	Rigidité (N/mm)
LCA humain	28,5 ± 8,4	1799 ± 604	249 ± 95
Kennedy-LAD®	22	1730	56
Leeds-Keio	30	2000	180
Gore-Tex®	8 à 10	5300	322
Dacron®	15 à 17	3045	420
LARS®	9,65 ± 0,64	5201 ± 21	-

Tableau 3 : Principales propriétés mécaniques des ligaments synthétiques [63], [72]

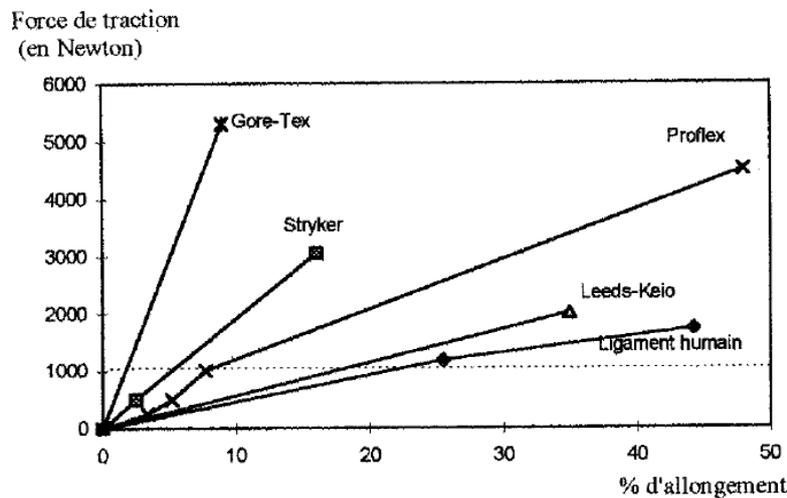


Figure 17 : Courbe de force en fonction de l'allongement des différents ligaments synthétiques[63]

C.2. Problématique de l'échec des implants ligamentaires

Comme nous venons de le voir, le secteur du ligament artificiel n'en est pas à ces débuts et de nombreuses solutions ont déjà été proposées mais ont mené à des échecs. Afin de développer une prothèse efficace, l'analyse des causes de ces précédents échecs doit être menée.

En plus des complications habituelles de la ligamentoplastie, telle que la raideur ou une laxité récidivante, un certain nombre de complications sont spécifiques aux ligaments artificiels. De manière générale on pourra évoquer : (i) le développement d'un tissu collagénique cicatriciel désordonné ; (ii) une intégration osseuse insuffisante ; (iii) des problèmes d'élargissement des tunnels osseux entraînant des problèmes de fixation de l'implant ; (iv) des risques d'infection variant de 0 à 5% ; et (v) une induction d'arthrose sur le long terme. Cependant, tous ces problèmes ne sont que secondaire en comparaison du pourcentage d'échecs lié à (i) un problème de pose de l'implant ; (ii) une cause mécanique ; ou (iii) une synovite.

a) *Technique chirurgicale*

La mise en place d'un greffon ou d'un ligament synthétique se fait par son passage au travers de deux tunnels osseux réalisés dans le fémur et le tibia. Puis, la fixation du tissu de reconstruction est réalisée à l'aide de vis d'interférence[73]. Compte tenu de la structure complexe du LCA, une reconstruction anatomique n'est pas un acte aisé, mais le positionnement correct de la prothèse s'est avéré d'une importance capitale pour la longévité de la reconstruction[66]. Cette prise de conscience de la communauté scientifique, a mené à une étude approfondie des caractéristiques anatomiques du LCA natif. Bien que les régions d'attachement du LCA varient d'un patient à l'autre, les localisations de base ont été référencées avec des points communs au niveau des tissus mous et osseux, pour une reconstruction reproductible et cohérente[14].

Les instructions opératoires concernant le placement du tunnel fémoral peuvent être résumées sous l'acronyme IDEAL pour I-isométrique, D-directe, E-excentrique, A-anatomique et L-« Low » tension/flexion (faible tension/flexion en français) (cf. Fig.18.A)[53]. Le concept d'isométrie se base sur une approche pragmatique du problème qui consiste à fixer l'implant au fémur et au tibia à des endroits qui resteront à la même distance pendant l'extension et la flexion du genou[66].

Ainsi, lors de la réalisation du tunnel fémoral, le chirurgien doit garder à l'esprit la localisation très postérieure du site d'insertion du LCA. Un placement trop antérieur du tunnel peut entraîner une instabilité et un déficit en flexion. Le mauvais placement de ce tunnel est un piège courant et une cause fréquente de révision des prothèses[19]. De plus, les tunnels fémoral et tibial sont souvent orientés trop verticalement, ce qui entraîne une surtension du greffon, une instabilité persistante et même une perte mineure de stabilité en rotation, et qui constitue ainsi également une cause fréquente d'échec[14].

De manière plus grave, un mauvais positionnement, en dehors des marges anatomiques, peut provoquer ce que l'on appelle un empiètement, qui conduira à l'échec de la reconstruction[53]. Il existe deux types d'empiètement : le « roof impingement » et le « PCL impingement » (cf.Fig.18.B).

Le premier correspond à un positionnement qui entraîne un frottement important de la prothèse dans le sillon fémoral. Ce problème clinique engendre pour le patient une perte d'extension et/ou une laxité accrue de l'articulation. Pour limiter ce problème, il faut s'assurer que l'entrée du tunnel tibial est postérieure au tubercule intercondyle lorsque le genou est en position d'hyper-extension maximale[53]. Ce positionnement a été reconnu comme un facteur important d'échec, et le degré de gravité de cet empiètement impacte énormément les résultats à long terme. En effet, Howell et al., ont montré un taux d'échec à deux ans de 100% en cas d'empiètement grave contre 29% en cas d'empiètement modéré[74].

Le deuxième type d'empiètement est le « PCL impingement », ce problème se produit lors de la flexion du genou et correspond au positionnement du greffon ou de la prothèse au-dessus du ligament croisé postérieur. Afin d'éviter ce problème, le chirurgien doit s'assurer qu'il existe un espace intra articulaire suffisant pour le positionnement de la reconstruction[53].

Enfin, suivant le même concept de reconstruction anatomique du LCA que celui utilisé pour le positionnement des insertions osseuses, l'utilisation d'une greffe à double faisceaux pour reproduire les faisceaux AM et PL du LCA natif, serait tout à fait justifié. Toutefois, le faisceau AM est considéré comme le centre de rotation du LCA, et les techniques de reconstruction traditionnelle ne reconstruisent que ce faisceau car il est considéré comme plus isométrique que le faisceau PL[53].

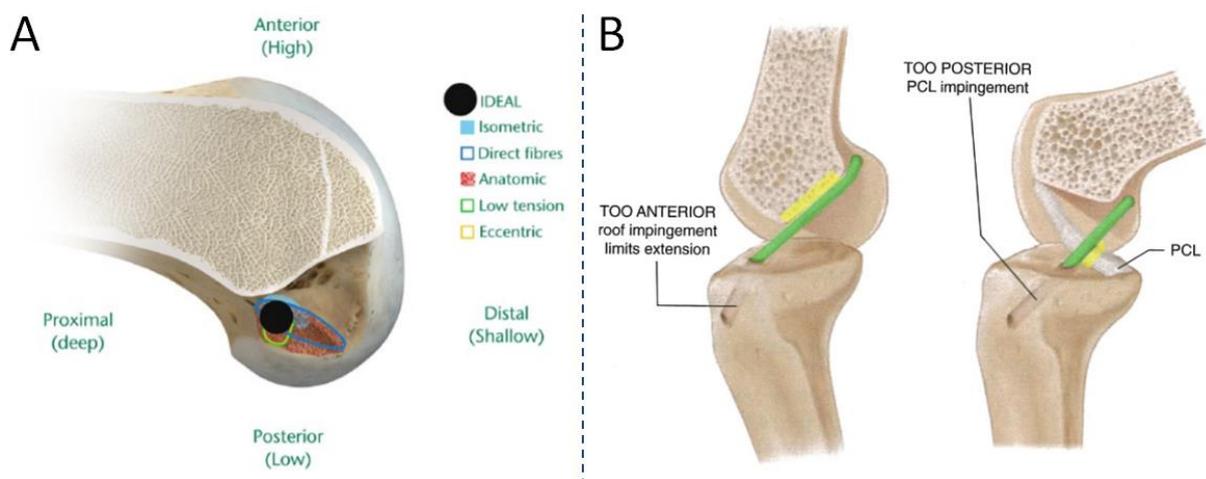


Figure 18 : (A) localisation IDEAL du tunnel fémoral[53] ; (B) les deux types d'empiètement : le « roof impingement » et le « PCL impingement »[75]

b) Causes mécaniques

Les échecs des implants ligamentaires pour raison mécanique sont les plus nombreux. On peut classer ces échecs suivant trois mécanismes distincts : (i) une résistance à la fatigue en flexion et en torsion trop faible; (ii) une résistance d'abrasion des prothèses faces aux surfaces osseuses inadéquates ; et (iii) une perte d'intégrité de la prothèse[71].

Résistance à la fatigue

Comme nous avons pu le voir précédemment, les propriétés mécaniques à la traction des ligaments artificiels étaient bien supérieures à celles du LCA natif. Cependant, ces caractéristiques n'ont pas suffi à assurer une bonne longévité aux prothèses[63].

En effet, le ligament natif grâce à ces deux faisceaux constitutifs présente une torsion naturelle lui permettant de transférer les efforts mécaniques d'un faisceau à l'autre entre la flexion et l'extension de la jambe. De plus, en raison de son angle d'insertion osseuse abrupt, le ligament naturel présente une zone de transition entre l'os rigide et le tissu ligamentaire : un tissu fibro-cartilagineux. Cette

zone atomique spécifique permet un changement graduel de la rigidité et permet d'empêcher une concentration de contraintes au niveau du site de fixation osseuse[19]. Par conséquent, l'implant ligamentaire qui viendra le suppléer doit pouvoir faire face à une force de traction importante avant de rompre mais aussi à des forces de torsion et de flexion. Comme la plupart des ligaments artificiels sont constitués de fibres synthétiques, il est relativement facile d'obtenir une résistance à la traction suffisante, mais il est plus difficile de faire face aux forces de flexion[76]. Ainsi, les efforts répétés de traction, de torsion et de flexion, pouvant intervenir parfois simultanément, entraînent une déformation permanente des implants sur le long terme.

Résistance à l'abrasion

Le contact des implants en chargement cyclique avec les arêtes vives des tunnels osseux provoque des abrasions de l'implant. Celles-ci sont d'autant plus accentuées en cas de mauvais placement lors de la pose chirurgicale. Ces abrasions viennent affaiblir la structure et créent des débris souvent très inflammatoires, qui conduiront à des synovites. L'usure mécanique progressive, liée aux forces de fatigue, associée à l'abrasion de l'implant provoquent sur le moyen et long terme une rupture de la reconstruction[76]. Cette rupture intervient bien souvent à la jonction entre la partie intra-osseuse et la partie intra articulaire et est donc l'une des causes d'échecs des ligaments synthétiques la plus importante. Ce point faible pourrait toutefois être surmonté si la croissance d'un tissu biologique (idéalement un fibrocartilage) était induite autour du ligament artificiel[77].

Perte d'intégrité

La fragmentation de la prothèse peut être reliée à un niveau d'abrasion élevé ou à un début de rupture partielle de la prothèse. Les prothèses tissées sont les plus sujettes à ce problème puisqu'elles laissent la possibilité d'une séparation axiale de leur structure[76].

c) Synovites

Le terme synovite désigne une inflammation de la membrane synoviale. Cette inflammation est douloureuse et peut être accompagnée d'une accumulation de liquide dans l'articulation, on parle alors d'épanchement. Ces réactions inflammatoires sont souvent chroniques, modérées et typiques des réactions à corps étranger (présence de macrophages et de cellules géantes)[78], [79]. Les synovites sont la deuxième cause d'échec des ligaments artificiels avec une fréquence pouvant aller de 0 à plus de 30%. On peut les classer suivant trois types[63] :

- Les synovites d'adaptation : la mise en place de l'implant induit une réaction inflammatoire aboutissant à la formation d'une couche fibreuse autour du ligament ;

- Les synovites mécaniques : elles apparaissent plus tardivement et peuvent devenir chroniques. Elles seront probablement causées par des particules issues de l'abrasion du ligament artificiel implanté ;
- Les synovites d'intolérance vraie : elles apparaissent rapidement de manière fulgurante et prennent l'aspect d'une arthrite septique. Elles sont provoquées par une réaction immuno-allergique déclenchée par le ligament lui-même ou par des résidus de fabrication.

Le tableau 4 résume les raisons principales de l'échec des ligaments artificiels présents sur le marché dans les années 80-90 et qui ont mené à leur arrêt de commercialisation. L'ensemble de ces problèmes, qui auraient pu être détectés plus tôt par des études cliniques initiales à long terme, a conduit à une méfiance des chirurgiens. À telle point qu'aujourd'hui, en France, 95% des chirurgies de reconstruction du LCA ont lieu via une ligamentoplastie plutôt qu'une pose d'implant.

Causes d'échec	
Kennedy-LAD®	<ul style="list-style-type: none"> • Taux élevés d'épanchement et de synovite dus à la réponse inflammatoire induite par l'implant • Taux élevés de rupture à long terme
Leeds-Keio	<ul style="list-style-type: none"> • Détérioration de la stabilité du genou après 1 an • Taux élevés de rupture à long terme
Gore-Tex®	<ul style="list-style-type: none"> • Elongation progressif à long terme • Bons résultats précoces mais détérioration rapide due à la fatigue mécanique • Taux élevés de rupture dans les 3 premières années
Dacron®	<ul style="list-style-type: none"> • Perte de la stabilité articulaire à long terme • Taux élevés de rupture
LARS®	<ul style="list-style-type: none"> • Laxité postopératoire résiduelle présente

Tableau 4 : Bilan des causes principales d'échecs des prothèses ligamentaires[67], [80]

I.2.3. Réponse de l'hôte aux biomatériaux

Au-delà des problèmes mécaniques qui ont engendré un échec des ligaments synthétiques dans les années 80-90, nous avons pu voir que le nombre important de synovites a également mené à une réticence des chirurgiens, encore présente aujourd'hui, à poser ce type d'implant synthétique. Toutefois, ces réactions inflammatoires chroniques sont une réponse directe à l'introduction d'un corps étranger dans notre organisme, on parle de « réponse de l'hôte ». Lors de l'introduction d'un biomatériau dans le corps humain, des interactions entre la prothèse et l'environnement biologique vont avoir lieu. D'un côté, nous allons avoir des effets de l'implant sur l'hôte, qui pourront avoir lieu à la fois localement (interaction fluide corporel/matériau, toxicité, encapsulation, infection etc...) et à la fois de manière systémique, c'est-à-dire diffus et éloigné (embolisation, thrombus, hypersensibilité etc...). De l'autre côté, l'organisme va également avoir des effets sur l'implant qui pourront être des effets physiques et mécaniques comme nous l'avons vu précédemment (fatigue,

abrasion, corrosion, dissolution etc...), mais également des effets biologiques (adsorption de substances par les tissus, dégradation enzymatique, calcification etc...)[81].

Contrairement à la ligamentoplastie, les implants ne peuvent pas être « rejetés » (hors implants d'origine animale). En effet, le rejet d'une greffe entraîne un mécanisme d'inflammation spécifique entraînant la mort des tissus environnants, tandis que la réaction à une prothèse entraîne une inflammation non spécifique liée à une lésion des tissus vascularisés[81]. Comme nous avons pu le voir dans le cas de la cicatrisation spontanée, cette inflammation est indispensable au remodelage tissulaire, cependant son intensité va donner une information sur le niveau de biocompatibilité du matériau.

Ainsi, dans le cas d'une atteinte « normale » des tissus, les macrophages sont les premières cellules immunitaires à être activées. Une fois sur le site lésé et après avoir nettoyées la plaie, elles sécrètent des cytokines qui vont activer les voies de signalisation cellulaire des fibroblastes déclenchant une cicatrisation normale[82].

Dans le cas de l'introduction d'une prothèse, ce processus est modifié (cf. Fig.19). Dès la première minute de contact entre le matériau et l'organisme, la surface de l'implant va être recouverte par une couche protéique d'environ 1 à 10 nm d'épaisseur[82]. En effet, les protéines en solution aqueuse s'adsorbent rapidement en monocouches sur les surfaces qu'elles rencontrent, de sorte qu'à l'arrivée des cellules, le matériau sera visible par le biais de cette couche protéique uniquement. Les macrophages vont donc adhérer au matériau sans pouvoir l'identifier, ces cellules vont alors proliférer à la surface en essayant de le phagocyter. Au vu de l'impossibilité de digérer ou d'engloutir cette masse importante de corps étrangers, les macrophages vont fusionnés en cellules géantes multi-nucléées. Ces cellules géantes déclenchent alors la formation d'une capsule de collagène par les fibroblastes afin d'isoler ce corps étranger important du reste de l'organisme, on parle alors de fibrose[82].

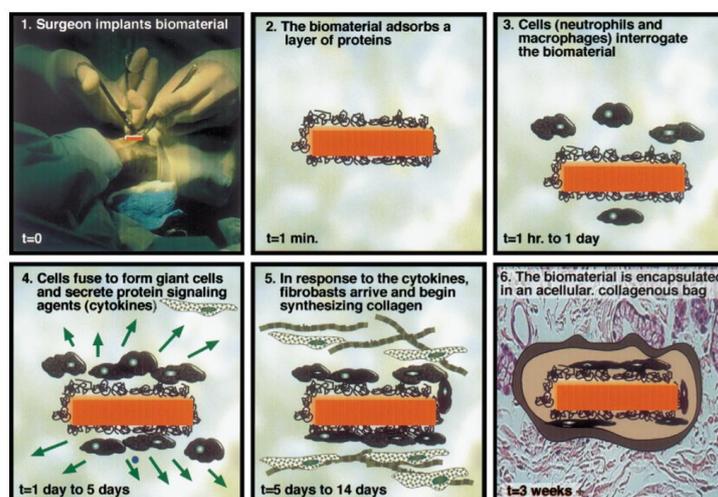


Figure 19 : Réaction de l'hôte à l'introduction d'un corps étranger[82]

A. Interactions surface-protéines

L'étape déterminante, de laquelle découle cet ensemble de processus cellulaires menant à la fibrose, est donc la formation du film interfacial protéique. En effet, les cellules vont répondre spécifiquement aux protéines présentes, c'est donc elles qui contrôlent les réactions biologiques à l'implant. Les propriétés de surface d'un matériau sont ainsi directement liées aux performances biologiques[81]. Cependant, chaque matériau (titane, polyester, silicone, polypropylène etc...) aura un mélange de protéines différent à sa surface, mais tous acquerront rapidement une couche contenant de nombreuses protéines dans de nombreux états d'orientation et de dénaturation différents. Les propriétés de surface du biomatériau vont donc déterminer le type, la quantité et la conformation des protéines adsorbées à partir du fluide environnant[82]. Le tableau 5 reprend la concentration des principales protéines retrouvées dans le plasma et dans le liquide synovial. Cependant, la composition de la couche protéique peut différer de la composition du fluide et peut changer avec le temps d'adsorption (déplacement des équilibres suivant l'affinité d'une protéine à une autre). En plus des changements de composition dépendant du temps, chaque protéine adsorbée peut subir des changements de conformation et d'orientation (cf. Fig.20). Lors de son adsorption, une protéine peut conserver sa conformation ou la structure qu'elle possède dans l'environnement biologique ou évoluer en réponse aux environnements locaux. La nature de la surface influence fortement la composition et la capacité de reconnaissance de la couche de protéines adsorbées, ce qui affectent les interactions cellulaires ultérieures[82].

Protéines	Plasma (sérum)	Liquide synovial
Albumine	4000 – 5500 mg/dl	400-1000 mg/dL
Fibronectine	150-300 µg/mL	150 µg/mL
Fibrinogène	200-400 mg/dL	-
Protéines total	6000-8000 mg/dL	500-1800 mg/dL

Tableau 5 : Concentration en protéines dans le plasma/sérum et dans le liquide synovial[81]

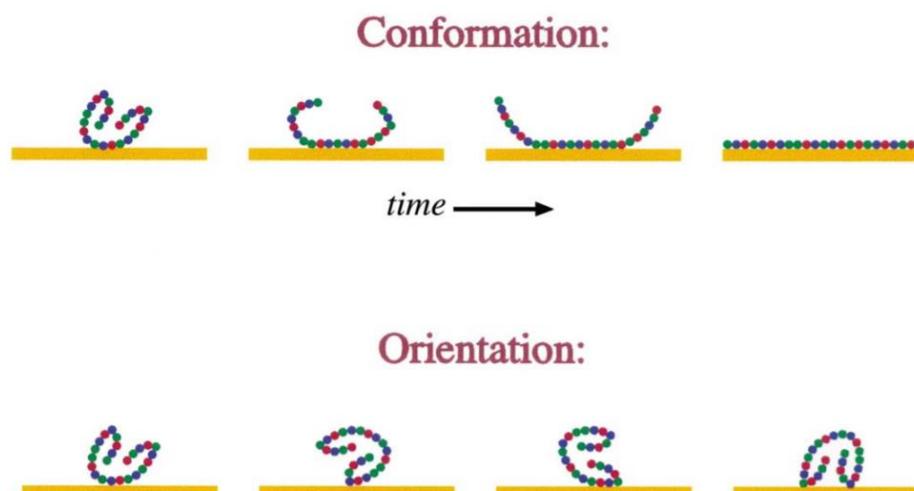


Figure 20 : Conformation et orientation des protéines adsorbées. Le schéma en haut montre la dénaturation d'une protéine avec le temps d'adsorption. Le schéma en bas montre une protéine adsorbée dans différentes orientations.[82]

L'histoire nous montre qu'une adsorption protéique non-spécifique entraîne un échec de la prothèse. En effet, toutes les cellules communiquent par la libération et la détection d'agents de signalisation (cytokines) via un réseau constitué de voies de signalisation multiples et interactives. Or l'utilisation de protéines par le corps humain en tant qu'agents de signalisation provient d'une (ou de plusieurs) protéines spécifiques dans des conformations et des orientations fixes, de manière à délivrer des signaux de manière optimale. L'état d'une cellule, sa forme, sa structure, son activité biologique, etc., dépend des signaux qu'elle reçoit de son environnement. Un objectif central de la bio-ingénierie moderne est le développement de surfaces de biomatériaux qui présentent les mêmes groupes de signalisation que la surface d'une plaie propre et fraîche, afin de contrôler avec précision la conformation et l'orientation des protéines, engendrant ainsi une réponse contrôlée de l'hôte[82].

B. Interactions protéines-cellules

D'un point de vue cellulaire, la réponse positive de l'hôte aux biomatériaux est déclenchée par l'adhésion des fibroblastes qui ont pour rôle de produire et de sécréter les composants de la MEC pendant la reconstruction tissulaire. Les fibroblastes sont des cellules adhérentes qui ne peuvent pas survivre et proliférer en suspension ; l'adhésion cellulaire est donc fondamentale. Leur membrane cellulaire est constituée d'une bicouche lipidique contenant des glycoprotéines de surface qui permettent de relier le cytosquelette de la cellule aux protéines adsorbées à la surface du matériau. Ces glycoprotéines sont également appelées des récepteurs transmembranaires, et la famille la plus impliquée dans les interactions d'adhésion cellulaire est la famille des intégrines. Ces protéines sont des hétérodimères, constituées d'une sous-unité α de 120 kDa et d'une sous-unité β de 90 kDa. Au total, il existe 18 sous-unités α et 8 sous-unités β différentes suivant le type de cellules étudiées[83]. Dans le cas de la reconstruction ligamentaire, on pourra noter l'importance des intégrines $\alpha 5\beta 1$ dans les interactions fibroblaste-fibronectine et $\alpha 2\beta 1$ dans les interactions fibroblaste-collagène de type I (cf. Fig.21.A)[84]. Ces intégrines vont être exprimées différemment selon la surface rencontrée et, en plus de permettre l'attachement de la cellule, vont activer des voies de signalisation intracellulaire, ce qui va déterminer la réponse cellulaire face à son environnement : adhésion, prolifération, étalement cellulaire ou encore sécrétion protéique comme la synthèse de collagène par exemple.

Parmi l'ensemble des protéines qui vont s'adsorber à la surface de l'implant, la fibronectine (Fn) va particulièrement être importante. En effet, la Fn peut interagir avec des composants du cytosquelette, de la MEC, des facteurs de coagulation, des protéines du système du complément et avec les intégrines des fibroblastes[85]. La Fn est une glycoprotéine de 450 kDa possédant de multiples domaines, dont trois sites de fixations : (i) à l'héparine, (ii) aux cellules grâce à la présence d'un peptide RGD (Arg-Gly-Asp) et (iii) au collagène (cf. Fig.21.B).

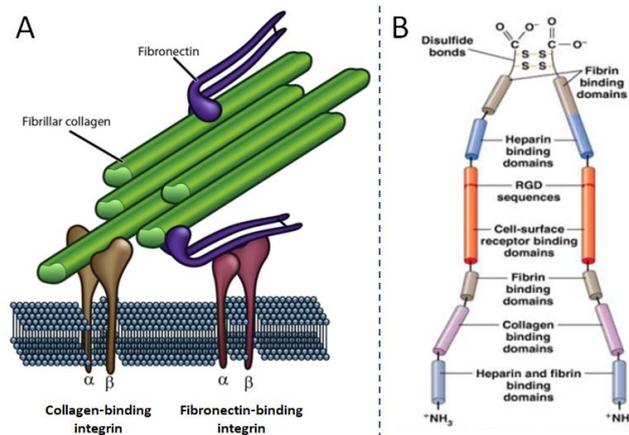


Figure 21 : (A) Schéma de l'interaction intégrines-collagène et intégrine-fibronectine[85] (B) Structure de la fibronectine[86]

L'état de surface du biomatériau va donc influencer l'orientation et la conformation de la protéine adsorbée. Pour exemple, Keselowsky et al. ont étudié l'effet de la chimie de surface sur l'adsorption de la Fn, l'interaction de celle-ci avec les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ et l'adhésion cellulaire[87]. Les surfaces étudiées étaient fonctionnalisées afin de présenter un caractère hydrophile (groupement $-OH$) ou hydrophobe (groupement $-CH_3$). Les résultats ont montré que l'adsorption de la Fn à la surface hydrophobe empêche la liaison à l'intégrine et supprime donc l'adhésion cellulaire quelle que soit la densité de Fn présente en surface ; tandis que la présence des groupements $-OH$ entraîne une affinité accrue pour l'intégrine et favoriserait l'adhésion cellulaire. D'autre étude, telle que celle de Kowalczyńska et al., ont étudié l'influence de surface porteur de groupements sulfonates ($-SO_3$) sur l'adhésion, l'étalement et l'organisation du cytosquelette de fibroblastes[88], [89]. Les résultats de leurs études ont montré que malgré une quantité de Fn adsorbée à saturation sur les deux surfaces similaire, l'adhésion cellulaire était nettement plus importante sur la surface sulfonatée. Ils ont alors bloqué des domaines spécifiques de la Fn à l'aide d'anticorps spécifiques et ont observé des différences significatives de la conformation de la Fn adsorbée sur surface sulfonatée ou non. Leurs résultats suggèrent que l'exposition du domaine contenant la séquence RGD diffère entre ces deux types de surface. En présence de groupement sulfonate, cette séquence serait bien exposée et donc facilement reconnue par les intégrines $\alpha 5 \beta 1$ des fibroblastes, tandis qu'en l'absence de ces groupements, cette séquence serait masquée. Ces études nous montrent bien, l'importance de la conformation et de l'orientation des protéines lorsqu'elles s'adsorbent à la surface d'un biomatériau sur la réponse cellulaire.

I-Partie 3 : Médecine régénérative du LCA

La naissance et l'essor de nouvelles disciplines de médecine régénérative, telles que l'ingénierie tissulaire ou la thérapie génique, donnent un nouvel élan à la reconstruction ligamentaire. L'objectif de la médecine régénérative est de créer des tissus vivants fonctionnels permettant de remplacer

des tissus ou des organes endommagés. La régénération peut se faire soit directement *in situ* chez le patient par la stimulation des tissus endommagés, soit de manière *ex situ* en laboratoire par la création d'un néo-tissu qui sera ensuite implanté.

Afin de remplacer et de régénérer avec succès le LCA, le support de régénération doit être capable d'induire l'adhésion et la prolifération des cellules, de favoriser la croissance des tissus et de présenter un comportement mécanique comparable à celui du tissu du LCA natif[26]. Pour cela, l'interdisciplinarité est nécessaire. En effet, l'utilisation conjointe des principes de la biologie, de la chimie de surface et de l'ingénierie permet aujourd'hui le développement de nouveaux substituts pour la restauration tissulaire. On parle alors d'ingénierie tissulaire fonctionnelle. Il existe trois approches : (i) l'utilisation de matrices poreuses en trois dimensions, appelées « scaffolds », qui favorisent à elles seules la régénération tissulaire ; (ii) l'utilisation de cellules isolées qui ont été développées *in vitro* afin de recréer *ex nihilo* un tissu et (iii) l'utilisation de facteurs de croissance seuls ou transduits dans des cellules qui vont augmenter les capacités de régénération du tissu, on parle de thérapie génique. Ces trois approches peuvent être utilisées seules ou conjointement[76]. Dans tous les cas, les éléments indispensables sont : (i) un support de croissance cellulaire ou « scaffold » ; (ii) des cellules réparatrices ; et (iii) des signaux de régulation qu'ils soient chimiques, biochimiques et/ou mécaniques [65].

1.3.1. Support de croissance tissulaire

Un scénario envisagé d'ingénierie tissulaire cliniquement pertinent implique l'utilisation de scaffolds biodégradables, de cellules autologues et un contrôle de l'environnement cellulaire[65]. Pour commencer, il faut donc développer le bon support cellulaire qui sera à la fois biocompatible, mécaniquement viable et dans l'idéal bio-résorbable.

Compte tenu de l'historique identifiant un nombre important de cas de synovites dans le domaine de la reconstruction ligamentaire, le nouveau substitut devra engendrer une réponse inflammatoire contrôlée et la plus minime possible. D'autre part l'analyse de la littérature montrant qu'une des causes d'échec des ligaments synthétiques est l'absence de pénétration cellulaire et tissulaire au sein des précédentes structures, le nouveau support devra être préférentiellement poreux. Enfin, s'il est utilisé seul, le scaffold devra favoriser la formation d'un néo-ligament.

D'un point de vue mécanique, la structure employée devra présenter une résistance mécanique suffisante. Idéalement, elle devra également montrer un comportement mécanique similaire à celui du LCA naturel lorsque soumise à un essai de traction, à savoir la présence d'une première zone de faibles contraintes par unité de déformation suivi d'une zone linéaire (contrainte élevée par unité de

déformation). Cette caractéristique est importante pour prévenir les dommages du futur ligament synthétique dus à la fatigue et au fluage[76].

Enfin, le scaffold devra être biodégradable avec un temps de dégradation contrôlé. L'idéal serait qu'il se dégrade en perdant progressivement ses propriétés mécaniques tandis que le ligament néoformé gagne en solidité et puisse supporter les contraintes sans risque de rupture[63], [65]. Cela permettrait de maintenir les propriétés mécaniques, et donc la stabilité du genou, le temps de la reconstruction tissulaire.

Afin de répondre à ce cahier des charges contraignant, ce nouveau ligament synthétique devra donc s'appuyer sur le choix réfléchi d'un bon matériau et d'une bonne architecture.

A. Matériaux biodégradables

Parmi les trois grandes classes de matériaux que sont les métaux, les céramiques et les polymères, seuls les derniers peuvent être biodégradables. Ce sont donc des matériaux de choix pour la régénération tissulaire du ligament. Les polymères biodégradables peuvent être divisés en deux groupes, les polymères naturels et les synthétiques. Tous ces matériaux et leurs produits de dégradation doivent être biocompatibles pour pouvoir être utilisés en génie tissulaire[23], [90].

A.1. Polymères naturels

Parmi l'ensemble des polymères naturels qui sont utilisés dans le domaine médical -la cellulose, le chitosane, l'alginate...etc.- ce sont le collagène et la soie qui sont majoritairement retrouvés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du ligament.

Les soies sont généralement définies comme des polymères protéiques naturels qui sont transformés en fibres par différentes espèces d'insectes. Les soies de différentes sources ont une composition en acides aminés, une structure et des propriétés mécaniques différentes[91]. La soie du ver à soie *B.mori* est la source la plus importante et la plus stable actuellement commercialisée. La fibre de soie est composée d'une fibre de fibroïne enveloppée par une couche de séricine qui ressemble à de la colle (cf. Fig.22). Les multiples fibrilles de fibroïne se caractérisent par une structure répétitive de nombreux feuillets β qui conduisent à une grande homogénéité de la fibre[90]. Cette homogénéité induit des propriétés mécaniques uniques et une stabilité environnementale accrue, deux critères importants pour l'ingénierie tissulaire des ligaments. De plus, la soie subit une dégradation protéolytique à un taux variable dépendant des conditions environnementales, mais qui reste relativement lent. Les fibres de soie perdent la plus grande partie de leur résistance à la traction en un an *in vivo* et se dégradent complètement en deux ans[65]. Toutefois, la séricine de la soie est la principale cause de problèmes indésirables de biocompatibilité et d'hypersensibilité. En effet, la séricine est une protéine non native pour l'homme et elle possède donc une forte immunogénicité.

Son élimination des fibres de fibroïne est indispensable et de nombreux processus ont été développés pour cela[92].

Ainsi, Altman et al., ont montré que lorsque la sérécine était bien éliminée de la fibroïne, un scaffold de fibres de soie permettait l'adhésion, l'étalement le long de l'axe des fibres, la prolifération et l'expression de marqueur ligamentaire spécifique de cellules souches mésenchymateuses[93].

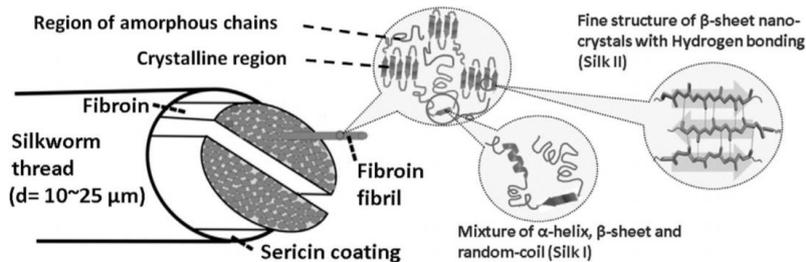


Figure 22 : Représentation schématique de l'organisation d'une fibre de soie[91]

Le deuxième polymère naturel très utilisé est le collagène. En effet, sachant que le collagène représente plus de 80% de la masse sec du ligament natif, il est tout à fait logique de l'envisager comme support de reconstruction tissulaire du LCA. Le collagène utilisé pour cette application est essentiellement de type I et d'origine bovine[92]. La molécule pure de collagène à triple hélices ne provoque pas de forte réponse antigénique, mais cette réaction peut être engendrée principalement par des débris cellulaires, la substance fondamentale, ou une région peptidique spécifique présente aux extrémités de la triple hélice[90]. Ainsi, le dérivé collagénique doit être traité afin d'éliminer les antigènes étrangers et les agents pathogènes potentiels du donneur afin de réduire l'immunogénicité du substitut[92]. Pour atteindre cet objectif, plusieurs méthodes ont été développées pour dissocier, purifier et reconstituer le collagène. Par ailleurs, le collagène issu des ligaments naturels est réticulé afin d'assurer une bonne résistance à la traction et à la dégradation chimique ou enzymatique. L'absence de réticulation a pour effet une fragilité et une friabilité des fibres. Dans le cas de scaffold de collagène, une étape de réticulation est bien souvent utilisée afin d'améliorer la résistance mécanique et ralentir la vitesse de dégradation[23]. De manière générale, les supports à base de collagène sont facilement modifiables, hémostatiques, ils ne sont pas toxiques, possèdent un possible effet synergique avec des composants bioactifs et sont généralement compatibles avec les polymères synthétiques afin de former des matrices composites[90].

L'équipe de recherche de Murray et al. a ainsi développé un nouveau dispositif de reconstruction du LCA, appelé BEAR (pour Bridge-Enhanced Anterior cruciate ligament Repair)[94]. Il s'agit d'une éponge de collagène bovin placée dans l'espace intra articulaire et suturée au moignon de ligament rompu afin de guider la régénération tissulaire (cf. Fig.23). Partant du constat que l'absence de cicatrisation spontanée du LCA est principalement liée à l'absence de vascularisation et de tuteur, l'idée est de développer une éponge pouvant absorber et retenir le sang au niveau de la plaie du LCA.

Les premières données précliniques suggèrent que le scaffold BEAR, qui est non réticulé, se résorbe à 95% en 6 semaines et à 100% 8 semaines après la chirurgie[95]. Après de très bons résultats animaux (porcin) montrant que les propriétés mécaniques du tissu cicatriciel formé avec l'implant BEAR étaient similaires à ceux d'une ligamentoplastie de Kenneth-Jones après 3, 6 et 12 mois d'implantation, les essais cliniques chez l'homme ont reçu l'accord de la FDA[96]. 10 patients, âgés de 18 à 35 ans, ayant une déchirure complète du LCA datant de moins d'un mois, et qui possédaient encore au moins 50% de la longueur du LCA attaché au tibia, ont ainsi été implantés avec le dispositif BEAR. Les IRM à 3 mois ont montré que tous les patients possédés un tissu continu dans la région du LCA suite à l'opération. Ainsi, cette première étude chez l'homme, a mis en avant le fait que le substitut BEAR était bien toléré par l'environnement synovial du genou et aucune infection profonde, ni réaction inflammatoire grave, n'ont été observées au début de la période postopératoire au cours de laquelle le collagène se résorbe[97].

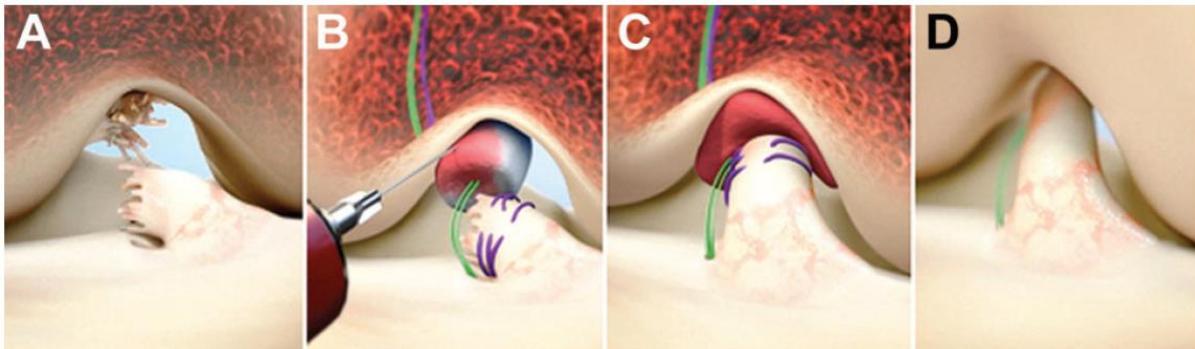


Figure 23 : Etapes de mise en place du dispositif BEAR

A.2. Polymères synthétiques

Les polymères synthétiques sont une classe de biomatériaux très vaste et très répandue. Leur très grande variété offre de nombreuses possibilités en ce qui concerne leurs propriétés chimiques, thermiques, mécaniques, optiques et leurs applications. Dans le domaine biomédical, les polymères synthétiques biodégradables les plus populaires et les plus utilisés sont entre autres : l'acide poly(lactique) (PLLA et PDLA), l'acide poly(glycolique) (PGA), la poly(caprolactone) (PCL) et la poly(dioxanone) (PDO ou PDS)[23]. Leurs structures chimiques sont présentées dans le tableau 6. Ces polymères sont des polyesters aliphatiques qui constituent une classe majeure de polymères thermoplastiques biodégradables. Leur dégradation se produit par clivage hydrolytique et/ou enzymatique conduisant à la formation d' α -hydroxy-acides qui, dans la plupart des cas, sont finalement métabolisés ou éliminés par filtration rénale[23]. Par ailleurs, les polymères synthétiques présentent le grand avantage de pouvoir déterminer à l'avance leur caractère hydrophobe de surface grâce à leur composition chimique et ainsi d'identifier leur impact sur la réponse cellulaire[92].

Famille	Polymère	Structure
Poly(α -hydroxyacides)	Polyglycolide PGA	
	Poly lactide PLA	
Poly(ϵ -hydroxyacides)	Poly(ϵ -caprolactone) PCL	
Autres	Poly(<i>para</i> -dioxanone) PDS	

Tableau 6 : Polyesters aliphatiques utilisés dans le domaine biomédical

Pour la reconstruction ligamentaire, les matériaux présentant la dégradation la plus lente doivent être privilégiés afin d'augmenter les chances de succès de la formation d'un néo-tissu viable. Pour ces raisons, le PLLA et la PCL sous la forme d'homopolymères ou de copolymères sont les plus largement utilisés pour cette application.

Le PLLA, ou poly(L-lactide) ou acide poly(L-lactique), est un stéréo-isomère du polylactide (PLA). En effet, l'acide lactique, qui est l'unité constituante du PLA, existe sous deux formes énantiomères, la forme L et la forme D ; la forme L, et donc le PLLA, est le plus souvent utilisé. Le PLA se dégrade en acide lactique par dé-estérification[98]. En fonction de son poids moléculaire, de sa cristallinité, de sa forme et de son site d'implantation, le PLLA se dégrade complètement après 10 mois à 4 ans d'implantation[23], [90]. Ce polymère a été étudié pour une utilisation dans des applications d'ingénierie tissulaire, car (i) il ne provoque pas de réaction permanente de l'organisme hôte ; (ii) il présente un risque minimal de transmission de maladies ; et (iii) il peut être facilement stérilisé sans altération significative[76].

Ainsi, Laurencin et al., ont développé un ligament synthétique en fibres de PLLA[76]. L'étude de dégradation qu'ils ont réalisée montre que les propriétés mécaniques de la structure ne sont que très peu modifiées après 8 semaines dans du milieu de culture. De plus, ils ont montré que leur structure permettait l'adhésion, l'étalement, la prolifération et la génération d'un néo-tissu par les cellules fibroblastiques du LCA[76]. Toutefois, une autre étude, menée par Laitinen et al., a montré qu'une structure en PLLA, après 48 semaines d'implantation en tant que reconstruction du LCA chez la brebis, avait sa résistance maximale en chargement à rupture diminuée de 88% par rapport au LCA

du genou opposé, ce qui correspond à une perte considérable des propriétés mécaniques de la structure[99].

A.3.Cas de la PCL

La PCL et ses copolymères sont utilisés dans un grand nombre de dispositifs médicaux mais historiquement leur utilisation était plutôt restreinte aux systèmes de délivrance de médicaments, également appelés dispositifs à élution. En effet, la très lente dégradation de la PCL permet à ce type de dispositif de rester en place jusqu'à 1 an sans perte de propriétés. Ces polymères présentent de nombreux avantages tels que (i) des propriétés mécaniques modulables ; (ii) une facilité de mise en forme et de fabrication permettant des tailles de pores appropriées favorisant la croissance des tissus ; (iii) une cinétique de dégradation ajustable suivant la masse molaire permettant ainsi la libération contrôlée de médicaments contenus dans leur matrice ; ou encore (iv) la possibilité d'être fonctionnalisé. En effet, des groupes fonctionnels peuvent être introduits pour rendre le polymère plus hydrophile, adhésif ou biocompatible, ce qui permet de modifier la réponse cellulaire induite par ce matériau hydrophobe, en une réponse favorable. Bien qu'ayant connu une forte croissance dans les années 70-80, l'intérêt de la PCL fut dépassé par la popularité d'autres polymères résorbables tels que les polylactides. En effet, l'évolution du cahier des charges des dispositifs à élution exigeait une libération des médicaments encapsulés en quelques jours ou quelques semaines après implantation, avec un temps complet de résorption de 2 à 4 mois. Puis, depuis les années 2000 et en continuité avec la naissance de l'ingénierie tissulaire, la PCL a connu un regain d'intérêt. Son approbation FDA lui permet aujourd'hui d'être désormais utilisée dans des dispositifs médicaux tels que les fils de suture, les pansements, les dispositifs de contraception, ainsi qu'en ingénierie tissulaire des nerfs, de la peau, des vaisseaux sanguins, de l'os, du cartilage ou encore du ligament[100].

a) Synthèse

La PCL est synthétisée par polymérisation par ouverture de cycle (POC) de l' ϵ -caprolactone, ou ROP en anglais pour Ring-Opening Polymerization. La POC est une polymérisation par croissance de chaîne où une extrémité de la chaîne polymère porte un centre réactif pour l'addition de monomères cycliques. Le polymère obtenu contiendra des groupes terminaux dépendant de l'initiateur utilisé et des réactions de terminaison se produisant. La réalisation d'une POC nécessite l'utilisation d'un amorceur, souvent un alcool ou une amine, qui va démarrer la POC ; et d'un catalyseur, composé organométallique, qui va jouer un rôle actif dans l'augmentation de la vitesse de la réaction de polymérisation. En fonction du catalyseur choisi, on peut distinguer trois mécanismes de POC (cf. Fig.24) :

- le mécanisme cationique : le cycle de la caprolactone est chargé positivement par réaction avec l'initiateur. L'ouverture de cycle se produit par une réaction de substitution par l'oxygène du groupement carbonyle d'un autre monomère de caprolactone. Ce monomère terminal sera à nouveau chargé positivement, permettant à la réaction de se propager.
- le mécanisme anionique : l'initiateur attaque l'atome de carbone du carbonyle, entraînant l'ouverture du cycle. L'espèce terminale chargée négativement permet la propagation de la réaction.
- le mécanisme par coordination/insertion : c'est une POC pseudo-anionique, où le monomère de caprolactone est inséré dans le catalyseur, au niveau de la liaison métal-oxygène. L'ouverture du cycle est le résultat du clivage de la liaison acyl-oxygène. Après clivage, métal est lié à la chaîne en croissance et la réaction de polymérisation peut continuer avec l'insertion d'un nouveau monomère.

Ce type de polymérisation est le plus souvent réalisé en masse, sous vide et à des températures comprises entre 110 et 150°C. De plus, chacun de ces mécanismes va permettre de produire un polymère de PCL caractérisé par une masse molaire, une polydispersité et des groupes terminaux différents. Dans la pratique, les synthèses par voie cationique et par voie anionique sont confrontées à de nombreuses réactions secondaires de trans-estérifications inter- et intra-moléculaires et le mécanisme par coordination/insertion est majoritairement utilisé[101]. Dans le cadre de la réglementation stricte appliquée dans le domaine médical, le catalyseur utilisé pour la POC de la PCL est l'octanoate d'étain (2-éthylhexanoate d'étain).

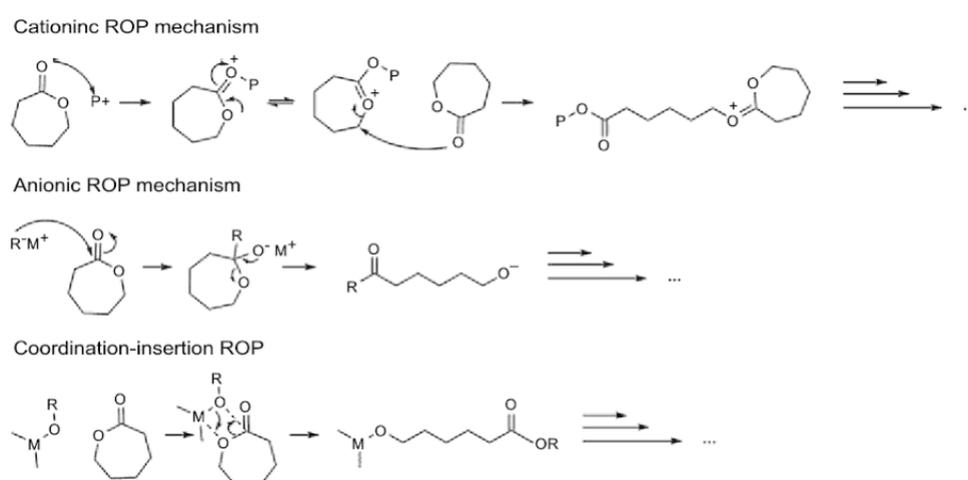


Figure 24 : Mécanismes de polymérisation par ouverture de cycle de la PCL[101]

b) Propriétés

La PCL est un polymère semi-cristallin ayant une température de transition vitreuse (T_g) de -60°C et une température de fusion (T_f) variant de 59 à 64°C suivant sa cristallinité[100]. Cette faible température de fusion fait de la PCL un matériau facilement façonnable à des températures

relativement basses. D'un point de vue microstructural, la PCL possède des zones amorphes, composées de chaînes macromoléculaires suivant une organisation anarchique, et des zones cristallines au sein desquelles les chaînes de polymères s'organisent entre elles[102]. La masse molaire moyenne en nombre (M_n) des structures de PCL peut généralement varier de 3000 à 80000 g/mol. Il est important de noter que plus la masse molaire est élevée, moins les chaînes macromoléculaires seront mobiles et donc moins elles auront la capacité à former des structures cristallines stables. De ce fait, plus la masse molaire est élevée, plus la cristallinité de la PCL est faible. Par exemple, avec une masse molaire de 5000 g/mol, le taux de cristallinité est de 80 % tandis qu'avec une masse de 60000 g/mol, la cristallinité est de 45%[103]. Toutefois, la cristallinité de la PCL peut être modulée par les traitements de mise en forme qu'elle subit variant ainsi sa cristallinité pour une même masse. La cristallinité de la PCL va également influencer les propriétés mécaniques de la structure[104]. Plus la cristallisation est importante, plus le module d'Young et la contrainte à la rupture vont être élevées, tandis que l'élasticité et l'allongement à rupture seront diminués. De manière assez intéressante, les mêmes tendances peuvent être observées avec l'augmentation de la masse molaire.

Enfin, la PCL est soluble dans de très nombreux solvants tels que le chloroforme, le dichlorométhane, le tétrachlorométhane, le benzène, le toluène, la cyclohexanone et le 2-nitropropane à température ambiante. Tandis qu'elle est peu soluble dans l'acétone, le 2-butanone, l'acétate d'éthyle, le diméthylformamide et l'acétonitrile et est complètement insoluble dans l'alcool, l'éther de pétrole et l'éther diéthylique[100]. Le tableau 7 présente des essais de solubilité de la PCL sous différentes formes (granulés et fils), de différents fournisseurs, de différentes masses et de différents grades de pureté, qui ont été réalisés au sein du laboratoire CSPBAT à température ambiante et à 45°C.

	PURASORB PC12				Fibres PLC		Granulés PURASORB PCL 7015		Granulés PLLA		Granulés PCL (Aldrich)	
	Fibres		Granulés		Technical Grade							
	T_{amb}	45°C	T_{amb}	45°C	T_{amb}	45°C	T_{amb}	45°C	T_{amb}	45°C	T_{amb}	45°C
Eau	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Hexane	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ethanol	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Méthanol	NS	NS	NS	NS	NS	Fondu	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Ether	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
Acétone	NS	S	NS	S	NS	S	S	S	NS	NS	NS	S
Acétonitrile	NS	S	NS	S	NS	S	S	S	NS	NS	NS	S
Acétate d'éthyle	NS	S	NS	S	NS	S	S	S	NS	NS	NS	S
Isopropanol	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
DMSO	NS	NS	NS	NS	NS	Fondu	Gonflé	NS	NS	NS	NS	NS
DMF	NS	S	NS	S	NS	S	S	S	NS	NS	NS	S
THF	S	S	S	S	S	S	S	S	NS	NS	S	S
Dichlorométhane	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Chloroforme	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Acide acétique 50%	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS

NS : Non Soluble - S : Soluble

Tableau 7 : Essais de solubilité de PCL réalisés par A.Augé, laboratoire CSPBAT (résultats non publiés)

c) Dégradation

De manière générale, la dégradation des poly(α -hydroxy esters) s'effectue suivant deux processus distincts : une dégradation en surface ou une dégradation en masse (cf. Fig.25). Ces différents systèmes de dégradation sont stimulés par l'action spécifique de l'eau et les phénomènes de diffusion et de réactions qui interviennent au sein du matériau[100].

La dégradation en surface, ou érosion, se produit lorsque la diffusion de l'eau dans le volume de polymère est extrêmement lente par rapport à la réaction de clivage hydrolytique de la chaîne polymérique. En résumé, l'eau pénètre plus lentement dans le polymère que l'hydrolyse n'a lieu. Les sous-produits de surface hydrolysés, monomères ou oligomères, diffusent alors rapidement dans l'environnement et les molécules d'eau n'ont pas la possibilité d'atteindre le centre de la structure. La dégradation se produit uniquement à la surface du matériau. Cela entraîne généralement un amincissement du polymère au fil du temps sans affecter la masse molaire du polymère, étant donné que les sous-produits de dégradation, qui sont en surface du matériau, sont diffusés/éliminés dans le milieu[105].

La dégradation en masse (ou « bulk degradation ») se produit lorsque l'eau est capable de pénétrer le cœur de la structure polymère et que des scissions de chaînes hydrolytiques aléatoires ont lieu uniformément dans toute la matrice. Les sous-produits de dégradation, monomères et oligomères, sont formés dans toute la matrice, y compris au cœur, et diffusent dans le milieu. Les polyesters en se dégradant forment des chaînes porteuses de groupements « hydroxyle » et « acide carboxylique » en bout de chaînes ; ce sont les groupements acides carboxyliques qui vont catalyser l'hydrolyse. Lorsque ces produits diffusent dans le milieu au fur et à mesure de l'hydrolyse, il n'y a pas d'effet catalytique, la dégradation et donc la diminution de la masse molaire sont homogènes et un équilibre de diffusion/réactions se crée [105]. Dans le cas où les sous-produits ne pourraient pas diffuser dans le milieu, et resteraient piégés dans le cœur de la structure polymère, l'effet catalytique des acides carboxyliques entrerait en action. En effet, un gradient de concentration d'acide se mettrait en place au cœur du matériau, et la vitesse de dégradation du cœur de la structure se ferait alors à un taux exponentiel. On parle alors d'autocatalyse interne. Ce mécanisme de dégradation produit une distribution bimodale de la masse molaire, étant donné que le matériau est constitué d'un noyau de chaîne moléculaire de faible masse, enrobé dans une enveloppe à forte masse molaire. Ce phénomène peut s'avérer problématique car la dégradation exponentielle au centre du matériau, peut entraîner la diffusion brutale de sous-produits au travers de la couche externe, engendrant un relargage important d'acide carboxylique, pouvant entraîner des réactions tissulaires indésirables et une inflammation importante[105].

Les phénomènes de diffusion-réaction sont donc essentiels pour déterminer le mécanisme de dégradation des polyesters. La résistance à la diffusion dépend principalement de la chimie du polymère et de l'épaisseur du matériau.

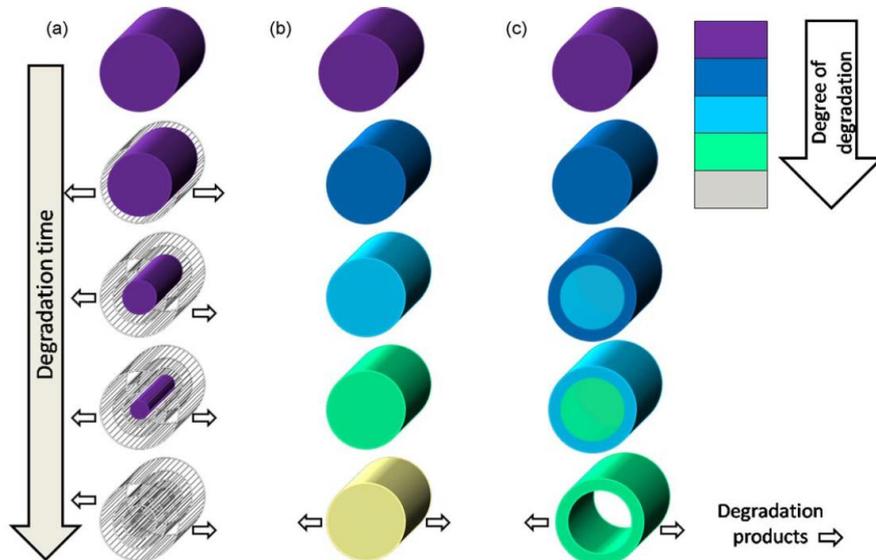


Fig. 3. Degradation modes for degradable polymers: Surface erosion (a). Bulk degradation (b). Bulk degradation with autocatalysis (c).

Figure 25 : Mécanisme de dégradation des polymères résorbables (a) dégradation en surface ; (b) dégradation en masse ; (c) dégradation en masse suivi d'une autocatalyse interne[100]

Comme pour tous les poly(α -hydroxy esters), la dégradation de la PCL s'effectue par hydrolyse. Les chaînes de PCL sont alors clivées au niveau des liaisons esters, formant des groupes terminaux carboxyliques et réduisant ainsi la taille des chaînes macromoléculaires et donnant des produits de dégradation hydrosolubles : des monomères d'acide (6-hydroxylcaproïque) (cf. Fig.26).

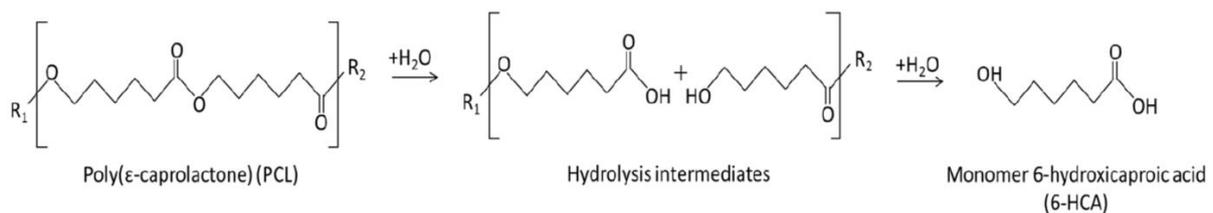


Figure 26 : Mécanisme de dégradation de la PCL[106]

La cinétique de dégradation dépend fortement de la masse molaire du polymère, mais la PCL est connue pour se dégrader complètement en 2 à 4 ans, ce qui est très lent. Ainsi, les structures de fortes masses molaires sont composées de chaînes macromoléculaires plus longues, ce qui va nécessiter le clivage d'un plus grand nombre de liaisons esters, et donc conduire à une dégradation qui prendra logiquement plus de temps.

Par ailleurs, des études de dégradation présentées dans la littérature permettent de conclure que la PCL subit *in vivo* un processus de dégradation en deux étapes: (i) premièrement, le clivage hydrolytique non enzymatique des groupes esters comme expliqué précédemment ; (ii) et

deuxièmement, une fois que le polymère est plus cristallin et que sa masse molaire est très faible, la PCL subit une dégradation intracellulaire. En effet, de l'acide (6-hydroxylcaproïque) et de l'acétyl-coenzyme A sont formés, ils sont alors métabolisés par la voie du cycle de Krebs (ou cycle de l'acide citrique) et sont ainsi éliminés de l'organisme[100].

Woodward et al. ont étudié la dégradation intracellulaire de poudres de PCL de faible masse molaire (3000 g/mol) et de tailles variant de 53 à 500 μm [107]. Les auteurs ont placé cette poudre dans des capsules de gélatine qu'ils ont injectées à des rats. Les résultats ont montré que la PCL en poudre était rapidement dégradée et absorbée à l'intérieur des phagosomes des macrophages et des cellules géantes et cela dans les 13 jours suivant l'implantation.

Sun et al. ont étudié l'absorption *in vivo* et la sécrétion de la PCL de faible masse molaire (3000 g/mol)[108]. Pour cela, ils ont injecté à des rats par voie sous-cutanée, de la PCL couplée à un marqueur radioactif. Les résultats ont montré qu'après 165 jours, soit un peu moins de 6 mois, il n'y avait plus aucune trace de PCL dans le plasma des rats, mais qu'en calcul cumulé l'intégralité des marqueurs radioactifs avait été retrouvés dans les fèces avec un faible pourcentage dans les urines, des rats après ce même laps de temps. Par ailleurs, après biopsie des différents organes, ils ont aussi démontré qu'il n'y avait pas d'accumulation de la PCL dans les tissus corporels et que donc la PCL est complètement excrétée.

Ces deux études ont également montré que la PCL se dégradait via un mécanisme de dégradation en masse, impliquant une scission hydrolytique aléatoire. De plus, ils ont noté une absence d'implication de dégradation enzymatique dans la première phase de dégradation, soit dans la première année suivant l'implantation.

Enfin, plusieurs études évoquent la dégradation rapide de la PCL par des microorganismes extérieurs type bactéries et champignons, notamment dans le milieu aquatique[109]. Ainsi, Sekiguchi et al. ont pu isoler 5 bactéries appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Alcanivorax* et *Tenacibaculum* qui peuvent dégrader la PCL[110].

B. Architecture du scaffold

Comme décrit précédemment la structure anatomique du LCA, composée de bandes de fibres de collagène denses, ainsi que ses propriétés mécaniques permettant de supporter de fortes charges, principalement dans son axe de travail. La reconstruction du LCA s'est portée sur le développement de structures permettant de reproduire ces propriétés, et donc tout naturellement vers le développement de fibres et de structures textiles. Tous les supports de reconstruction proposés actuellement sont composés de fibres, leur différence réside dans la manière d'organiser ces fibres entre elles[90]. En effet, l'architecture de ces supports est d'une très grande importance, car elle peut moduler la réponse biologique et la réussite clinique à long terme de l'échafaudage. Ainsi, en

fonction des paramètres de fabrication tels que le choix du matériau, le diamètre des fibres, la densité du fil ou encore les angles de maillage, les structures peuvent varier en termes d'architecture (diamètre des pores, pourcentage de porosité, surface accessible ou développée) et de propriétés mécaniques (module de traction, charge de traction maximale, élasticité)[23]. On peut distinguer trois types d'agencement : les structures torsadées, tressées et tissées (ou tricotées).

Les structures torsadées consistent en l'enroulement des fibres sur elles-mêmes par torsion. Cette organisation permet d'obtenir une sorte de corde se rapprochant sensiblement de l'architecture ligamentaire (cf.Fig.27A). La résistance mécanique du fil, la résistance à l'abrasion et la flexibilité de la structure sont influencées par le sens et le degré de la torsion. Ainsi, une faible torsion des fils entre eux produit une structure plus faible qui peut se séparer facilement, tandis qu'une forte torsion, augmente la résistance à la rupture et à l'abrasion[23].

Les structures tressées sont les plus répandues pour la reconstruction ligamentaire. Elles correspondent à l'entrecroisement d'au moins trois fibres ou faisceaux de fibres, conçues pour supporter des charges axiales (cf.Fig.27B). Ces structures sont très stables physiquement, résistantes au cisaillement mais leur densité de fibres les rendent moins extensibles et moins poreuses que les autres types de structures[90]. La taille des pores des structures tressées peut cependant être régulée par la taille du faisceau de fils et par les angles de tressage. D'un point de vue mécanique, l'augmentation du nombre de couches de fibres et du diamètre des fibres ainsi que la diminution de l'angle de tressage semble augmenter la rigidité et les contraintes supportées par la structure mais réduiraient son domaine d'élasticité. Certains chercheurs, comme Freeman et al., ont également développé des structures mixtes, à la fois torsadées et tressées[26], [111]. Ils ont alors remarqué une augmentation de la résistance à la traction, tout comme de l'allongement à la rupture, mais surtout une augmentation de la zone dite « toe region » en comparaison à celles des structures seulement torsadées ou seulement tressées.

Enfin, les structures tissées ou tricotées sont plus rares de par leur complexité de mise en œuvre. Le tissage consiste au croisement à angle droit d'un ensemble de fibres parallèles, appelé « chaîne », avec un autre ensemble de fibres parallèles, appelé « trame ». Le tricotage quant à lui est obtenu par entrelacement répété de fibres, constituant un motif élémentaire, appelé « maille ». Ces deux procédés d'assemblage permettent d'obtenir des structures très poreuses, modulables par le type de point, le motif de la maille, le diamètre des fibres etc... permettant ainsi de favoriser la colonisation cellulaire et tissulaire et de moduler les propriétés mécaniques de la structure[90]. Comme évoqué précédemment, il est possible de mélanger l'ensemble de ce type d'organisation. Le meilleur

exemple de cette combinaison est le ligament LARS, qui combine des fibres libres parallèles en partie intra articulaire et des fibres tricotées en partie intra-osseuse (cf.Fig.27C).

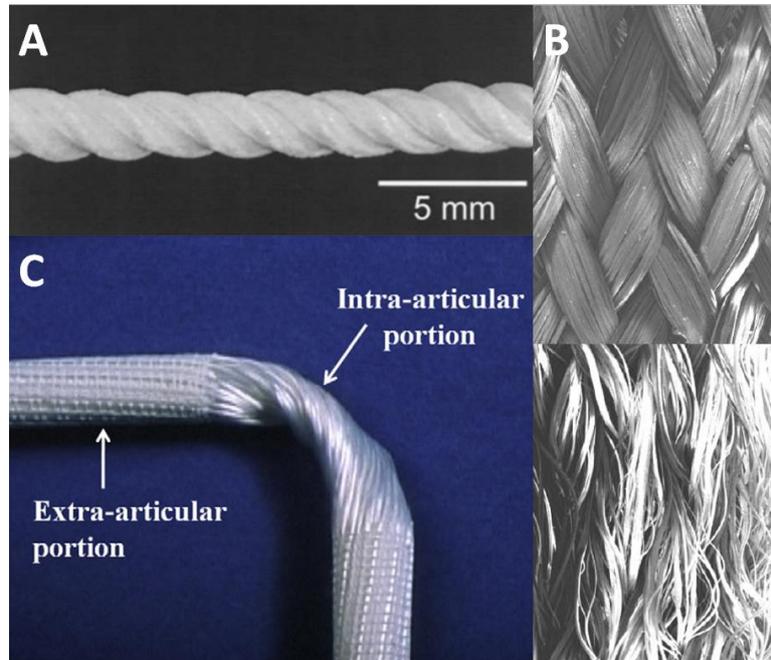


Figure 27 : Exemple de différentes architectures pour la reconstruction ligamentaire (A) structure torsadée en fibres de soie[93] ; (B) structure tressée en PLLA [76] ; (C) structure mixte avec une partie extra-articulaire tricotée[112]

I.3.2. Source cellulaire

Une fois le support tissulaire développé, la question de la source cellulaire qui va permettre la reconstruction du ligament doit être étudiée. En effet, l'objectif étant d'utiliser des cellules pouvant adhérer, s'étaler, proliférer et produire de la matrice collagénique une fois qu'elles seront en contact avec le scaffold. Deux types cellulaires différents sont alors communément utilisés : les fibroblastes et les cellules souches mésenchymateuses (CSM)[113]. Idéalement les cellules de choix devraient être celles du patient chez qui l'on souhaite réaliser une reconstruction ligamentaire, afin d'éliminer tout risque de réaction immunitaire[65].

A. Fibroblastes

Etant donné que les cellules utilisées devront reconstruire un tissu ligamentaire viable, il paraît tout à fait cohérent d'employer des fibroblastes issus de ligament, notamment du LCA. Cependant, ces cellules présentent l'inconvénient d'être relativement quiescentes, d'avoir une faible et lente prolifération et une capacité d'adaptation limitée à différentes conditions de culture[113]. Dans les travaux décrits sur ce sujet dans la littérature les fibroblastes utilisés sont souvent issus du LCA mais également du tendon rotulien ou du ligament collatéral médial.

D'un point de vue clinique, deux possibilités existent : soit les fibroblastes du LCA sont sollicités *in situ* par stimulus afin qu'ils recolonisent le scaffold, dans ce cas l'intervention chirurgicale devra

privilégier la suture de « moignon » de LCA rompu sur l'implant ; soit la méthode d'ingénierie tissulaire choisie nécessite le prélèvement de ces cellules afin de les cultiver en laboratoire. Cependant, dans le cas de cellules autologues, le prélèvement de fibroblastes sur des ligaments intra articulaires comme les ligaments croisés induit une intervention sous arthroscopie qui s'accompagne de tous les inconvénients et risques chirurgicaux traditionnels (anesthésie, infection, douleur, cicatrisation). De plus, l'utilisation de ces fibroblastes peut engendrer un risque d'infection locale du genou lors de leur prélèvement par biopsie[113]. Dans le cas d'un ligament rompu, le prélèvement peut ne pas conduire à un nombre de cellules suffisant pour reconstruire un tissu entier. L'ensemble de ces raisons a conduit à l'utilisation des cellules souches.

B. Cellules souches mésenchymateuses

Les cellules souches sont des cellules indifférenciées caractérisées par leur capacité d'autorenouveaulement et de différenciation en cellules de différentes lignées mésenchymateuses. Elles sont présentes dans presque tous les types de tissus du corps. Les cellules souches mésenchymateuses (CSM) peuvent se différencier en un large spectre de cellules y compris fibroblastiques, ostéogéniques, chondrogéniques et myogéniques, permettant ainsi de reconstruire des tissus tels que l'os, le cartilage, le muscle, le tissu adipeux, le tendon ou encore le ligament[113], [114]. Les CSM peuvent être retrouvées dans le cordon ombilical, le placenta, la peau, les muscles etc... mais ce sont celles issues de la moelle osseuse et du tissu adipeux qui sont les plus utilisées à des fins thérapeutiques. Le prélèvement des CSM par ponction de la crête iliaque au niveau du bassin est une technique relativement simple et courante. La seule difficulté liée à cette source de CSM réside dans la faible concentration de ces cellules dans la moelle. Toutefois, afin d'être utilisées pour des applications cliniques, ces cellules doivent nécessairement passer par une phase d'expansion *in vitro*, et leur faculté de prolifération rapide et de différenciation reste un atout majeur pour l'ingénierie tissulaire.

Dans le cadre de la reconstruction ligamentaire, les marqueurs de différenciation des CSM vers un phénotype de ligamentocyte sont aujourd'hui relativement mal connus. Il existe un certain nombre de marqueurs caractéristiques comme les collagènes de types I et III, la ténascine-C ou scleraxis mais ils ne sont pas spécifiques du ligament. Cependant, des conditions de culture peuvent être conçues pour guider la différenciation des CSM vers la formation de cellules ligamentaires. Ces cellules peuvent ensuite être isolées sur la base de leur adhérence à une surface solide et cultivées pour obtenir un grand nombre de cellules[65].

Les CSM sont donc obtenues beaucoup plus facilement, et présentent des taux de prolifération et de production de collagène supérieurs aux fibroblastes ligamentaires. Il est également intéressant de

noter que certaines études montrent que le tissu du LCA ainsi que le liquide synovial contiennent des populations de cellules partageant les caractéristiques des CSM, telles que des groupes de marqueurs de différenciation ou de multipotence, mais leur capacité de régénération est trop restreinte pour pouvoir reconstruire un ligament rompu[115].

I.3.3. Modes de stimulation

Les scaffolds et les cellules sont deux éléments indispensables et nécessaires d'une reconstruction tissulaire. Cependant, afin de réussir à reconstruire un tissu viable, une bonne interaction entre les deux et la stimulation des cellules vers une production collagénique sont nécessaires. Une aide peut alors être apportée afin d'optimiser le processus de reconstruction et ainsi limiter le risque d'échec de l'implant. Ces stimuli extérieurs peuvent être séparés en trois grandes catégories : les traitements de surface ; l'emploi de biomolécules telles que des facteurs de croissance ; ou la modification génétique appelée également thérapie génique.

A. Traitements de surface

Actuellement, il existe deux approches courantes pour modifier les matériaux afin d'améliorer leur biocompatibilité : le revêtement de surface (aussi appelé « coating ») et la modification chimique de la surface du matériau choisi. L'objectif de ces traitements étant de favoriser l'adhésion et la croissance des cellules réparatrices (fibroblastes), la fonctionnalité du tissu régénéré, mais aussi de neutraliser autant que possible les cellules inflammatoires telles que les macrophages, les lymphocytes, les neutrophiles etc...[90]. L'une des stratégies clés en ingénierie tissulaire consiste à optimiser ces interactions cellule-scaffold[116].

La modification de surface influence le comportement des cellules et accroît ainsi la bioactivité de la prothèse. La fonctionnalisation de la surface se fait généralement par le couplage de petites molécules via des interactions covalentes, ioniques ou hydrophobiques. Cette stratégie est particulièrement intéressante dans le cas des polymères synthétiques, très hydrophobes et qui ne favorisent donc pas l'adhésion cellulaire. Le revêtement de surface quant à lui consiste en un dépôt de la molécule d'intérêt par des méthodes telles que la projection plasma, la projection thermique ou encore le dépôt électrolytique.

A.1. Immobilisation de protéines de la MEC

Peu importe la méthode de traitement de surface employée, le choix de la molécule d'intérêt est crucial. Comme nous l'avons vu précédemment, toutes les interactions entre les cellules et les surfaces artificielles sont médiées par une couche de protéines adsorbées. L'une des approches très couramment utilisées est donc d'immobiliser des protéines ou des composants de la MEC à la surface

des matériaux prothétiques, et notamment la fibronectine (Fn), le collagène ou encore l'acide hyaluronique[90]. Ainsi, Li et al. ont étudié l'impact de la pulvérisation de Fn sur des ligaments de PET LARS[117]. Dans une étude *in vitro*, malgré une absence de différence en termes de densité cellulaire entre les scaffolds avec et sans Fn, ils ont montré que les cellules présentaient un niveau d'expression génique du collagène de type I significativement supérieur avec le revêtement de Fn. Ils ont ensuite pu confirmer *in vivo* la génération d'un néo-tissu ligamentaire lorsque des rats étaient implantés avec le matériau revêtu de Fn. De façon similaire, Lu et al., ont étudié la morphologie cellulaire et la production collagénique de ligaments synthétiques d'acide polyglycolique (PGA), d'acide poly-L-lactique (PLLA) et d'acide polylactique-co-glycolique 82:18 (PLAGA) trempés dans une solution de Fn[118]. L'évaluation *in vitro* de fibroblastes primaires issus de LCA de lapins, ensemencés sur ces matériaux a révélé que malgré une différence initiale entre les 3 matériaux non pré-adsorbés de Fn, il n'y avait pas de différence morphologique cellulaire sur un même matériau lorsque celui-ci était pré-adsorbé ou non de Fn. En revanche, après 7 et 14 jours de culture, les cellules prolifèrent plus sur les matériaux pré-adsorbés et l'apparition de films de collagène peut être observée. Li et al. ont eux étudié la réponse biologique d'un revêtement multicouches d'acide hyaluronique et de gélatine cationisée (HA-CG) sur des ligaments synthétiques en PET LARS[119]. Les résultats *in vitro* ont montré que le revêtement HA-CG améliorait de manière significative l'adhésion cellulaire, facilitait la croissance cellulaire et supprimait l'expression des gènes liés à l'inflammation de fibroblastes dermiques humains après 7 jours de culture. Des expérimentations *in vivo* ont ensuite été conduites avec l'implantation de ces ligaments HA-CG chez des lapins. Les résultats ont montré que ce revêtement inhibait de manière significative l'infiltration cellulaire inflammatoire et favorisait une nouvelle régénération du tissu ligamentaire entre les fibres du ligament synthétique. De plus, la formation de collagène de type I dans le groupe de revêtement HA-CG était beaucoup plus élevée que dans le groupe témoin.

A.2. Immobilisation de séquences de récepteurs membranaires

L'immobilisation de protéines entières de la MEC sur des supports ligamentaires synthétiques est donc une voie d'approche. Cependant, il existe des inconvénients d'utilisation tels que des difficultés de préparation, de purification, l'augmentation du risque infectieux et la dégradation protéolytique de ces protéines *in vivo*. Un autre aspect est le fait que les propriétés physico-chimiques de surface peuvent également causer la dénaturation des protéines ce qui peut engendrer des modifications de conformations non contrôlées et cacher les domaines d'adhésion favorisant l'attachement cellulaire. Ces observations cumulées aux connaissances des interactions entre les récepteurs cellulaires et ces protéines de la MEC, ont conduit au revêtement des surfaces prothétiques par des dérivés peptidiques de type RGD (séquence d'acides aminés Arg-Gly-Asp), qui est pour rappel le domaine de

fixation cellulaire des intégrines, favorisant ainsi l'activation de la voie de signalisation des intégrines et donc l'adhésion cellulaire[116]. Chen et al. ont greffé chimiquement des séquences RGD à la surface de matrice de fibres de soie et ont étudié *in vitro* la réponse cellulaire de CSM[120]. Ils ont pu démontrer la capacité du couple soie-RGD à favoriser l'attachement des CSM, à augmenter la densité cellulaire et à produire une matrice de collagène *in vitro*.

Nous avons pu voir une première approche basée sur l'immobilisation des protéines de la MEC à la surface, une autre basée sur le greffage chimique de peptides présents sur les récepteurs membranaires, il existe encore une approche possible basée sur le contrôle de la formation du film protéique interfacial. Le principe est de réussir à développer une surface qui va contrôler l'adsorption des protéines d'un point de vue de leur nature, leur quantité et surtout leur conformation.

A.3. Modulation de la couche protéique interfacial

Dans les années 90, il était largement admis que la reconnaissance moléculaire dans les systèmes vivants était basée sur le principe d'un système clef-serrure. La reconnaissance d'un ligand par son récepteur devait alors passer par l'ensemble des domaines qui les constituaient. Jozefowicz et al. évoquent alors la possibilité que cette bio spécificité puisse être basée sur une composition aléatoire de monomères fonctionnels appropriés, comportant des arrangements de fonctions chimiques[121]. Ils ont alors mis au point plusieurs systèmes fonctionnels de copolymères aléatoires possédant diverses propriétés biologiques en fonction du type de fonction chimique. Ils ont pu développer des polymères possédant des propriétés anticoagulantes similaires à celles de l'héparine; des polymères qui interagissent spécifiquement avec des composants du système immunitaire; et des polymères qui, au contact des cellules, affectent leur croissance et leur métabolisme. Stanislawski et al. étudient alors la croissance de cellules endothéliales humaines sur des surfaces de polystyrène fonctionnalisées par des groupements sulfonates (SO₃) ou fonctionnalisées par des groupements sulfamide d'acide aminé, plus précisément d'acide aspartique (SO₂-Asp)[122]. Ils observent que les cellules prolifèrent plus sur le polystyrène porteur de groupements sulfonates alors que l'affinité de la Fn pour les deux surfaces étaient la même et que le polystyrène porteurs de groupements sulfamide d'acide aspartique présente un effet anti-coagulant plus élevé. Leur étude les mène à démontrer que la conformation de la Fn est différente sur ces deux surfaces. Ils observent que les cellules endothéliales adhèrent à de multiples domaines de la fibronectine, notamment à un ou plusieurs domaines de liaison avec l'héparine (HBD-I et HBD-II), et pas uniquement au domaine RDG. En raison de la perte d'interactions de stabilisation conformationnelle lorsque la Fn s'adsorbe sur le polystyrène sulfamide d'acide aspartique, les domaines de liaison à l'héparine sont masqués, l'adhésion et la croissance cellulaires n'ont pas lieu.

Dans la continuité de ces travaux, Ciobanu et al., ont mis au point les conditions de greffage du poly(styrène sulfonate de sodium) (poly(NaSS)) à la surface de films de PET par une méthode dite de « grafting from », puis le procédé a été adapté sur des ligaments artificiels en PET LARS[123]–[125]. Après la mise en évidence du greffage et de sa reproductibilité sur ces surfaces par des méthodes de caractérisation tels que le dosage colorimétrique, la mesure d'angle de contact, l'énergie de surface, l'AFM ou encore l'XPS, des essais *in vitro* ont été réalisés. Zhou et al. ont étudié la morphologie et l'adhésion de fibroblastes humains issus de lignée Mac Coy et de cellules primaires de brebis sur des ligaments PET greffés de poly(NaSS) ou non. L'observation des cellules après 4 jours de culture montrait une distribution cellulaire très homogène le long des fibres avec une morphologie plus allongée sur les tissus greffés par rapport aux tissus non greffés[125]. Cette morphologie s'associait à des forces d'adhésion plus élevées des fibroblastes humains sur les surfaces greffées. En effet, la contrainte à appliquer pour détacher 50% des cellules adhérentes était 12 fois supérieure sur les surfaces fonctionnalisées de poly(NaSS) et pré-adsorbées préalablement de Fn et de collagène[124]. Lessim et al. ont étudié la colonisation *in vitro* de ces mêmes structures par des fibroblastes humains issus de LCA rompus. Malgré une absence de différence de prolifération après 7 jours de culture, les résultats d'histologie ont révélé que les cellulesensemencées sur matériaux greffés pénétraient à l'intérieur du ligament synthétique, enrobant ainsi chaque fibre de PET greffée. Les cellules s'orientaient longitudinalement sur les fibres, et l'immunohistologie a révélé que le collagène de type I était mieux organisé et avait une apparence ondulé avec des fibrilles orientées eux aussi parallèlement le long de l'axe des fibres du PET greffé de poly(NaSS)[126].

Par la suite, une première étude *in vivo* a été réalisée chez le rat afin d'évaluer la réaction inflammatoire de tissus de PET greffé de poly(NaSS) en sous cutanée. Après 2 semaines d'implantation, les résultats ont montré que le PET greffé était non-irritant, avec toutefois une participation lymphocytaire et polymorphonucléaire très légèrement supérieure par rapport à celle observée sur le témoin non greffé. Après 8 semaines d'implantation, la réponse inflammatoire était similaire entre les deux surfaces sans signe d'intolérance locale. Aucune réaction inflammatoire supplémentaire n'a été observée avec les ligaments modifiés par greffage chimique de poly(NaSS)[127]. Viateau et al. ont ensuite implanté des ligaments LARS en PET greffés de poly(NaSS) chez des brebis pendant 3 et 12 mois (ANR Ligart). Les résultats obtenus ont permis de démontrer que le greffage de poly(NaSS) favorise la recolonisation cellulaire des fibres de l'implant et que ces cellules fibroblastiques différenciées ont une activité cellulaire proche des cellules natives. Le tissu cellulaire qui entourait les fibres a permis d'assurer une tenue mécanique renforcée durant la période d'implantation, aucune boiterie n'a ainsi été observée à 3 et 12 mois d'implantation[128]. De plus, l'évaluation macroscopique et l'examen cytologique du liquide synovial n'ont pas révélé de

différence entre les implants greffés et non greffés. Dans les deux cas, le liquide était très sérohémostatique à un mois, et se normalisait à trois mois. L'examen cytologique n'a montré aucun débris visibles, cependant une augmentation importante de la cellularité totale et notamment de la proportion de polynucléaires et mononucléaires a été observée. Après 3 mois, ces valeurs sont revenues à des taux physiologiques[129]. Ces implantations ont également permis d'observer que le greffage réduisait significativement l'encapsulation fibreuse du ligament synthétique 12 mois après l'implantation. Sur la partie intra-osseuse, le contact entre le ligament synthétique greffé de poly(NaSS) et l'os était plus important, avec une formation de tissu osseux allant jusqu'au centre du ligament pour les implantations à 12 mois[130]. Le greffage améliore donc l'ostéo-intégration du ligament artificiel dans les tunnels osseux. Parallèlement, l'étude *in vitro* de la minéralisation de ces surfaces a été réalisée avec des ostéoblastes primaires humains. Les résultats ont montré la capacité du greffage de poly(NaSS) à réguler à la hausse la sécrétion d'ALP et à induire un niveau plus élevé de minéralisation, 6 semaines après l'ensemencement[130].

En conclusion, l'ensemble des travaux réalisés sous la supervision du Pr Migonney dans le cadre de l'étude du ligament synthétique en PET LARS greffé de poly(NaSS) a montré que ce traitement de surface, bien qu'il n'a pas modifié la prolifération cellulaire, permet (i) d'augmenter la force d'adhésion des cellules ; (ii) d'observer une meilleure morphologie des cellules qui sont plus étalées et réparties de manière plus homogène ; (iii) d'augmenter la production de collagène de type I qui s'accompagne d'une formation tissulaire ayant une meilleure organisation ; (iv) d'améliorer l'ostéo-intégration de la prothèse avec la génération d'une bonne interface os-implant. Ces résultats permettent de conclure qu'un ligament de nouvelle génération biointégrable et bioactif a ainsi été développé sur la structure du ligament PET LARS®.

B. Facteurs de croissance

Une approche d'ingénierie tissulaire exploitée largement dans la communauté scientifique est l'emploi de facteurs biochimiques, tels que les facteurs de croissance, afin de favoriser la régénération tissulaire. Les facteurs de croissance jouent un rôle important dans la régulation des réponses cellulaires pour le développement des tissus, le maintien de l'homéostasie et la réparation de tissus lésés[116]. À ce jour, divers facteurs de croissance ont été utilisés pour stimuler la prolifération cellulaire, la différenciation et la production de la matrice dans l'ingénierie des tissus musculo-squelettiques. Ces facteurs de croissance sont soit incorporés au scaffold pendant ou après la fabrication, soit directement ajoutés *in situ*. Le choix du facteur employé dépendra du type de cellules employées, du comportement à induire (prolifération, différenciation, formation de MEC ou de vaisseaux sanguins) et de la zone d'étude (partie intra articulaire ou intra-osseuse du

ligament)[116]. Les facteurs de croissance les plus employés dans la régénération du ligament ainsi que les effets qu'ils induisent sont résumés dans le tableau 8. Cependant, ceux qui semblent avoir le plus d'effet sur la réparation du LCA rompu sont TGF- β , FGF et EGF[131].

Facteurs de croissance		Effets induits
Epidermal Growth Factor	EGF	Prolifération, synthèse de la MEC
Fibroblast Growth Factor	FGF	Prolifération, synthèse de la MEC, synthèse de collagène, vascularisation, rigidification
Growth Differentiation Factor	GDF	Prolifération, synthèse de la MEC, migration cellulaire, renforcement mécanique, production de néo-tissus
Insulin-like Growth Factor	IGF	Prolifération, synthèse de la MEC, synthèse de collagène
Platelet Derived Growth Factor	PDGF	Prolifération, synthèse de la MEC, vascularisation, rigidification, amélioration des propriétés structurales
Transforming Growth Factor β	TGB- β	Prolifération, synthèse de la MEC

Tableau 8 : Principaux facteurs de croissance utilisés en ingénierie tissulaire du ligament[65], [90], [116], [132]

Malgré des résultats prometteurs, aucun facteur de croissance ne s'est révélé particulièrement efficace. De toute évidence, le processus de cicatrisation des ligaments est très complexe et le simple ajout de certains facteurs de croissance n'est pas suffisant[132]. Considérant que le milieu entourant le tissu cicatrisant diffère par son emplacement et son évolution dans le temps, une approche plus optimale est recherchée. Cette dernière consiste en l'utilisation de plusieurs facteurs de croissance ensemble qui seraient progressivement et séquentiellement libérés du scaffold de manière régulée dans le temps[116]. En effet, plusieurs études rapportent l'effet synergique de l'utilisation de combinaisons de facteurs de croissance, notamment EGF/TGF- β ou bFGF/TGF- β , délivrés de manière séquentielle ou simultanée[133], [134]. Les principales préoccupations concernant l'utilisation des facteurs de croissance sont leur coût, leur demi-vie très courte qui limite leur efficacité, et leur libération contrôlée sur le site de la lésion[90], [132].

C. Thérapie génique

Les facteurs de croissance cités précédemment peuvent être soit directement administrés en tant que facteur recombinant, soit être administrés via des approches thérapeutiques basées sur le transfert de gènes où les vecteurs de transport codent le facteur de croissance choisi. En effet, la thérapie génique est une autre stratégie intéressante qui consiste à administrer du matériel génétique spécifique à des cellules, des tissus et/ou des organes cibles, au moyen de vecteur de transfert de gènes afin d'améliorer les capacités réparatrices des tissus endommagés dans le temps.

La stratégie de transfert de gènes peut être basée soit sur l'application directe *in vivo* du vecteur de transport (thérapie génique *in vivo*), soit par l'administration de cellules génétiquement modifiées pour favoriser ou diminuer l'expression de certains gènes, notamment ceux des facteurs de croissance (thérapie génique *ex vivo*)[113], [135]. Ce transfert de gènes utilise des vecteurs non viraux ou viraux, chacun présentant des caractéristiques spécifiques[136].

Les vecteurs non viraux sont sûrs, non répliatifs et non immunogènes, ne présentent pas de limitation de taille mais présentent une efficacité de transfert de gènes relativement faible (<40%) et une longévité relativement courte (quelques semaines seulement). Ils sont donc adaptés à une thérapie *ex vivo*[137].

Les vecteurs viraux utilisent la capacité naturelle des virus à pénétrer dans un grand nombre de cellules. Il en existe de plusieurs types, tels que les adénovirus, les virus de l'herpès simplex (HSV), les rétrovirus, les lentivirus et les virus adéno-associés (AAV)[137].

- Les adénovirus et les HSV peuvent directement cibler les cellules à des efficacités très élevées (~ 100%); cependant, ils favorisent une expression des gènes transférés à court terme (quelques jours à un maximum de 1 à 2 semaines) et provoquent des réponses immunitaires fortes.
- Les vecteurs rétroviraux peuvent s'intégrer dans le génome des cellules en division, entraînant une expression persistante du gène transféré mais avec une faible efficacité (<20%) et avec un risque d'induire une mutation génique entraînant l'apparition de tumeur.
- Les vecteurs lentiviraux sont capables de cibler des cellules non-divisées mais proviennent de la même famille que le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) qui est pathogène.
- Enfin les virus adéno-associés (AAV) sont des petits vecteurs recombinants (~ 20 nm) qui peuvent modifier directement les cellules en division avec une efficacité élevée (jusqu'à 100%) sur le long terme (années). Ces vecteurs ne possèdent pas de séquence immunogène, ce qui les rend moins dangereux que les adénovirus par exemple.

Concrètement, le principe de la thérapie génique, consiste à insérer un fragment d'ADN codant pour le facteur de croissance que l'on souhaite sur-exprimer dans l'un des vecteurs cités précédemment : c'est l'étape de « packaging ». Puis il suffit de mettre en contact ces vecteurs contenant le gène d'intérêt avec les cellules : on parle alors de transduction. Le vecteur va en effet pénétrer dans la cellule et fournir son ADN à la machinerie cellulaire qui se chargera de coder la molécule désirée (cf. Fig.28). Le principal avantage des approches de transfert de gènes est que les cellules transduites produisent en permanence des concentrations appropriées de facteurs de croissance fonctionnels [116].

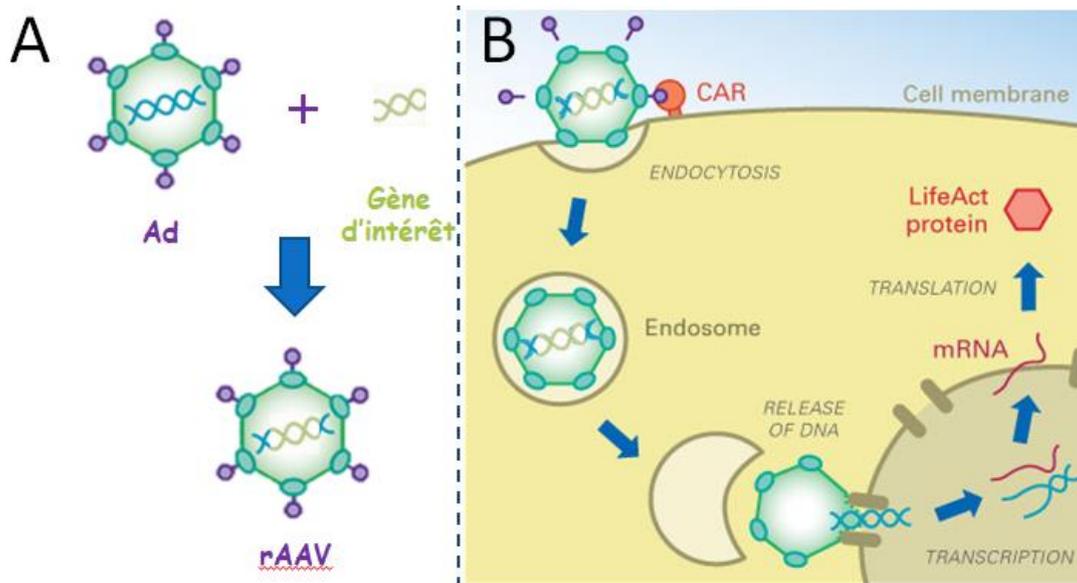


Figure 28 : (A) schéma du packaging d'un gène d'intérêt dans un adénovirus (B) schéma représentant la transduction du rAAV créé au sein d'une cellule

Ainsi Madry et al. ont étudié la prolifération et les activités de régénération de fibroblastes issus de LCA humains transduits avec le gène du facteur de croissance FGF-2 via un virus adéno-associé recombinant. Les résultats ont montré que les cellules produisaient bien du FGF-2 de manière dose-dépendante par rapport à la transduction et sur une longue période (au moins 30 jours). De plus, ce niveau de production du FGF-2 a engendré une prolifération stable et significative des cellules couplée à une production de collagène de type I et III supérieure par rapport au contrôle[138]. À l'heure actuelle, peu d'étude ont été réalisées sur la thérapie génique du LCA avec l'utilisation de facteurs de croissance, mais ce domaine est très développé sur la reconstruction du tendon, du cartilage ou encore de l'os[139].

I-Partie 4 : Bilan bibliographique

La revue de la littérature a permis de faire une mise à jour de l'état de l'art dans le domaine de la reconstruction ligamentaire. Ainsi, si l'on tient compte de la prévalence, du type de population affecté, des conséquences de santé à long terme et du coût sociétal engendré, le modèle de reconstruction ligamentaire le plus couramment étudié est celui de la reconstruction après la rupture du ligament croisé antérieur du genou. Toutefois, l'ensemble des travaux présentés dans ce manuscrit pourra être étendu à la reconstruction de ligaments actuellement pris en charge par l'utilisation de ligaments synthétiques tels que le ligament croisé postérieur du genou, les ligaments coraco-claviculaires de l'épaule, le tendon d'Achille ou encore les ligaments latéraux interne et externe de la cheville.

À l'issue de cette étude bibliographique, on peut résumer et noter les faits et points suivants :

- La difficulté d'auto-cicatrisation du ligament croisé antérieur est liée à sa faible vascularisation, sa faible composition en cellules fibroblastiques et à la perte de sa structure en cas de rupture totale qui entraîne un éloignement des extrémités rompus.
- Bien que l'autogreffe représente actuellement le gold standard pour la réparation d'une rupture ligamentaire, les inconvénients majeurs de son utilisation sont la nécessité de traiter chirurgicalement deux sites anatomiques ce qui augmente le temps opératoire, la possible morbidité du site de prélèvement et une rééducation pouvant être longue et coûteuse ne permettant pas un retour rapide à une activité sportive.
- De nombreux implants synthétiques avec des designs et des matériaux différents ont été développés depuis les années 80. Cependant, hormis le ligament en PET LARS, les autres ligaments proposés sont un échec en termes de biocompatibilité (nombreux cas de synovites), de résistance mécanique (faible résistance à la fatigue, à l'abrasion, ou au délitement, taux de rupture assez élevé) ou de bio-intégration (développement de tissu cicatriciel désordonné, élargissement des tunnels osseux, problèmes de fixation de l'implant).

Malgré tous ces problèmes rencontrés, de nombreux travaux de recherche scientifique continuent de se développer pour offrir des solutions de reconstruction ligamentaire après une rupture du LCA ou du LCP, s'appuyant sur les avantages offerts par les ligaments synthétiques tels qu'une récupération fonctionnelle très rapide et une bonne résistance à la rupture lors de tensions extrêmes du genou.

Les travaux de recherche ont maintenant pour objectif de développer des structures de quatrième génération permettant **de remplacer et de régénérer** les tissus ligamentaires. L'objectif étant de proposer de nouveaux dispositifs capables d'induire et d'améliorer l'adhésion et la prolifération des cellules, de favoriser la croissance de tissus fonctionnels et de présenter un comportement mécanique comparable à celui du tissu du LCA natif. Pour cela, différents matériaux présentant des géométries différentes et/ou des modifications de surface pour les rendre biocompatibles, biointégrables et biodégradables sont proposés et utilisés, nécessitant des connaissances interdisciplinaires en chimie, biologie, mécanique et ingénierie.

Chapitre II – Etudes sur films

Ce chapitre a pour objectif de déterminer quelle poly(ϵ -caprolactone) (PCL) utiliser (masse, pureté) pour élaborer la future prothèse ligamentaire biodégradable.

Deux PCL de masses molaires différentes sont étudiées :

- un polymère de grade technique de masse molaire 60 kg.mol^{-1} commercialisé par Sigma-Aldrich référencé PC60 ;
- un polymère de grade médical de masse molaire 80 kg.mol^{-1} commercialisé par Corbion : référencé PC12.

Afin de pouvoir étudier ces deux grades de PCL sans problématique technique liée à une structure tridimensionnelle, des films de PCL ont été élaborés par la technique de « spin-coating » et les essais réalisés sont présentés dans ce chapitre.

Le choix final de la PCL dépendra (i) de la possibilité de réaliser le greffage radicalaire de pNaSS de façon efficace et reproductible ; (ii) des propriétés physicochimiques intrinsèques ; mais surtout (iii) des impacts en termes de réponse biologique - cytotoxicité, prolifération, morphologie, adhésion, production protéique et expression génique.

Dans le cadre du développement de ce projet, des essais d'implantation chez la brebis sont prévus en tant que modèle « grand animal » de validation en vue d'une investigation clinique chez l'homme. Afin de collecter un maximum de résultats *in vitro*, l'ensemble des essais biologiques de ce chapitre ont été réalisés avec des cellules primaires issues de ligament croisé antérieur de brebis de race Merinos, et plus précisément de femelles âgées de 2 ans, d'environ 60kg et exemptes de dégénération articulaire.

Ce chapitre est divisé en trois parties : la première partie est une étude préliminaire de cytotoxicité ; la deuxième partie présente l'ensemble des résultats obtenus en termes d'impacts physicochimiques et biologiques ; enfin la troisième partie introduit des pistes de réflexion sur le mécanisme de fonctionnement du greffage de pNaSS sur la réponse cellulaire au travers d'essais complémentaires.

II-Partie 1 : étude préliminaire de cytotoxicité

En amont de l'utilisation des cellules primaires de LCA de brebis, la cytotoxicité des deux grades de PCL (PC60 et PC12) a été étudiée sur deux lignées de fibroblastes.

La première lignée, dénommée L929, correspond à des cellules issues de tissu conjonctif sous-cutané de souris. C'est cette lignée cellulaire qui est préconisée dans la norme ISO 10993-5:2009 qui traite de l'évaluation biologique des dispositifs médicaux, et particulièrement des essais concernant la cytotoxicité *in vitro*. En effet, dans le cadre de la future mise sur le marché de la prothèse ligamentaire, le fabricant devra se soumettre à cette réglementation pour pouvoir la commercialiser. Cette même norme définit le caractère cytotoxique d'un matériau lorsque son extrait mis en contact avec les cellules engendre une réduction de plus de 30% de la viabilité cellulaire. Le test de viabilité étant laissé libre de choix, nous avons décidé d'utiliser le test MTT qui permet d'évaluer l'activité métabolique de la population cellulaire étudiée.

Les cellules L929 ont été mises en contact direct – ensemencement des cellules sur le matériau - pendant 24h avec les deux types de PCL, greffés et non greffés de pNaSS, avant réalisation du test MTT comme décrit dans la section « matériels et méthodes » de la partie 2 de ce chapitre. Les résultats obtenus, présentés en Figure 29, montrent un taux de viabilité supérieur à 96% quelle que soit la condition étudiée. **Aucune surface n'est cytotoxique vis à vis des cellules de la lignée L929.** De plus, on peut remarquer que la PC12, PCL de grade médical, qu'elle soit greffée ou non de pNaSS, induit une viabilité cellulaire supérieure à 100%. Les résultats présentés ici ayant été normalisés par le nombre de cellules présentes sur le témoin (cellules sur fond de puits), un taux supérieur à 100% peut s'expliquer par la présence d'une plus grande quantité de cellules sur les films de PCL que sur le fond de puits – ce paramètre sera approfondi par des essais de prolifération. La viabilité des cellules L929 est très légèrement, et non significativement, plus faible sur les films de PC60, PCL de grade technique par comparaison aux films de PC12 sans que l'on puisse considérer une cytotoxicité puisque les pourcentages de viabilité cellulaire sont respectivement égaux à $98,3\% \pm 12,3\%$ pour les films non greffés et à $96,4\% \pm 0,6\%$ pour les films greffés de pNaSS.

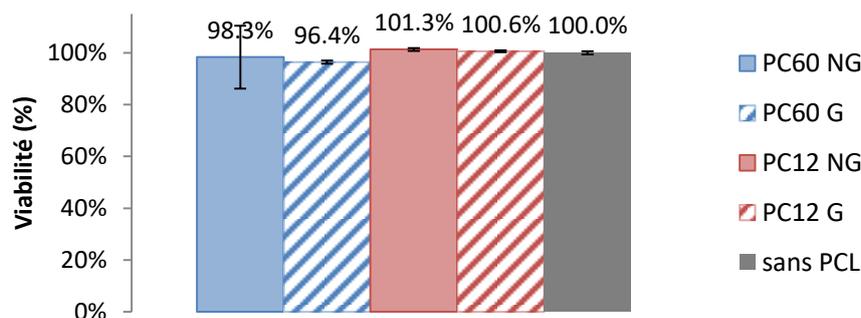


Figure 29 : évaluation de la cytotoxicité des films de PCL sur les fibroblastes L929

La même étude a été réalisée avec des cellules issues d'embryon de souris, lignée NIH3T3. Cette lignée fibroblastique est l'une des plus couramment utilisée car elle est facile à cultiver et sa croissance cellulaire est très rapide (temps de doublement de 20-26 heures). De nombreuses études mécanistiques, y compris d'analyse fonctionnelle des protéines, ont été réalisées avec ces cellules.

Les résultats du test de cytotoxicité vis-à-vis de la lignée NIH3T3 sont présentés en Figure 30. On peut observer que les viabilités cellulaires sont moins élevées, hormis pour la PC60 non greffée, que celles précédemment observées avec la lignée L929. Toutefois, ces valeurs restent supérieures à 90% pour l'ensemble des conditions. **Aucune surface n'est cytotoxique vis-à-vis des cellules de la lignée NIH3T3.** Sur les films de PC12, le greffage ne modifie pas la viabilité cellulaire (viabilité de 95,4% ± 3,2% sur PC12 non greffé (NG) et de 93,6% ± 2,4% sur PC12 greffée (G)). Sur les films de PC60, on observe une diminution de la viabilité cellulaire de 104,0% ± 4,5% sur PC60 NG à 90,8% ± 1,9% sur PC60 G - les films de PC60 ne peuvent toutefois pas être qualifiés de cytotoxiques. Enfin, de manière générale on remarque que les écart-types sont plus importants avec la lignée NIH3T3 qu'avec la lignée L929 mais dans les deux cas les taux de viabilité cellulaire restent très élevés.

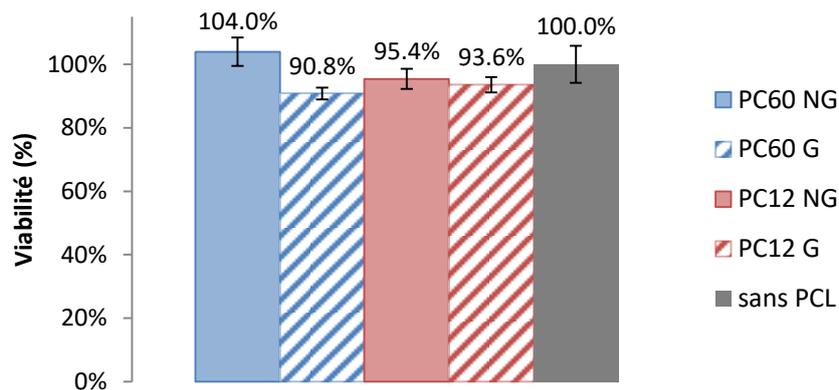


Figure 30 : évaluation de la cytotoxicité des films de PCL sur les fibroblastes NIH3T3

Cette première étude démontre que **les deux grades de PCL, ainsi que le greffage de pNaSS, ne sont pas cytotoxiques vis-à-vis de deux types cellulaires différents.** Il est intéressant de constater que la viabilité cellulaire peut être modifiée, même très faiblement, suivant le type cellulaire utilisé. Cela conforte d'autant plus la décision prise de réaliser l'étude *in vitro* complète sur des cellules primaires issues du tissu que nous souhaitons reconstruire, le ligament croisé antérieur.

II-Partie 2 : Analyse de la réponse cellulaire précoce

II.2.1. Résumé

Les résultats de l'étude de la réponse cellulaire de fibroblastes primaires sont présentés sous forme d'un article intitulé « analyse de la réponse cellulaire précoce de fibroblastes de ligament croisé antérieur de brebis ensemencées sur films de PCL de différentes masses molaires fonctionnalisées par pNaSS » qui a été soumis dans la revue « Materials Science and Engineering : C » en décembre 2018.

L'objectif de cet article est d'**étudier l'impact de la variation de la masse molaire** des deux types de PCL – PC60 et PC12 - **ainsi que le caractère « bioactif » du pNaSS** greffé sur la PCL sur la réponse fibroblastique. La masse molaire est un paramètre essentiel puisque c'est elle qui conditionne la vitesse de dégradation du polymère. Les résultats principaux ainsi que les conclusions de cette étude sont résumés dans les sections suivantes.

A. Caractérisation physico-chimique

L'adaptation du protocole de « spin-coating » qui a permis d'élaborer deux films de taille et d'épaisseur similaires à partir de PCL de différentes masses molaires n'a pas entraîné de différences :

- (i) de la cristallinité des films réalisés (PC60 : $64,1\% \pm 6,5\%$ et PC12 : $64,7\% \pm 3,3\%$) ;
- (ii) de la température de fusion (PC60 : $60,11^\circ\text{C} \pm 0,47^\circ$ et PC12 : $60,78^\circ\text{C} \pm 0,14^\circ\text{C}$) ;
- (iii) de la microstructure (cf. images AFM).

Les deux types de films de PCL ont ensuite été fonctionnalisés par greffage radicalaire thermique par le poly(styrène sulfonate de sodium) (pNaSS). Les taux de greffage déterminés par analyse colorimétrique étaient de $10,5 (\pm 0,06) \mu\text{mol/g}$ pour la PC60 et de $6,82 (\pm 1,88) \mu\text{mol/g}$ pour la PC12. Bien que le greffage ne semble pas aussi efficace sur PC12 que sur PC60, les analyses XPS ont révélé des pourcentages de soufre (S) très proches, respectivement de $1,8\% \pm 0,1\%$ pour la PC60 et de $1,6 \pm 0,1\%$ pour la PC12. Il est également important de souligner que les résultats colorimétriques sur les films de PCL non greffés ont mis en évidence une complexation non spécifique du colorant plus importante sur PC12 (taux de $0,89 (\pm 0,27) \mu\text{mol/g}$) que sur PC60 (taux de $0,70 (\pm 0,27) \mu\text{mol/g}$). Au vu de l'ensemble de ces résultats, le greffage est considéré comme similaire sur les deux types de PCL.

L'impact du greffage radicalaire sur les propriétés intrinsèques des deux films de PCL a été étudié. De manière générale, nous pouvons retenir que le greffage a entraîné une légère diminution, non significative, de la cristallinité de la PCL (de $64,4\%$ à $61,8\%$) et dans le cas de la PC12 une diminution non significative de la masse molaire moyenne en nombre (M_n) de $80481 (\pm 1554) \text{ g/mol}$ pour la

PC12 non greffée à 77221 (\pm 1057) g/mol pour la PC12 greffée de pNaSS. Etant donné la précision des analyses DSC et SEC, il est donc considéré que le greffage n'a pas impacté les caractéristiques physico chimiques des films de PC60 et des films de PC12 de grade médical même si ceux-ci semblent plus sensibles aux effets de la polymérisation radicalaire thermique, avec une diminution de M_n de l'ordre de 4%, ce qui reste très faible, et une augmentation de la taille des sphérolites.

B. Impacts biologiques

B.1. Comparaison de la réponse cellulaire sur les films de PC12 et de PC60

Les résultats de l'étude de la réponse cellulaire ont montré très peu de différences entre les deux types de matériaux PC12 et PC60. En effet, quel que soit le grade de PCL et que le pNaSS soit greffé ou non, la viabilité des cellules primaires de LCA de brebis était toujours supérieure à 97%. La densité cellulaire des cultures, calculée à partir des images morphologiques, était similaire entre PC60 et PC12, tout comme la sécrétion des facteurs de croissance FGF-2 et TGF- β . Dans les deux cas, la présence de la PCL activait fortement (i) la production très précoce - jour 5 de culture - de FGF-2, qui diminuait ensuite au jour 7 de culture pour rejoindre le même taux que le contrôle ; (ii) la production continue de TGF- β significativement supérieure à celle des cellules « contrôles » pour les deux jours de culture étudiés. Enfin, le même profil d'expression des trois gènes étudiés (Col I, Col III et TNF- α) a été observé sur PC60 et PC12, avec une expression plus faible au jour 5 suivi d'une augmentation au jour 7. À noter cependant que la surproduction des facteurs de croissance n'a pas été suffisante pour améliorer l'expression des collagènes de type I et III par rapport au témoin (niveaux similaires au jour 7).

Malgré des résultats de réponse cellulaire très proches entre les deux types de PCL, certaines divergences ont pu être observées. En effet, bien que la vitesse de croissance des cellules ensemencées sur PCL soit plus faible que pour le contrôle (temps de doublement de la population de 8 jours contre 5,2 jours), cette croissance était plus rapide et plus proche de celle du contrôle pour les films de PC12 (temps de doublement de la population de 6,4 jours). Par ailleurs, un effet opposé a été observé dans l'expression du gène de TNF- α , montrant une surexpression de ce gène en présence de PC60 et une sous-expression en présence de PC12 par rapport aux cellules contrôles ensemencées sur fonds de puits.

En conclusion, les données ont globalement démontré un **meilleur contrôle de la réponse cellulaire sur PC12** avec des écart-types plus resserrés pour l'ensemble des résultats et surtout une **absence de réponse inflammatoire significative avec la PCL de grade médical**.

B.2. Influence du greffage de pNaSS

Les observations principales quant à l'apport du greffage de pNaSS sur la réponse cellulaire précoce sont les suivantes :

- (i) une augmentation de la vitesse de croissance cellulaire (uniquement sur PC60 greffé) ;
- (ii) une distribution cellulaire plus homogène dans les cultures ;
- (iii) une densité cellulaire significativement plus élevée après 7 jours de culture ;
- (iv) un cytosquelette d'actine plus développé à tous les temps de culture ;
- (v) et un maintien de l'effet de surproduction de FGF-2 et de TGF- β . De plus, sur PC12, tous les gènes étudiés étaient plus exprimés au jour 5 par rapport aux matériaux non greffés et étaient similaires au jour 7. Pour la PC60, de manière générale, le même niveau d'expression génique a été observé avec ou sans pNaSS.

D'autres expériences, réalisées uniquement sur les films de PC12, ont démontré que le greffage de pNaSS favorisait significativement l'adhésion précoce des cellules - après 30 minutes de contact seulement. Cette adhésion statique était couplée à une augmentation sensible ($\sim 1,5$ fois) de la force d'adhésion cellulaire sur PC12 G, cet effet étant maintenu dans le temps jusqu'à 4 heures. Toutefois, bien que les cellules aient été plus fortement attachées à la surface, cette adhésion très précoce ne s'est pas traduite par des niveaux de prolifération et d'expression génique plus élevés au cours des premiers jours de culture. En effet, 7 jours ont été nécessaires pour observer des impacts significatifs sur l'ensemble de la réponse cellulaire. En conséquence, il apparaît intéressant d'étudier la réponse cellulaire à des temps de culture plus longs.

Enfin, la dernière partie des résultats présentés dans cet article concernaient le mécanisme d'adhésion des cellules lorsque le pNaSS est présent à la surface. En effet, historiquement, il a été démontré sur d'autres matériaux que la bioactivité observée sur les surfaces greffées de pNaSS était médiée par les interactions cellule/protéine/surface. Les résultats obtenus sur PC12 greffé ont révélé qu'il n'y avait pas de différence significative en termes d'adhérence en présence de surfaces pré-adsorbées de collagène de type I ou de fibronectine. En revanche, lorsque les surfaces sont pré-adsorbées avec du plasma ou du fibrinogène les forces d'adhésion cellulaire étaient significativement accrues – ceci montre que le fibrinogène est probablement impliqué dans les interactions cellule/surface comme cela avait été montré sur le PET greffé de pNaSS par Ciobanu et al.

En conclusion, cette étude montre que la **bioactivité induite par la présence de pNaSS médiée par les interactions cellule/protéine/surface était observable sur la surface PCL**. Les études précédentes réalisées au LBPS sur des surfaces métalliques et un polymère non dégradable avaient mis en évidence le rôle majeur de la conformation de la fibronectine dans la modulation de la réponse

cellulaire. Dans cette étude, le pNaSS greffé sur PCL semble plutôt moduler la conformation du fibrinogène. Enfin, nous pouvons conclure que **les effets observés sur la morphologie des cellules et les différences d'adhérence sont liés à la présence du pNaSS lui-même et non au type de surface utilisé.**

II.2.2. Article soumis à la revue scientifique « Materials Science and Engineering : C »

Analysis of early cellular responses of anterior cruciate ligament fibroblasts seeded on different molecular weight polycaprolactone films functionalized by a bioactive poly(sodium styrene sulfonate) polymer

Amélie Leroux¹, Jagadeesh K. Venkatesan², David G. Castner³, Magali Cucchiarini², Véronique Migonney^{1,*}

¹Laboratory of Biomaterials and Polymers of Specialty, UMR CNRS 7244, Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France

²Center of Experimental Orthopaedics, Saarland, University Medical Center and Saarland University, Homburg/Saar, Germany

³National ESCA and Surface Analysis Center for Biomedical Problems (NESAC/Bio), Departments of Bioengineering and Chemical Engineering, University of Washington, Box 351653, Seattle, WA, USA

*Corresponding author

E-mail: veronique.migonney@univ-paris13.fr

Keywords

Anterior cruciate ligament; tissue engineering; polymer; functionalization

Abstract

With the growing number of anterior cruciate ligament (ACL) ruptures and the increased interest for regenerative medicine procedures, many researches concentrate on developing bioactive and biodegradable synthetic ligaments. In this regard, the choice of raw material with appropriate physicochemical characteristics and long term degradation features is essential. Polycaprolactone (PCL) presents the advantage to very slowly degrade itself following its molecular weight. This article evaluates two PCL materials, a technical (PC60: 60 kDa) versus a medical grade one (PC12: 80 kDa), both functionalized (or not) with poly(sodium styrene sulfonate) (pNaSS). After assessing the impact of the grafting process on the physicochemical properties, sheep ACL fibroblast responses were investigated. A better cell control in PC12 associated with an absence of inflammatory gene expression (TNF- α) was observed compared with PC60 films. Both types of films led to an overproduction of FGF-2 and TGF- β compared with the controls on day 5 and demonstrated collagen gene expression profiles similar to that of controls on day 7. Upon protein adsorption, pNaSS grafting caused a rapid cell adhesion (from 30 min) cumulated with an increase in adhesion strength (1.5-fold higher). Moreover, after 7 days, an increase in cell density and an important actin network development were noted.

Introduction

With one afflicted person for 3,000 in the United States, namely 120,000 surgical reconstructions per year, the anterior cruciate ligament (ACL) is one of the most commonly injured ligaments of the knee [34]. In addition to the pain associated with the ACL rupture, patients have to face long-term consequences such as a decrease in their sports activity level, a high risk of recurrence and clinical sequelae including meniscal tears, chondral lesions, and an increased risk of early post-traumatic osteoarthritis [37]. Nowadays, when a ligament surgical intervention is needed, the gold standard used is the autograft. Nevertheless, this technique requires taking off the graft from a different anatomic area which increases the operative time and may lead to a possible morbidity of the sampling site [140].

With an increase in ruptures over the last decades, especially in women [39] and in light of the availability of tissue engineering procedures, growing research focused on the development of biodegradable synthetic ligaments [118], [93], [76], [26], [141], [23]. The main objective of the present study was to create a biodegradable structure supporting the ligament functions that allow

for neo-ligament formation. To achieve this goal, we focused on using polycaprolactone (PCL), a long-term degradation, semi-crystalline polymer with a glass transition temperature (T_g) of -60°C and a melting temperature (T_f) of $59-64^\circ\text{C}$ depending on its crystallinity [100]. Such low melting temperature makes PCL an easily workable material at relatively low temperatures so that its crystallinity may be modulated upon shaping treatments. Furthermore, its degradation rate is related to its molecular weight and can be up to four years. The number average molecular weight (M_n) of PCL structures generally range from 3,000 to 80,000 g/mol [100]. Consequently, several raw PCL are available and a multitude of final constructs can be produced in terms of physicochemical features as well. Within the scope of developing a new prosthesis, the choice and the characterization of the polymer used is essential.

In addition, in order to faster recreate a neo-ligament and increase the bioactivity of a synthetic material, many researchers resort to surface modification. Two common approaches are used: (i) coating or (ii) chemical modification of the surface. Regardless of the method of surface treatment employed, the choice of the molecule of interest is crucial. Some scientists seek to immobilize directly extracellular matrix (ECM) proteins to the surface including fibronectin (Fn) and hyaluronic acid [118], [119], [117] while others use only specific sequences of proteins as the RGD sequences [120], [116] and some use synthetic biomolecules [121], [122], [142]. With the aim of ligament reconstruction and in continuity of already developed bioactive synthetic ligament [125], [126], [130], the current study focused on the functionalization of PCL surfaces by poly(sodium styrene sulfonate) (pNaSS).

While different studies emphasized the biological impact either of different physicochemical features of the surface, as for instance the impact of the crystallinity [143], or of the bioactive effect of a specific molecule [144], few considered jointly these two aspects. In order to choose the best PCL raw material coupled with a bioactive molecule for the ligament regeneration, we evaluated the early cellular responses of ACL fibroblasts seeded on two different molecular weight PCL films functionalized or not by pNaSS. Two PCL materials were studied: one technical grade with a lower molecular weight than the second which is a medical grade. Both were successfully grafted with pNaSS. We hypothesized that the grafting did not impact the physicochemical characteristics of PCL. Biologic responses including cytotoxicity, proliferation, morphology, growth factor production, gene expression, and cell adhesion were studied. To generate a new ligament, our future prosthesis may need to promote ECM synthesis. Therefore, we examined the production of the basic fibroblast growth factor (FGF-2) and transforming growth factor beta (TGF- β) for their pro-anabolic activities of collagen production [131], especially type-I and type-III collagen [18]. Potential inflammatory responses to the materials were also monitored by investigating the tumor necrosis factor alpha

(TNF- α) gene expression profiles. We tested the hypothesis that the medical grade material allowed to generate optimal cellular responses. The pNaSS grafting is as for it expected to manage and to favor the cell activities. Finally, cell adhesion assays were performed to evaluate the working mechanism of this bioactive polymer.

Materials and methods

Sample preparation

PCL film spin-coating

Two different types of PCL films were casted using a spin-coating method. Raw PCL pellets either from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) (sku. 704105, i.e. PC60) or from Corbion (Amsterdam, The Netherland) (sku. Purasorb PC12, medical grade) were dissolved in a dichloromethane solution (30%, w/v) under stirring for several hours. When the viscous solution was homogenous, it was dropped onto a glass slide and then spun for 30 sec either at 1,500 rpm (PC60 films) or at 1,000 rpm (PC12 films) using a SPIN150-v3 SPS. The shaped films were let overnight at air pressure and room temperature for natural evaporation of the solvent. Thanks to a punch, the crude films were cut in smaller films of 14-mm diameter and then placed at 4°C until further experiments.

Grafting of poly(sodium styrene sulfonate) (pNaSS) on PCL films

Purification of the NaSS monomer

Sodium 4-vinylbenzenesulfonate salt (sku. 94904, Sigma-Aldrich) was purified by recrystallization in a mixture solution of ethanol-distilled water (90:10, v:v). Typically, 90 g NaSS were dissolved in 1,780 mL of the mixed solvent at 70°C overnight. The mixture was then filtrated and the filtrate placed at 4°C for 48 h. After final filtration, the filter cake (recrystallized NaSS) was collected, vacuum-dried 6 h at 30°C, and kept at 4°C until further experiments.

Thermal grafting

The PCL films were functionalized with polyNaSS using a grafting "from" technique. 6 PCL films (14-mm diameter) were placed in 100 mL of distilled water and ozonated for 20 min at 30°C under stirring. Ozone was generated using an ozone generator BMT 802 N (ACW) with a gas pressure of 0.5 bars and an oxygen flow rate of 0.6 L.min⁻¹. Next, the ozonated PCL samples were transferred in a degassed aqueous NaSS solution (15%, w/v) under argon and maintained for 1 h at 45°C under stirring to allow for radical polymerization of the monomer. The samples were then extensively washed with distilled water for 48 h and then vacuum-dried.

Preparation of the samples for cell culture

Prior to the experiments, all PCL films were packaged and sterilized as follows: 2x washing (3 h in 1.5 M NaCl), 1x washing (10 min in ultra-pure water), 2x washing (3 h in 0.15 M NaCl), 1x washing (10 min in ultra-pure water), 1x washing (3 h in DPBS (Gibco, Carlsbad, USA)), 20 min in 70% ethanol, 10 min in ultra-pure water, and 15 min UV irradiation (both sides of the samples). All washing steps were performed under stirring. The PCL films were kept in sterile PBS solution at -20°C until further experiments. The samples were then slowly defrozen and placed overnight at 37°C under 5% CO₂ in DMEM (Gibco) without supplementation followed by an overnight incubation at 37°C under 5% CO₂ in DMEM supplemented with 10% FBS except for the adhesion tests (supplementation with different protein solutions).

Chemical characterization

Determination of molecular weights

The PCL number average molecular weight (M_n), weight average molecular weight (M_w), and polydispersity index (PDI) were determined by size exclusion chromatography (SEC) analysis using a Shimadzu Prominence instrument LC20AD pump equipped with a SIL-20A auto sampler and a Shimadzu RID-10A differential refractive index detector (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany). The samples were dissolved in tetrahydrofuran (ROTISOLV CLHP, Roth Sochiel EURL, Lauterbourg, France) at 5 mg.mL⁻¹ and eluted through 2 columns (phenomenex phenogel, Torrance, USA). A conventional calibration curve was generated using a series of narrow polydispersity poly(methyl methacrylate) standards. Three samples were analyzed per condition.

Differential scanning calorimetry method

Differential scanning calorimetry (DSC) analyses were carried out with a DSC 8000 calorimeter (Perkin Elmer, Waltham, USA) under nitrogen atmosphere. The samples were scanned once from -80°C to 100°C at a heating rate of 10°C.min⁻¹. The glass transition temperature (T_g), melting temperature (T_m), and melting enthalpy (ΔH_m) of the PCL films were determined from the first scan. The glass transition temperature was assessed using the midpoint method (temperature at which the measured curve is equidistant between the upper and lower tangents). The melting temperature was taken at the maximum of the peak. The melting enthalpy was calculated as the melting peak area surface. The degree of crystallinity (X_c) was calculated according to Eq.1:

$$X_c = \Delta H_m / \Delta H_{m0} \times 100$$

Where ΔH_{m0} stands for the melting enthalpy of 100% crystalline PCL (ΔH_{m0} = 135.44 J.g⁻¹)[145].

Atomic force microscope

Atomic force microscope (AFM) images of the PCL films surface were acquired on air in the ScanAsyst mode using a MultiMode 8 AFM microscope (Bruker, Billerica, USA) and the NanoScope Analysis 1.8 software (Bruker). The regions of interest for scanning were selected based on the view of a sample in the built-in optical microscope of the AFM instrument setup.

Colorimetric method

The evidence of the pNaSS grafting was tested using the toluidine blue colorimetric assay. The method described by Ciobanu *et al.* was adapted as follows: an aqueous solution of toluidine blue (Roth Sochiel EURL) was prepared at 5×10^{-4} M and drops of 1 M NaOH was slowly added to reach and maintain the pH solution value of 10.0 ± 0.1 . Samples were immersed in 5 mL of this solution at 30°C for 6 h. The stain complexed with the anionic groups of the pNaSS grafted on the surface of the films. After incubation, the samples were removed and washed three times in 5 mL of 10^{-3} M NaOH for 5 min in order to remove non-complexed molecules. Each film was placed in 10 mL of aqueous acetic acid solution (50%, v/v) for 24 h at room temperature to obtain the complete de-complexation of toluidine blue. The decomplexation solution was analyzed by UV/visible spectroscopy (Perkin Elmer lambda 25 spectrometer, Waltham, USA) at 633 nm. On the grafted surfaces, 1 mole of toluidine blue was assumed to complex 1 mole of sulfonate group of pNaSS. The grafting rate (GR) was then calculated according to Eq.2:

$$GR \text{ (mol/g)} = (OD \cdot V) / (\epsilon \cdot l \cdot m)$$

where OD is the optical density, V the aqueous acetic acid volume (L), ϵ the extinction coefficient of toluidine blue solution ($L \cdot \text{mol}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$), l the length of the spectrophotometer tank (cm), and m the mass of the PCL films (g). The extinction coefficient was calculated based on a dilution curve using the initial toluidine blue solution.

X-Ray photoelectron spectrometry (XPS) analysis

All spectra were taken on a Surface Science Instruments S-probe spectrometer that has a monochromatized Al K α X-Ray and a low energy electron flood gun for charge neutralization of non-conducting samples. The samples were fastened to the sample holder on double-sided tape and run as insulators. X-Ray spot size for these acquisitions was approximately 800 μm . Pressure in the analytical chamber during spectral acquisition was less than 5×10^{-9} Torr. Pass energy for survey spectra (to calculate composition) was 150 eV and pass energy for high resolution scans was 50 eV. The take-off angle (angle between the sample normal and the input axis of the energy analyzer) was

approximately 0°. This take-off angle corresponds to a sampling depth of approximately 100 Å. The Service Physics Hawk Data Analysis Software was used to determine peak areas, to calculate the elemental compositions from peak areas above a linear background, and to peak fit the high resolution spectra. The binding energy scales of the high-resolution spectra were calibrated by assigning the lowest binding energy C1s high-resolution peak a binding energy of 285.0 eV. Three spots were analyzed on each sample. Analysis included a survey spectrum, detail spectra of Na, S, and Si, and a high resolution spectrum of the C1s peak from one spot of each sample.

Cell culture analyses

Isolation and culture of primary sheep anterior cruciate ligament fibroblasts

Anterior cruciate ligaments (ACL) were isolated from one sheep (2-year old female Merino sheep free of degenerative joint disease, ~ 60 kg) in accordance with the German legislation on protection of animals and the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [NIH Publication 85-23, Rev. 1985], and as approved by the local governmental animal care committee[146]. Tissues were cut into small pieces of 1-2 mm², washed three times in DPBS, and incubated in a 0.1% (w/v) collagenase (Sigma-Aldrich) for 6 h at 37°C under 5% CO₂. The mixture solution was centrifuged 3 min at 1,500 rpm. The supernatant was withdrawn and the clot resuspended in DMEM complemented with 10% bovine calf serum (BCS) (Sigma-Aldrich), 1% penicillin-streptomycin (Gibco), and 1% L-glutamine (Gibco). The primary sheep ACL (sACL) fibroblasts were maintained in T-75 flasks until confluence was reached. pNaSS-grafted and ungrafted PCL films were placed on the bottom of a 24-well plate using Teflon inserts. The cells were then seeded at a density of 5 x 10⁴ cells/well and cultured at 37°C under 5% CO₂ over the time of experiment.

Cell viability

sACL fibroblasts were maintained on PCL films for 24 h in DMEM complemented with 10% serum. The medium was removed and the samples carefully placed in new wells, washed once with PBS and 500 µL of MTT solution (Sigma, Saint Louis, USA) at final concentration of 1 mg.mL⁻¹ diluted in fresh culture medium without phenol red was added. The seeded samples were incubated for 4 h at 37°C in MTT solution. The supernatant was then discarded and 350 µL of DMSO was added to each well for 10 min at room temperature. Each well was thoroughly mixed and the absorbance was read at 570 nm. The percentage of live cells in presence of the PCL films was calculated using a calibration curve between the number of cells and the corresponding absorbance.

Cell proliferation

sACL fibroblasts were maintained on PCL films for 1, 3, or 7 days in DMEM complemented with 10% serum. The medium was then removed and the samples carefully placed in new wells, washed twice with PBS, and a solution of 0.05% trypsin-EDTA (Gibco) was added for 10 min at 37°C. DMEM supplemented with serum was added and thoroughly mixed in each well for cell harvesting and counting using a Scepter 2.0 Cell Counter (Merck-Millipore, Billerica, USA). The cell doubling time (DT) was calculated according to the formula:

$$DT = (T - T_0) \cdot \ln(2) / (\ln(N) - \ln(N_0))$$

Where $T - T_0$ is the duration of culture in hours between the initial seeded time T_0 and the observation time T , N_0 is the number of cells at time T_0 and N is the number of cells at time T .

Histological and fluorescence analyses

sACL fibroblasts were harvested, fixed for 30 min with 4% formaldehyde, and rinsed twice with PBS. For histological analyses (hematoxylin and eosin - H&E - staining), hematoxylin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) was first added to each well for 10 min. The wells were then washed once with distilled water and a solution of 1% HCl was briefly added. Prewarmed water (60°C) was added for 4 min, followed by addition of hematoxylin for 3 min, removal, and washing once with distilled water. Eosin (Carl Roth GmbH) was then incubated for 2 min and extensively washed with distilled water. Stained samples were kept at 4°C until observation under a light microscope (Olympus BX 45, Hamburg, Germany). For fluorescence analyses, the cells were fixed and the samples washed once with PBS and once with 3% bovine serum albumin (BSA)/PBS (Acros Organics, Geel, Belgium). The cells were then permeabilized with 0.1% Triton-X 100 in PBS for 5 min at room temperature. After two washes in PBS, the samples were incubated in 3% BSA/PBS for 1 h at room temperature. The cells were then incubated with Fluorescein Phalloidin (FITC, Molecular probes, Eugene, USA) at 1:40 in 1% BSA/PBS for 1 h at room temperature in the dark. After two washes in PBS, 2% 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dissolved in distilled water was added for 10 min at room temperature. The samples were stored in distilled water at 4°C until observation under a fluorescent microscope (Olympus CKX41).

Immunoassay

Production of the basic fibroblast growth factor (FGF-2) and transforming growth factor beta (TGF- β) was monitored by specific ELISAs (FGF-2 Quantikine ELISA - DFB50 - and TGF- β Quantikine ELISA - DB100B, both from R&D Systems, Wiesbaden, Germany) according to the manufacturer's protocols. Cell culture supernatants were collected at the denoted time points 24 h after change to conditioned

medium. Absorbances were measured with a GENios spectrophotometer (Tecan, Crailsheim, Germany).

Total RNA extraction and real-time RT-PCR analyses

Cells were detached using trypsin-EDTA at 0.05% (Gibco) and collected via centrifugation for 8 min at 5,000 rpm. Total cellular RNA was extracted using the RNeasy Mini Kit with an on-column RNase-free DNase treatment (Qiagen, Hilden, Germany). Reverse transcription was carried out using the 1st Strand cDNA Synthesis kit for RT-PCR (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) and cDNA products were amplified by real-time PCR on an Mx3000P QPCR operator (Stratagene Agilent Technologies, Waldfronn, Germany) with the Brilliant SYBR Green QPCR Master Mix (Stratagene Agilent Technologies) using the following conditions: denaturation (95°C, 10 min), amplification by 70 cycles (denaturation at 95°C, 30 s; annealing at 55°C, 1 min; extension at 72°C, 30 s), denaturation (95°C, 1 min), and final incubation (55°C, 30 s). The primers (Invitrogen GmbH, ThermoFisher Scientific, Karlsruhe, Germany) used were type-I collagen (ligament marker) (forward 5'-ACGTCCTGGTGAAG TTGGTC-3'; reverse 5'-ACCAGGGAAGCCTCTCTCTC-3'), type-III collagen (ligament marker) (forward 5'-CACAAAGGAGTCTGCATGTCT-3'; reverse 5'-GTTCACCAGGCTCACCAGCA-3'), and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) (marker of inflammation) (forward 5'-AGAACCCCTGGAGATAACC-3'; reverse 5'-AAGTGCAGCAGGCAGAAGAG-3'), and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (housekeeping gene and internal control) (forward 5'-GAAGGTGAAGGTCGGAGTC-3'; reverse 5'-GAAGATGGTGATGGGATTC-3') (all 150 nM final concentration). The threshold cycle (Ct) value for each gene of interest was measured for each amplified sample by using the MxPro QPCR software (Stratagene Agilent Technologies) and values were normalized to GAPDH expression by using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method.

Adhesion assay

PC12 samples were incubated at 37°C during 2 h in DMEM complemented with either 10% FBS, Fn (20 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), collagen (7 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$), plasma (10%), or fibrinogen (0.3 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). 5×10^4 sACL fibroblasts were then seeded on the proteins pre-adsorbed PCL films and incubated for 15 min, 30 min, 1 h, 2 h, or 4 h at 37°C under 5% CO₂. The supernatants were collected and the non-adhesive cells (N1) were counted using a Scepter 2.0 Cell Counter (Merck-Millipore). The samples with adhesive cells were centrifugated for 15 min at 140, 280, or 360 rpm (respectively 6, 17.5, or 25.5 dynes/cm²). Cells removed by the applied force (N2) were counted and the remaining adhesive cells (N3) were collected by incubation with 0.05% trypsin-EDTA (Gibco) for 10 min at 37°C and counted. The percentages of adhesive cells under static and dynamic conditions were determined as follows:

$$\%_{\text{static adhesive cells}} = \frac{N2 + N3}{N1 + N2 + N3} \times 100$$

$$\%_{\text{dynamic adhesive cells}} = \frac{N3}{N2 + N3} \times 100$$

Statistical analysis and software's

All the experiments were carried out a minimum of three times except for the morphology study which was performed using one sample per condition and for the adhesion assay with several proteins which was done using two samples per condition. Statistical analyses were performed using ANOVA with $p \leq 0.05$ considered statistically significant. The cell densities were measured with the Image J software (Wayne Rasband, Bethesda, USA) based on at least three different images.

Results

Chemical characterization

Comparison of PC12 and PC60 films

The PC60 films were characterized by a M_n value of $60,614 \pm 743 \text{ g.mol}^{-1}$ and a PDI of 1.29 ± 0.01 , while the PC12 films exhibited a M_n value of $80,481 \pm 1,554 \text{ g.mol}^{-1}$ and a PDI of 1.26 ± 0.02 (Table 9). Neither the glass transition temperature (T_g) nor the melting point temperature (T_f) were significantly different between the two types of films and were relevant from values found in the literature, with a T_g around -60°C and a T_f around $+60^\circ\text{C}$ (Table 10). The percentage of crystallinity (ratio between amorphous and crystalline parts) was of $64.1 \pm 6.5\%$ for the PC60 films and of $64.7 \pm 3.3\%$ for the PC12 films (Table 10). The observation of the microstructure was consistent with these DSC analyses. The shape of the spherulites pointed out by AFM did not vary (Fig. 31A and 31B). Despite the average length of the molecular chains, both PCL films were homogeneously casted with a PDI close to 1. They had the same proportion of amorphous and crystalline parts in total with a similar percentage of crystallinity and the same microstructure.

Films	M_n (g/mol)	M_w (g/mol)	PDI
PC60 (NG)	60.614 ± 743	77.958 ± 800	1.29 ± 0.01
PC60 (G)	60.262 ± 1.027	77.532 ± 1.008	1.29 ± 0.01
PC12 (NG)	80.481 ± 1.554	97.677 ± 489	1.26 ± 0.02
PC12 (G)	77.221 ± 1.057	98.909 ± 246	1.28 ± 0.01

Table 9. Molecular weights of the films (NG: non-grafted films; G: grafted films; M_n : average weight; M_w : molecular weight; PDI: polydispersity index).

Films	T_g (°C)	T_f (°C)	ΔH (J/g)	χ (%)
PC60 (NG)	-61.46 ± 0.47	60.11 ± 0.47	86.85 ± 8.85	$64.1\% \pm 6.5\%$
PC60 (G)	-59.70 ± 0.61	60.93 ± 0.14	83.75 ± 11.19	$61.8\% \pm 8.3\%$
PC12 (NG)	-60.89 ± 0.04	60.78 ± 0.14	87.67 ± 4.24	$64.7\% \pm 3.3\%$
PC12 (G)	-62.17 ± 0.46	61.20 ± 0.05	83.62 ± 4.44	$61.7\% \pm 3.3\%$

Table 10. DSC analysis of the films (NG: non-grafted films; G: grafted films).

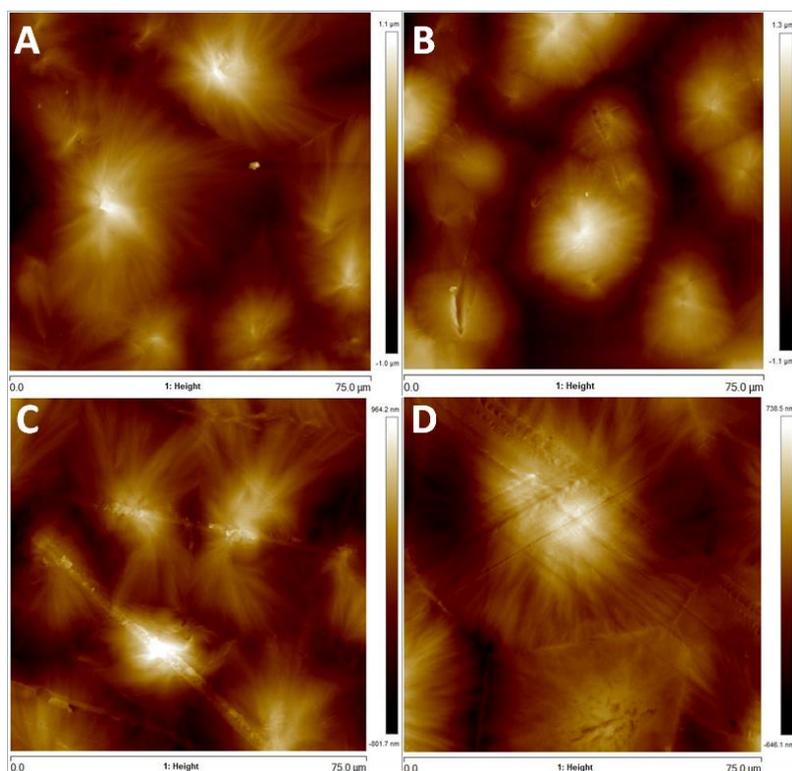


Figure 31. AFM images of (A) a non-grafted PC60 film, (B) a non-grafted PC12 film, (C) a grafted PC60 film, and (D) a grafted PC12 film.

Characteristics of pNaSS grafting

The presence of pNaSS molecules grafted on the films was assessed by a colorimetric method (toluidine blue assay) and by XPS analysis. The toluidine blue assay gave a grafting rate (GR) of $10.5 \pm 0.06 \mu\text{mol.g}^{-1}$ for the PC60 films and of $6.82 \pm 1.88 \mu\text{mol.g}^{-1}$ for the PC12 films (Table 11). Negative controls (natural fixation of toluidine blue molecules to the polymer itself) were performed using both types of non-grafted films. The values obtained were negligible compared with the grafted samples. The analysis of the sample surfaces by XPS confirmed the presence of sulfur atoms for the grafted compared with the non-grafted films (Table 11). The GR values obtained by sensitive toluidine blue assay correlated well with the percentages of sulfur atoms measured by XPS. In both types of films, the presence of sulfur atoms was linked to a decrease in carbon concentration and to an increase in oxygen concentration (Fig. 32). This observation confirmed the mechanism of grafting

presented by Ciobanu et al. [123] and Rohman et al. [147] which started with an oxidation of the surface to generate peroxide and hydro-peroxide functions followed by radical polymerization of NaSS.

Films	GR ($\mu\text{mol/g}$)	XPS atomic concentration (%)					
		C 1s	O 1s	S 2p	Na 1s	Si 2p	Others
PC60 (NG)	0.70 ± 0.27	72.1 ± 0.9	22.7 ± 0.9	-	-	3.4 ± 0.1	trace N 1s. F 1s. Sn 3d5
PC60 (G)	10.5 ± 0.06	61.4 ± 0.7	29.6 ± 0.8	1.8 ± 0.1	0.9 ± 0.1	1.5 ± 0.4	trace Mg 2s. Sn 3d5
PC12 (NG)	0.89 ± 0.27	74.4 ± 0.7	24.2 ± 0.3	-	-	1.1 ± 0.3	trace F 1s
PC12 (G)	6.82 ± 1.88	56.2 ± 1.2	31.7 ± 0.3	1.6 ± 0.1	0.7 ± 0.1	2.1 ± 0.1	trace Al 2s. Mg 2s

Table 11. Grafting rates (NG: non-grafted films; G: grafted films; GR: grafting rate; XPS: X-Ray photoelectron analysis).

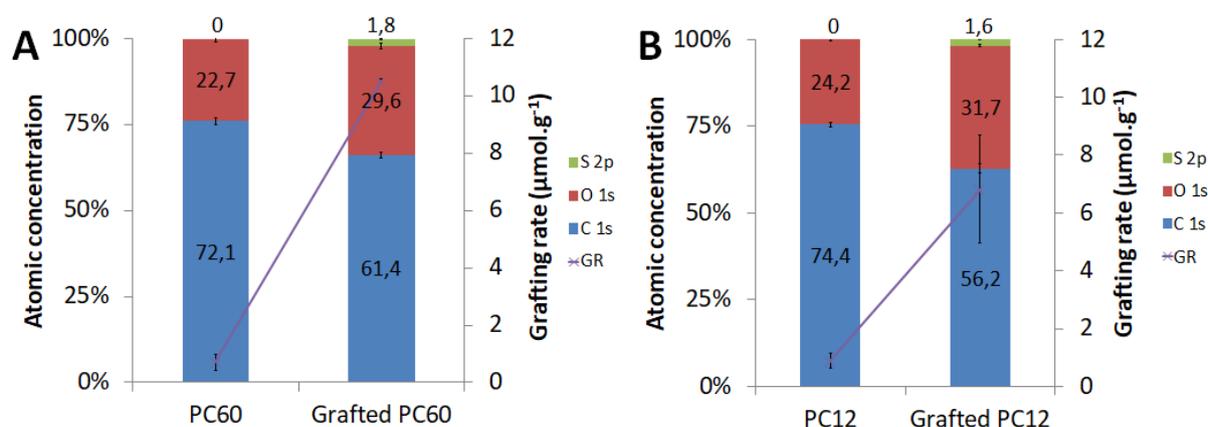


Figure 32. Evolution of atomic concentration percentages of the (A) PC60 and (B) PC12 films (GR: grafting rate).

Impact of pNaSS grafting on the PCL structure

The radical grafting of pNaSS did not modify the M_n value of the PC60 films nor their PDI (Table 9). Nevertheless, the thermal analysis revealed a slight increase in T_g from $-61.46 \pm 0.47^\circ\text{C}$ to $-59.70 \pm 0.61^\circ\text{C}$ and a slight increase in T_f from $60.11 \pm 0.47^\circ\text{C}$ to $60.93 \pm 0.14^\circ\text{C}$ (Table 10). The percentage of crystallinity decreased from $64.1 \pm 6.5\%$ to $61.8 \pm 8.3\%$, but without reaching significance ($p > 0.05$) and the observation of the AFM images of the PC60 films (Fig. 31A and 31C) confirmed the absence of modification of the microstructure. Regarding the PC12 films, the grafting led to a significant decrease of the M_n value from $80,481 \pm 1,554$ to $77,221 \pm 1,057 \text{ g.mol}^{-1}$ (-4.05% , $p \leq 0.05$) (Table 9). This decrease in length of the molecular chains was consistent with the observed decrease in T_g from $-60.89 \pm 0.04^\circ\text{C}$ to $-62.17 \pm 0.46^\circ\text{C}$ (Table 10). On the other side, an increase in T_f was observed from $60.78 \pm 0.14^\circ\text{C}$ to $61.20 \pm 0.05^\circ\text{C}$, consistent with the observation of the AFM images of the PC12 films (Fig. 31B and 31D) that revealed an important augmentation of the size of the spherulites. Although the percentage of crystallinity decreased from $64.7 \pm 3.3\%$ to $61.7 \pm 3.3\%$, this change was

not significant ($p > 0.05$). The PC12 films might be more sensitive to the grafting process relative to the PC60 films.

Impact on biologic behavior

Cell viability

The percentages of live sACL fibroblasts seeded on the films were of $107.3 \pm 7.2\%$ for the PC60 films and of $97.2 \pm 0.3\%$ for the PC12 films compared with the $100.0 \pm 0.2\%$ control without material, revealing the lack of cytotoxicity of the PCL films regardless of their molecular weight (Fig. 33). When seeded on the grafted materials, the levels of cell viability were still high ($> 97\%$ live cells). This value decreased to $101.1 \pm 0.4\%$ for the PC60 films and to $98.0 \pm 0.4\%$ for the PC12 films. The results confirmed that neither the grafting method nor the pNaSS molecule itself were cytotoxic in the conditions tested here.

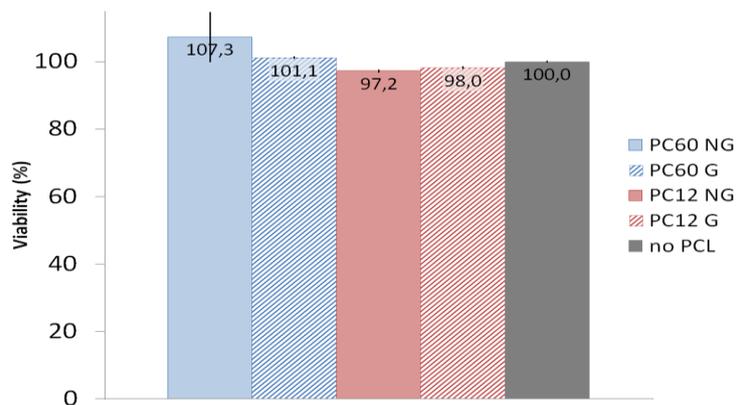


Figure 33. Viability of sACL fibroblasts in the presence of the PCL films. An MTT assay was performed after 24 h of contact between the cells and the various films as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films).

Cell proliferation

Evaluation of the sACL fibroblast numbers over time in the absence of films (positive control) revealed low levels of cell proliferation, with a cell doubling time of 5.20 ± 0.02 days (Fig. 34B). The results obtained with the PCL films showed that the number of cells slightly decreased compared with the positive control at all time points evaluated (Fig. 34A). An estimation of the cell doubling time revealed no significant difference between the PC12 cultures and the positive control (6.4 ± 0.8 versus 5.20 ± 0.02 days) while a significant increase was noted in the PC60 cultures relative to the positive control (9.6 ± 1.4 versus 5.2 ± 0.02 days) (Fig. 34B). The presence or the absence of pNaSS grafting on the PC12 films did not impact the rate of proliferation whereas grafting on the PC60 films significantly restored the rates of cell growth. For the grafted PC60 films, 8.5 ± 0.2 days were needed to double the cell population compared with 10.8 ± 0.6 days when using non-grafted PC60 films. The

proliferation activity of the cells was not impacted upon seeding on the PC12 compared with the PC60 films.

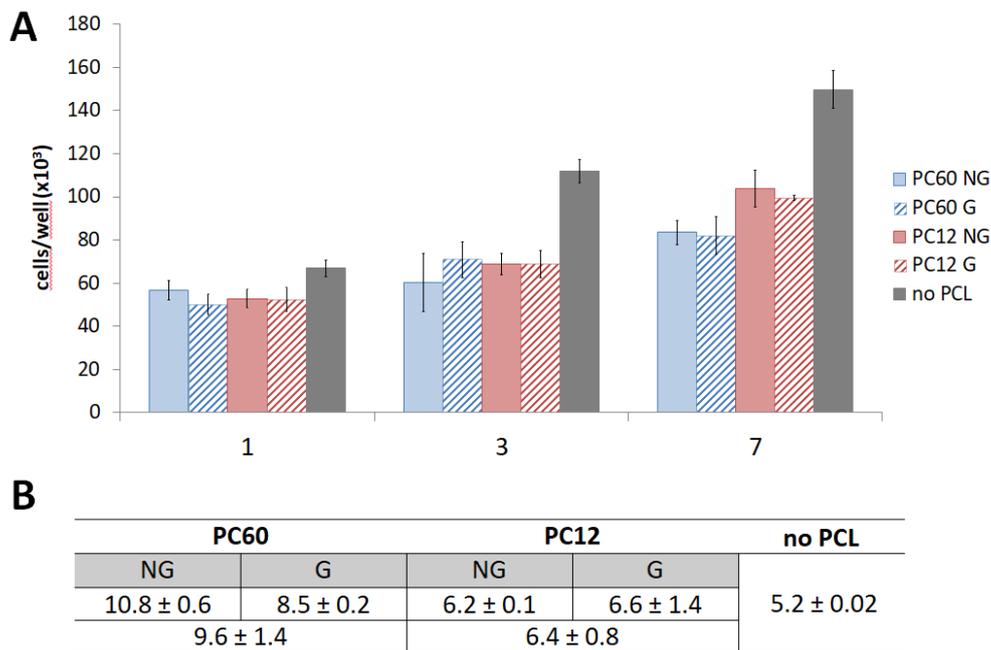


Figure 34. Proliferation of sACL fibroblasts over time in the presence of the PCL films. The numbers of adherent cells (A) and the cell doubling time (days) (B) were measured at the denoted time points as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films).

Cell characterization

Labeling of sACL fibroblasts maintained with PC60 films (Fig. 35) showed that the use of grafted films (Fig. 35D-35F) promoted the development of a higher cytoskeleton network in the cells relative to the condition where non-grafted films were employed (Fig. 35A-35C). This could be observed already after 1 day, progressively increasing over time and after 7 days the actin network was well developed and oriented in a longitudinal axis (Fig. 35F). An analysis by H&E staining further revealed that while no significant differences in the cell attachment patterns were seen early on between grafted and non-grafted films (insets of Fig. 35A, 35B, 35D, and 35E), a more homogenous distribution of the cells was noted in the presence of the grafted films on day 7 (insets of Fig. 35F *versus* 35C). The cells were also more homogeneously distributed with the grafted compared with the non-grafted films (insets of Fig. 35D-35F *versus* 35A-35C, respectively). Of further note, the morphology of the cells was more fusiform in the presence of the grafted films and their color showed a good vitality in these cultures. These findings were corroborated by an estimation of the cell densities, with a significant increase from $34,720 \pm 1,467$ to $59,562 \pm 734$ cells/cm² on day 7 upon grafting (1.7-fold, $p \leq 0.05$) (Fig. 35I).

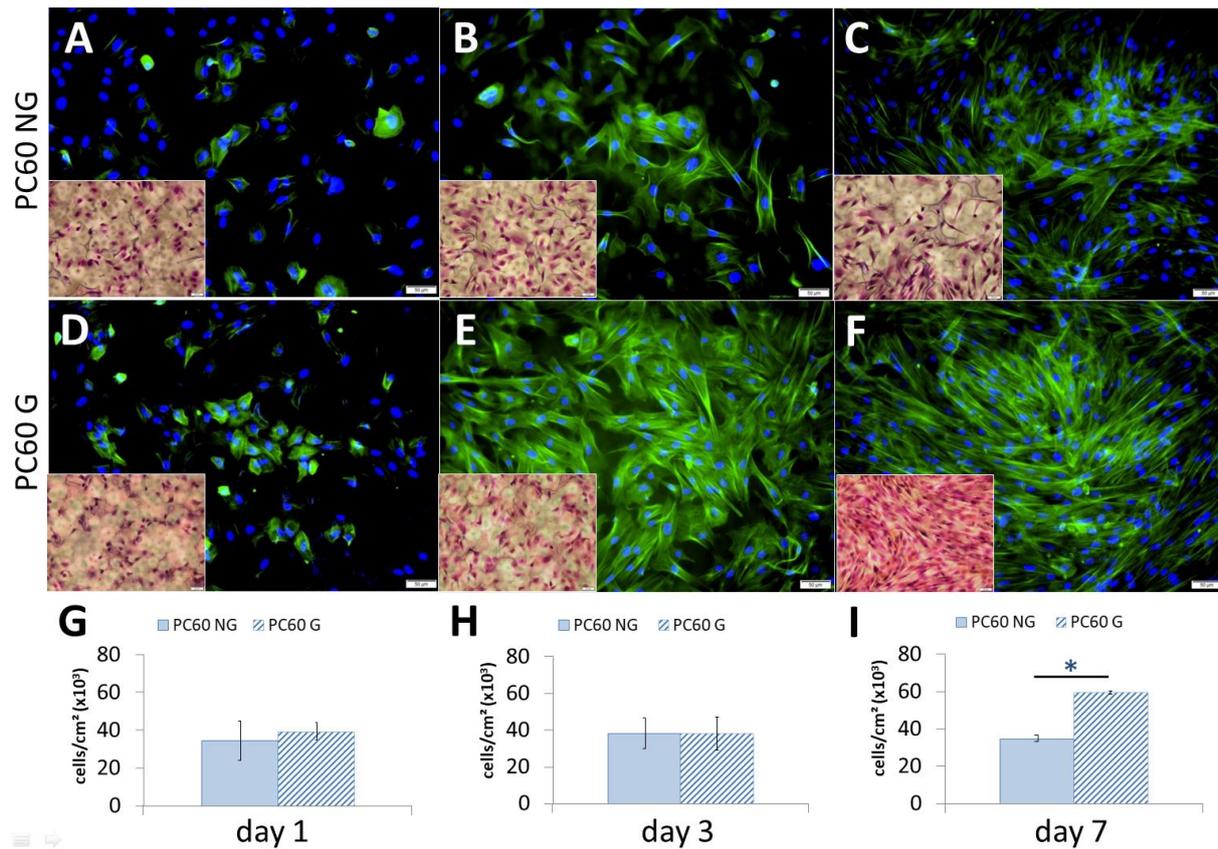


Figure 35. Characterization of sACL fibroblasts over time in the presence of the PCL films (PC60). Phalloidin (green)/DAPI (blue) labelling and H&E staining (insets) with corresponding cell densities (cell/cm²) (G-I) were performed at the denoted time points (day 1: A, D, G; day 3: B, E, H; day 7: C, F, I) as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films). *Statistically significant relative to the corresponding NG condition.

Similar observations were noted when growing sACL fibroblasts on PC12 films over time (Fig. 36), with a more developed skeleton network (Fig. 36F *versus* 36C), a more homogenous cell distribution (insets of Fig. 36F *versus* 36C), higher vitality, and significantly higher cell densities after 7 days when using grafted films (from $23,958 \pm 3,488$ to $65,694 \pm 7,839$ cells/cm² upon grafting, i.e. a 2.7-fold difference, $p \leq 0.05$) (Fig. 36I). Interestingly, such effects were more marked with the PC12 relative to the PC60 films: while grafting increased the cell densities of 1.7-fold in the presence of the PC60 films, it led to a 2.7-fold increase with the PC12 films (Fig. 35I and 36I, respectively).

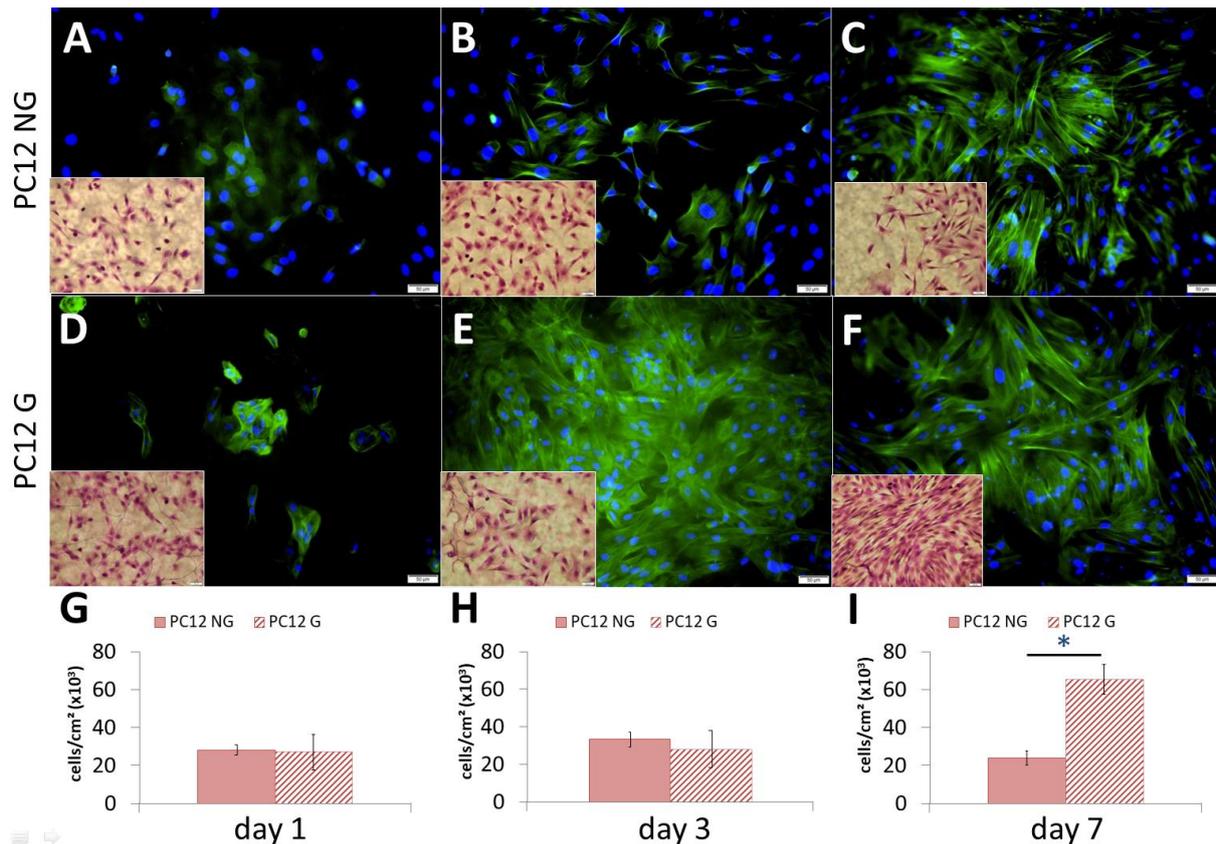


Figure 36. Characterization of sACL fibroblasts over time in the presence of the PCL films (PC12). Phalloidin (green)/DAPI (blue) and H&E staining (insets) with corresponding cell densities (cell/cm²) (G-I) were performed at the denoted time points (day 1: A, D, G; day 3: B, E, H; day 7: C, F, I) as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films). *Statistically significant relative to the corresponding NG condition.

Growth factor production

The production of FGF-2 and TGF- β was measured over time in sACL fibroblasts seeded on the various films (Fig. 37). In the absence of films, the cells significantly secreted 3- to 20-fold more TGF- β (Fig. 37C and 37D) than FGF-2 (Fig. 37A and 37B) ($p \leq 0.005$), showing however a 1.2-fold decrease in TGF- β expression between days 5 and 7 ($p \leq 0.005$) and an average of 2.9-fold decrease in FGF-2 expression over time ($p \leq 0.005$). Interestingly, the production of the two growth factors was significantly stimulated upon seeding of the cells on the films, regardless of types of films. On day 5, an increase in FGF-2 production (1.9- and 1.5-fold) and in TGF- β production (4.8- and 2.1-fold) was noted *versus* controls on PC60 and PC12 films, respectively (always $p \leq 0.05$). After 7 days, the levels of FGF-2 were 1.6-fold ($p > 0.05$) and 1.7-fold ($p \leq 0.05$) higher than the controls on PC60 and PC12 films, respectively, while those of TGF- β were 4.8- and 1.6-fold higher ($p \leq 0.05$). Such stimulating effects were well pronounced after 5 days and maintained on day 7. Of note, the presence of pNaSS grafting did not impact release of the growth factors ($p > 0.005$).

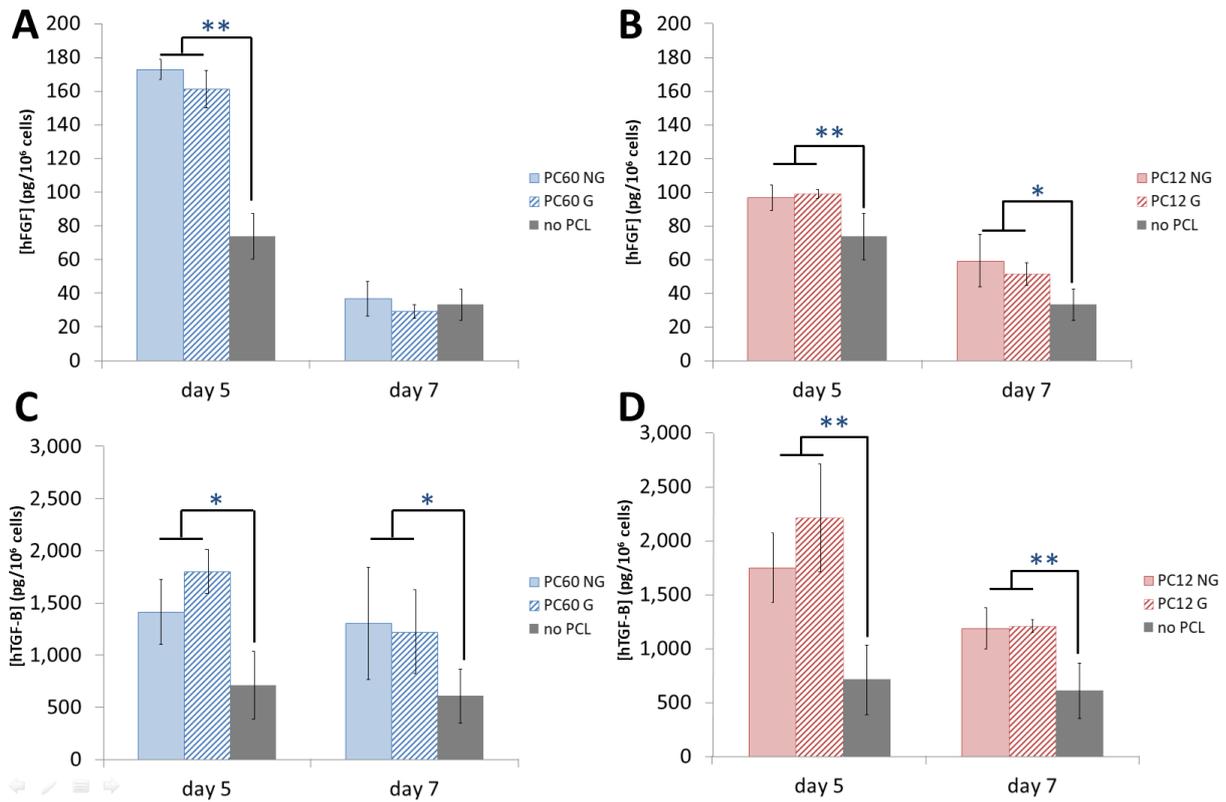


Figure 37. Production of FGF-2 (A,B) and TGF-β (C,D) from sACL fibroblasts over time in the presence of the PCL films (PC60 films: A,C; PC12 films: B,D). Growth factor expression was measured at the denoted time points by ELISA as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films). (*p ≤ 0.05 and ** p ≤ 0.005).

Gene expression

The profiles of type-I and -III collagen gene expression as ligament markers and those of inflammatory TNF-α were monitored in sACL fibroblasts over time of culture with the different films (Fig. 38). When cells were grown on PC60 films (Fig. 38A-38C), the levels of expression of the different genes were always superior on day 7 compared with day 5. Type-I collagen expression was more elevated after 7 days in the presence of films relative to the control condition (absence of film) (3.1- and 1.7-fold for non-grafted and grafted PC60 films, respectively, $p > 0.05$) (Fig. 38A). In contrast, type-III collagen expression was always below the levels of those noted in the control condition (day 5: 9.3- and 27.7-fold lower for non-grafted and grafted PC60 films, respectively, $p \leq 0.005$; day 7: 1.4-fold and 1.1-fold lower for non-grafted and grafted PC60 films, respectively, $p > 0.05$) (Fig. 38B). Strikingly, seeding of cells on the films led to higher TNF-α expression levels *versus* control condition (day 5: 0.4-fold ($p \leq 0.05$) and 2.0-fold difference ($p > 0.05$) for non-grafted and grafted PC60 films, respectively; day 7: 2.9-fold increase for both conditions, $p > 0.05$) (Fig. 38C). In general, there was no significant difference between grafted and non-grafted PC60 samples for any of the genes analyzed ($p > 0.005$). When cells were grown on PC12 films (Fig. 38D-38F), the grafting allowed for rapid, higher levels of type-I collagen expression (day 5) (1.2-fold, $p > 0.05$) that were well maintained over time (day 7) compared with the control condition (absence of film), while

the levels increased only at day 7 with non-grafted films (Fig. 38D). Similar time course profiles were observed for type-III collagen expression although the levels of this marker never reached those seen in the control condition (Fig. 38E). Strikingly, cell seeding on the films led to significantly lower TNF- α expression levels *versus* control condition at day 7 of the analysis (4.2- and 6.7-fold difference, $p \leq 0.05$) (Fig. 38F).

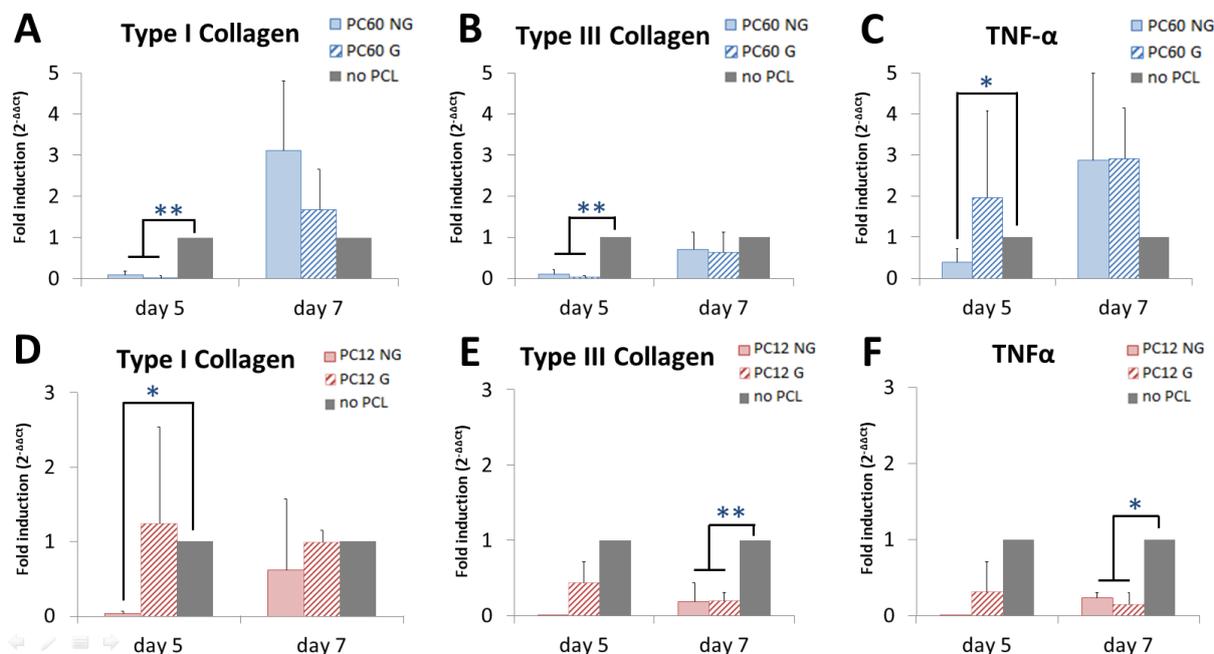


Figure 38. Gene expression in sACL fibroblasts over time in the presence of the PCL films. Samples were processed at the denoted time points for total cellular RNA extraction, cDNA synthesis, and real-time RT-PCR amplification as described in the Materials and methods (NG: non-grafted films; G: grafted films). The genes analyzed included type-I collagen (A,D), type-III collagen (B,E), and TNF- α (C,F), with GAPDH serving as a housekeeping gene and internal control. Ct values were obtained for each target and GAPDH as a control for normalization, and fold inductions (relative to cells maintained in absence of films) were measured using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method. (* $p \leq 0.05$ and ** $p \leq 0.005$).

Kinetics of cell adhesion on PC12 films

Adhesion assays were performed only with PC12 films as only this material was capable of both supporting the formation of a collagen matrix early on and of durably containing potential inflammatory responses in the cells *versus* PC60. The initial adhesion strength of sACL fibroblasts seeded on PC12 films was evaluated after pre-incubation of the surfaces with DMEM supplemented with 10% FBS. The static cell adhesion over time on grafted and non-grafted films presented the same curve shape but with a downward shift for cells seeded on non-grafted films (Fig. 39A). pNaSS grafting accelerated the cell adhesion onto the surface of the material. This effect started to become significant after 30 min of incubation. This time of cell incubation was therefore chosen and increasing centrifugal forces were applied to the cells (Fig. 39B). τ_{50} was determined as the shear stress corresponding to the strength where 50% of the cells detached. The τ_{50} for the cells seeded to the non-grafted films was close to 17.5 dynes/cm² while this value needed to be increased to 25.5 dynes/cm² to detach 50% of the cells from the grafted films. The cell adhesion strength increased as

a result of grafting by pNaSS. When the effect was studied over time, cells seeded on non-grafted films needed to be incubated for 4 h to reach adhesion strengths similar to those of cells seeded on grafted films (Fig. 39C). This increase in cell adhesion strength was therefore maintained over time.

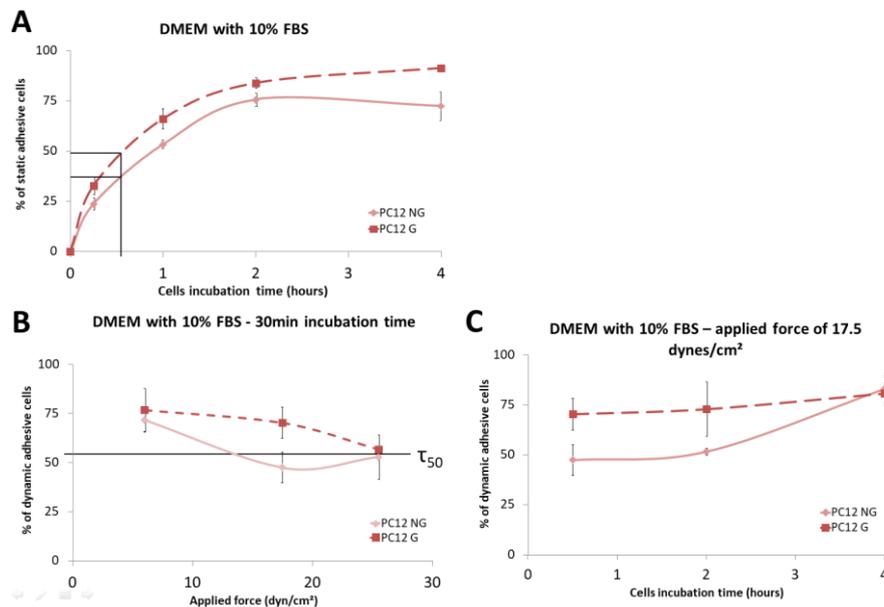


Figure 39. Kinetics of sACL fibroblast adhesion on PC12 films pre-incubated with 10% FBS (NG: non-grafted films; G: grafted films). (A) Static adhesion over cell incubation time. (B) Dynamic adhesion after 30 min of incubation and over increasing centrifugal force applied. (C) Dynamic adhesion over cell incubation time upon force application (17.5 dynes/cm²).

Adhesion mechanisms in presence of pNaSS grafting

Static and dynamic adhesions of sACL fibroblasts seeded 30 min on proteins pre-adsorbed PC12 films were studied. Because DMEM supplemented with 10% FBS contains proteins at a concentration that is 10-fold lower than normal human serum, Fn, collagen, or fibrinogen alone in medium and 10% plasma-DMEM were studied. After 30 min cell incubation, the percentage of static adherent cells was not different in the presence of preadsorbed Fn or collagen alone compared with DMEM with 10% FBS. On the other hand, a trends towards an increase in adherent cells under static conditions was noted with medium containing 10% plasma and this difference became significant when fibrinogen was used alone (Fig. 40A). These observations were confirmed with the dynamic adhesion assay (Fig. 40B). Indeed, the presence of Fn alone stucked the cells to the surface independently of pNaSS grafting. The same phenomenon was observed to a lesser extent with collagen alone. In contrast, pNaSS grafting highly interacted with the cells in the presence of pre-adsorbed plasma or fibrinogen, increasing their adhesive strength.

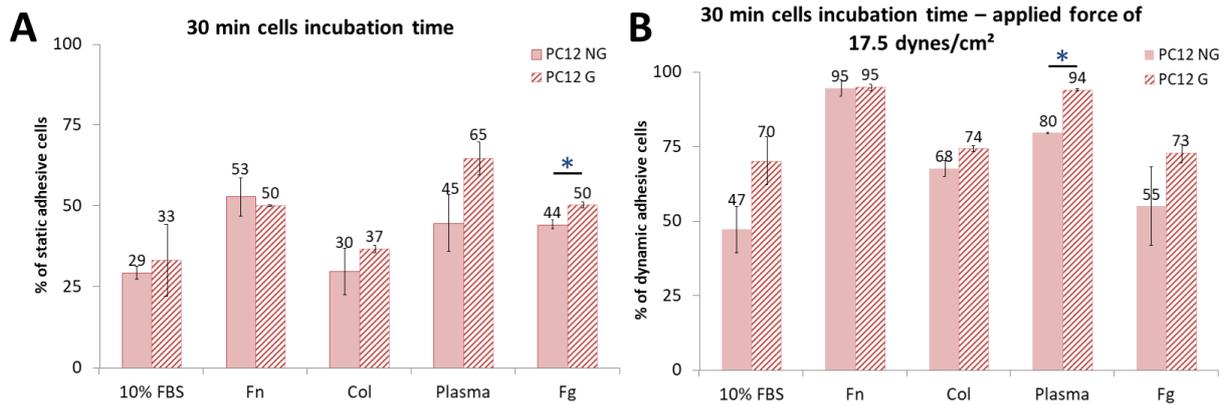


Figure 40. Percentages of static (A) and dynamic (B) adhesion of sACL fibroblasts seeded on proteins pre-adsorbed PC12 films (NG: non-grafted films; G: grafted films).

Discussion

The elaboration of a biomaterial, especially a biodegradable one, can be challenging in terms of chemistry [148]. Several parameters such as molecular weight, purity, or viscosity determine the malleability to process the material to a specific structure [149], [150]. The chosen manufacturing process like the use of solvent or compression molding impacts other features of the final product such as crystallinity, topography, and/or final mechanical properties [151], [152]. Nevertheless, whereas the polymer casting feasibility will be linked to the bulk properties of the material, the surface properties like the ionic charge, surface energy, wettability, and/or roughness influence the cellular responses [153]–[155]. Because the molecular weight of a polymer directly impacts its degradation rate, this article aimed at evaluating the effect of this parameter on the early biologic responses.

Polycaprolactone (PCL) is a well-known biocompatible polymer already used in many medical devices including sutures, dressings, and contraceptive devices [100]. The current results confirm the absence of cytotoxicity of this material when placed in direct contact with primary sheep ACL fibroblasts as a model to study ACL reconstruction. Moreover, in spite of a decrease in the cell growing speed, the presence of PCL strongly activated the early secretion (day 5) of FGF-2 and TGF- β .

The main differences between the two films tested were that PCL as PC60 material is sold as a technical grade and PC12 as a medical grade with higher purity and that the molecular weights were diverging (60 kDa for PC60 *versus* 80 kDa for PC12). Cui *et al.* [143] demonstrated that *in vitro*, NIH3T3 fibroblasts attach and proliferate in a most efficient way on highly crystalline surface. In this study, the difference in the molecular weights added to an adaptation on the casting protocol did not allow to modify the crystallinity, the melting temperature, nor the microstructure of both casted PCL films. Consequently, the given results demonstrated only very little differences in the cellular responses between the two materials: the cell growing speed was faster and closer to the control for the medical grade films, the cell density was similar, and the time secretion of the growth factors

remained unchanged. Indeed, in both cases, a very early production of FGF-2 was seen on day 5 which decreased on day 7 and a continuous production of TGF- β over time. Regarding gene expression, the same tendency with a lower expression on day 5 and an increase on day 7 was observed for all the genes analyzed. Nevertheless, type-I collagen was overexpressed when using PC60 and at the control level with PC12 on day 7, while an opposite effect was found for TNF- α expression, showing an overexpression when using PC60 and an underexpression with PC12. Overall, the data demonstrated a better cell response control with the medical grade material with a lower standard deviation on all results and an absence of inflammatory responses.

PCL is a hydrophobic polymer which is frequently functionalized to modify its bioactivity [156]–[158]. After having successfully grafted the polyNaSS polymer on both PCL films, we confirmed that the grafting process did not modify the physicochemical properties of PC60. In contrast, this process led to a decrease of 4% in the M_n of the PC12 films and to an increase in the spherulites size. Regarding the biologic assays, we observed an increase in cell growing speed using grafted PC60, a more homogenous cell distribution in the cultures, a significant higher cell density after 7 days of culture, a more developed actin skeleton network, and the same effect of overproduction of FGF-2 and TGF- β . Moreover on day 5, all studied genes were early highly expressed compared with non-grafted materials and were similar on day 7. Further experiments carried out on PC12 films demonstrated that pNaSS grafting promoted very early cell adhesion, only after 30 min of contact between the cells and materials. The early adhesion was coupled with an increase in cell adhesion strength of ~ 1.5 -fold on grafted PC12 films which was maintained over time. This phenomenon was mediated by the cell/protein/surface interactions, in particular with pre-adsorbed plasma proteins and fibrinogen. Cells were more effectively attached to the surface but this very early adhesion was not translated early on in higher levels of proliferation and gene expression. Indeed, 7 days were needed to significantly observe impacts on the entire cell culture. It will be worthy to study the culture over this time point.

These obtained results with the grafted PCL films strengthen the ones obtained on non-degradable polymer fabrics and on titanium alloy surfaces functionalized also with pNaSS. Indeed, Zhou *et al.* studied the cell morphology and adhesion to pNaSS-grafted PET ligaments [124], [125]. Observation of the cells after 4 days of culture showed a very homogeneous cell distribution along the PET fibers with a more fusiform morphology on grafted tissues compared with ungrafted tissues. This morphology was associated with higher adhesion forces of human fibroblasts on the grafted surfaces; the strength of cell adhesion was about 12-fold higher on the functionalized surfaces in presence of DMEM supplemented with 10% FBS. Besides, it was shown that the presence of polyanionic chains can induce Fn to unfold to a more stable conformation, thereby increasing the exposure of its active binding regions and therefore promoting cell attachment [159]. Felgueiras *et*

al. who studied the mechanism of pNaSS grafting on titanium alloy (TA6V4) confirmed that the sulfonate group (SO_3^-) of pNaSS modulates the Fn conformation but also demonstrated this on other protein-adsorbed surfaces with albumin, type-I collagen, or vitronectin [160]–[163].

Based on the previous work, it can be concluded that the observed effects on cell morphology and adhesion differences are linked to the presence of pNaSS itself and not related to the type of surface. In this study, no significant differences in terms of adhesion in the presence of Fn or type-I collagen-adsorbed surfaces were observed. Nevertheless, the pNaSS-grafted surface when pre-adsorbed with plasma or fibrinogen demonstrated significant cell adhesion strength suggesting that pNaSS can modulate the conformation of fibrinogen also.

Conclusion

The goal of this study was to evaluate the early responses of sheep ACL fibroblasts on PCL films functionalized by pNaSS. The results obtained showed an absence of impact of the grafting process upon the physicochemical characteristics of the PC60 films while the medical grade PC12 films were more sensitive to radical polymerization. Yet, the biologic evaluations demonstrated a better cell control together with the lack of inflammation ($\text{TNF-}\alpha$) when using PC12 compared with PC60 films. Both types of films were capable of overproducing FGF-2 and TGF- β compared with the controls early on (day 5) although these outcomes were not sufficient to enhance type-I and type-III collagen expression *versus* controls (similar levels by day 7). Finally, the bioactive mechanism of pNaSS grafting was confirmed with regards to the literature. Upon grafting on PCL films, due to protein adsorption, pNaSS allowed a very quick response (30 min) in terms of cell adhesion which did not modify the overproduction of growth factors nor the gene expression observed without the grafting on day 5 but which started to impact the cell density and actin network development on day 7. Overall, the use of PC12 materials coupled with pNaSS grafting may be a promising strategy for applications in ligament reconstruction.

Acknowledgments

This work was funded as part of the "Future Investment Project" by the French Public Investment Bank and the French state - PSPC application - Liga2bio project (VM) and by the *Deutsche Arthrose-Hilfe e.V.* (MC). The XPS experiments done at NESAC/Bio were supported by NIH grant EB-002027. We thank Gerry Hammer (NESAC/Bio) for his help with the XPS analysis.

II-Partie 3 : Etudes mécanistiques complémentaires

Afin d'étudier plus en détail les mécanismes de fonctionnement du pNaSS greffé sur les cellules primaires de brebis, des essais complémentaires ont été réalisés.

Dans un premier temps, les cellules ont été modifiées par transfert de gènes marqueurs via des vecteurs recombinants basés sur le virus adéno-associé (*adeno-associated virus*, AAV) de la famille des parvovirus humains non pathogènes. Ces vecteurs recombinants, ou rAAV, sont particulièrement adaptés pour la thérapie génique humaine à visées translationnelles : ils ne contiennent aucune séquence virale mais seulement les séquences marqueurs ou thérapeutiques mises sous contrôle d'expression eucaryote via le promoteur *immediate early* du cytomegalovirus (CMV-IE) et le signal de polyadénylation du virus simien 40 (SV40 pA). Les séquences virales nécessaires pour la production de particules virales recombinantes sont apportées en *trans* lors du processus d'encapsidation virale dans les cellules humaines 293 (lignée cellulaire de rein embryonnaire transformée par infection via adénovirus) puis désactivées par *heat shock*. L'objectif de ces essais est d'introduire une séquence spécifique codant pour un facteur de croissance choisi dans le but de faire surexprimer ce facteur par la cellule elle-même. Dans la continuité de l'étude présentée précédemment, les facteurs de croissance choisis ont été : FGF-2, dans un but d'étude proliférative, et TGF- β pour son action pro-anabolique.

Une cinétique de prolifération a été établie sur PC12 greffé ou non greffé de pNaSS ensemencés par des cellules primaires de brebis transduites, ou non, par un rAAV contenant une séquence génétique du facteur de croissance FGF-2 (rAAV-FGF-2). Les résultats obtenus sont présentés en figure 41. L'effet prolifératif de FGF-2 sur ces cellules primaires est confirmé par l'augmentation significative du nombre de cellules transduites sur fonds de puits (sans PCL) par rapport aux cellules non transduites et cela dès le premier jour de culture. Cet effet est maintenu dans le temps jusqu'au jour 7. Si ces mêmes cellules transduites sont ensemencées sur PC12, nous pouvons observer (i) qu'après 1 jour de culture, il n'y a pas de différence par comparaison avec les cellules non transduites; (ii) à partir du 3^{ème} jour de culture, le nombre de cellules transduites est significativement plus élevé que sans la transduction de FGF-2 ; (iii) cet effet est toujours présent au jour 7 et permet d'atteindre le même nombre de cellules non transduites et sans matériau – cellules témoins. Ces résultats confirment ainsi que **la surexpression du gène de FGF-2 permet d'augmenter de manière significative la prolifération cellulaire**. À noter toutefois que la présence de PCL semble légèrement retarder cet effet au premier jour de culture, mais l'utilisation de la thérapie génique pour notre application fonctionne.

De plus, aucune différence significative n'a pu être observée entre le matériau greffé et le non greffé avec cellules transduites. **L'effet prolifératif apporté par le rAAV-FGF-2 n'est donc pas bloqué par la présence du greffage de pNaSS à la surface des films de PC12.** Après 7 jours de culture, on observe même une augmentation des cellules transduites sur PC12 greffé, qui n'est toutefois pas significative. **Il ne semble pas à priori avoir d'effet synergique précoce en cumulant le greffage de pNaSS et la transduction génique du facteur de croissance FGF-2.**

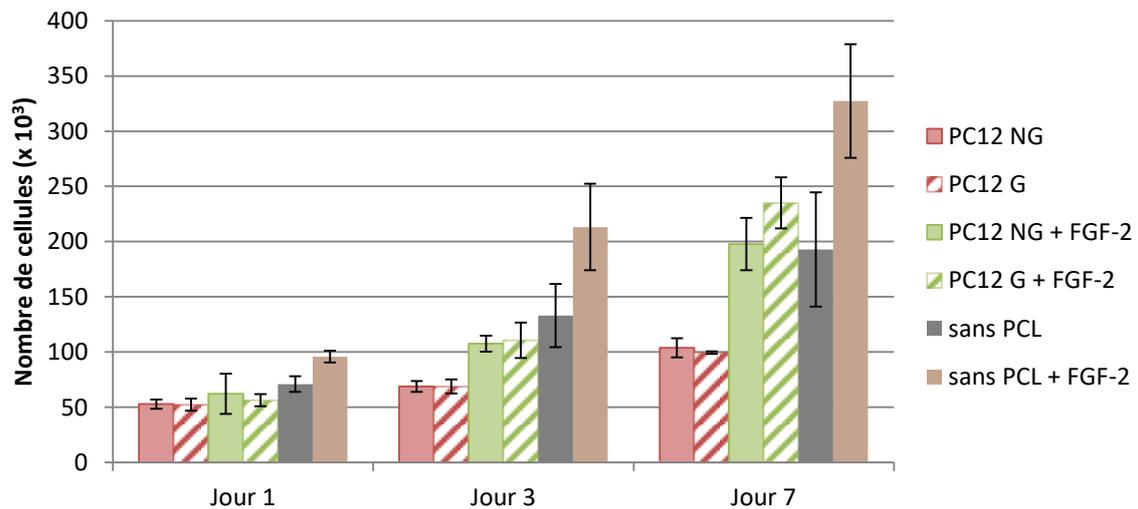


Figure 41 : Cinétique de prolifération de cellulaires primaires d'ACL de brebis transduites ou non par rAAV-FGF-2 et ensemencées sur PC12 greffé ou non greffé

Dans un second temps, une étude morphologique a été conduite afin d'évaluer l'effet de la transduction du facteur de croissance TGF- β sur les cellules primaires de brebis ensemencées sur PCL greffé et non greffé.

Sachant que la transduction de rAAV n'est pas répliquative, c'est-à-dire que le vecteur contenant le gène ne se reproduit pas et qu'il n'est pas transmis lors de la division cellulaire, une expérience de faisabilité a été conduite sur les cellules en l'absence de matériau. L'évolution de la transduction au cours du temps a été suivie par l'ajout (en plus du rAAV-TGF- β) d'un rAAV contenant une séquence codant pour une molécule fluorescente rouge (RFP). Les résultats obtenus permettent d'observer qu'au-delà de 3 jours de culture, les rAAV ne sont plus exprimés de manière significative (cf. Fig.42).

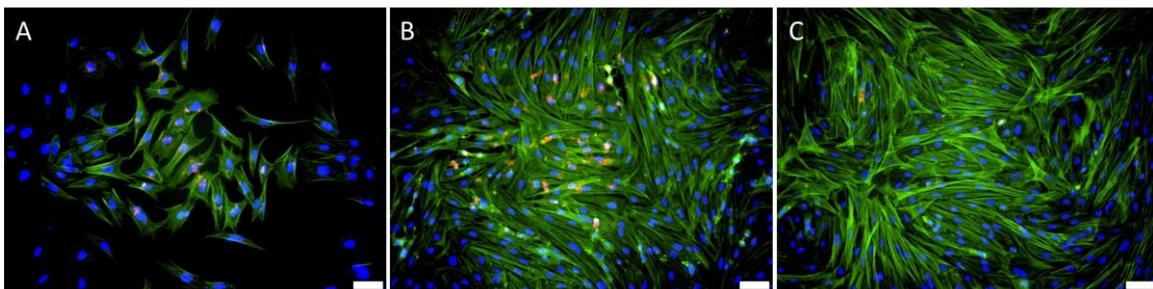


Figure 42 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis sur fonds de puits observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge)) après 1 jour (A) ; 3 jours (B) et 7 jours (C) de culture (barre d'échelle : 50 μ m)

Des cellules co-transduites (rAAV-TGF- β et rAAV-RFP) ont été ensemencées sur les films PC60 et PC12 greffés et non greffés de pNaSS, et ont été observées par fluorescence après 1 jour de culture. Les résultats obtenus ont montré que **le cumul de la transfection avec la présence d'un matériau est possible** (cf. Fig.43). Les observations sont les mêmes pour PC60 et pour PC12, à savoir que : (i) sur les matériaux non greffés, particulièrement la PC12, les cellules en présence de rAAV semblent développer un cytosquelette plus marqué (fluorescence verte plus intense) (cf. Fig.43A à 43D) ; (ii) tandis que sur matériaux greffés, les cellules transduites semblent moins développées que sans la transduction de vecteurs (perte d'intensité de la fluorescence verte avec la transduction) (cf. Fig.43E à 43H). La transduction par le facteur de croissance TGF- β semble donc avoir un effet bénéfique sur la morphologie des cellules ensemencées sur matériaux non greffés ; cet effet n'existe plus et serait même « annihilé » par la présence du greffage de pNaSS à la surface des matériaux.

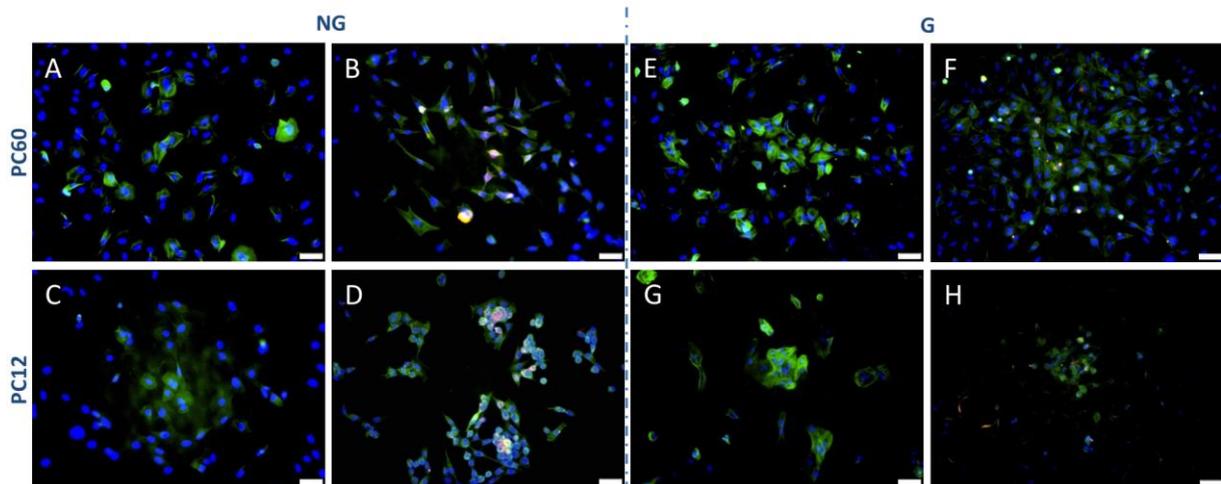


Figure 43 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis non transduites (A,C,E,G) et transduites par rAAV TGF- β et rAAV-RFP (B,D,F,H) ensemencées sur PC60 NG (A et B) ; PC60 G (E et F) ; PC12 NG (C et D) et PC12 G (G et H) observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge)) après 1 jour de culture (barre d'échelle : 50 μ m)

Pour finir, une troisième étude impliquant l'utilisation d'une molécule de polyamide ramifiée (BPA-C8) a été utilisée. Cette molécule a été développée par le laboratoire du Pr Jean-Marie Lehn de l'institut de Sciences et d'Ingénierie Supramoléculaires (ISIS) de l'Université de Strasbourg. La BPA-C8 permet la polymérisation des molécules d'actine au niveau intracellulaire engendrant la croissance rapide de lamellipodes[164]. Ces dernières sont des extensions membranaires permettant à la cellule d'explorer son environnement et de se déplacer. Compte tenu de l'effet morphologique du pNaSS démontré précédemment permettant le développement d'un cytosquelette d'actine plus important dès le premier jour, nous avons trouvé intéressant d'étudier l'effet de la BPA sur nos cultures. Ainsi, la molécule BPA-C8 (cf. Fig.44) a été mise en contact avec les cellules transduites ou non de rAAV-TGF- β et ensemencées sur PC12 G ou NG.

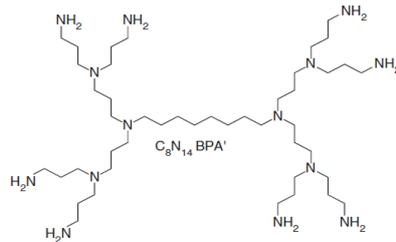


Figure 44 : Molécule de BPA-C8

L'observation des cellules sur fond de puits (témoin) nous a permis d'observer que (i) la transduction du facteur de croissance TGF- β ne modifie pas la morphologie des cellules (cf. Fig.45B) ; (ii) l'ajout de BPA seule ne semble pas avoir d'effet sur la culture (cf. Fig.45C) ; (iii) le cumul de la transduction de TGF- β et de BPA a un effet synergique entraînant une augmentation du nombre de cellules (effet prolifératif) et le développement du cytosquelette des cellules (cellules fusiformes) (cf. Fig.45D).

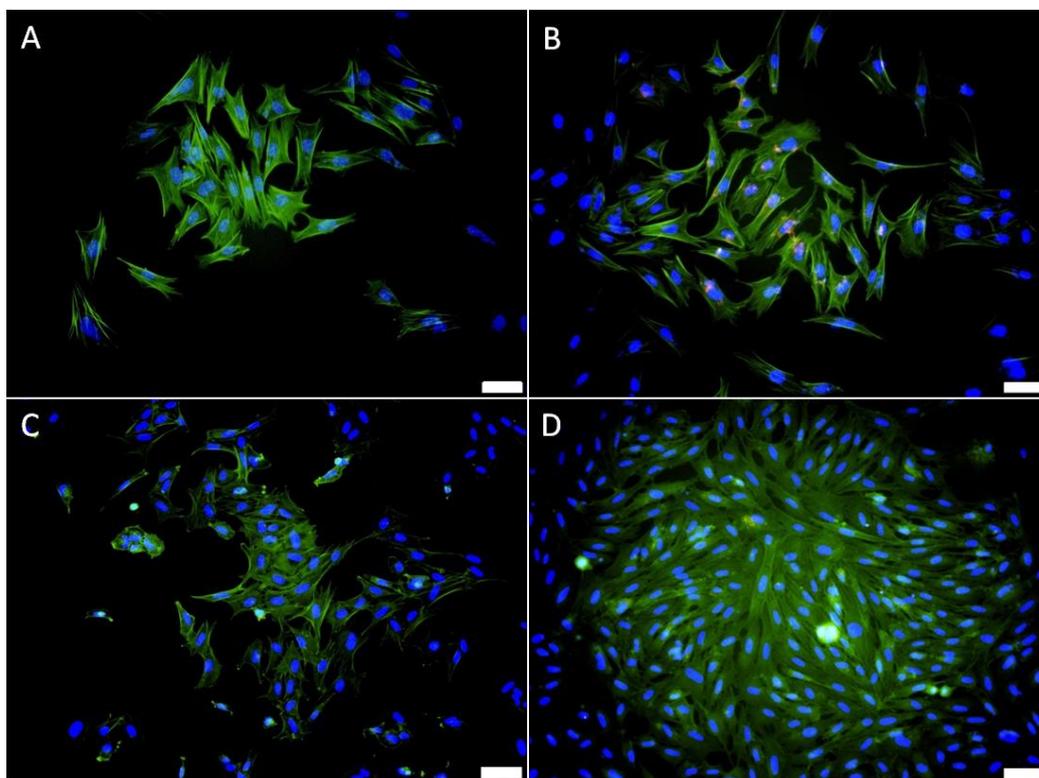


Figure 45 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis sur fonds de puits observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge) après 1 jour de culture. A : cellules non transduites, sans BPA ; B : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) ; C : cellules non-transduites mais avec BPA (50 μ M) ; D : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) et avec BPA (50 μ M) (barre d'échelle : 50 μ m)

L'observation des cellules sur PC12 non greffés nous a permis d'observer que (i) les cellules transduites avec le facteur de croissance TGF- β présentent un cytosquelette légèrement plus développé qu'en l'absence de transduction (cf. Fig.46B) ; (ii) l'ajout de BPA seul inhibe complètement la culture cellulaire après 1 jour, il n'y avait presque qu'aucune cellule adhérente (cf. Fig.46C) ; (iii) le cumul de la transduction de TGF- β et de BPA a un effet intermédiaire aux deux effets précédemment

cités à savoir un nombre plus faible de cellules que le contrôle mais une forte présence d'actine au niveau de leur cytosquelette (cf. Fig.46D) ; les cellules étaient alors très rondes et en amas. Contrairement au contrôle des cellules sur fonds de puits, **l'association de la transduction de TGF- β et de la molécule de BPA en présence de PCL n'aboutit pas au même effet synergique** évoqué précédemment après un jour de culture.

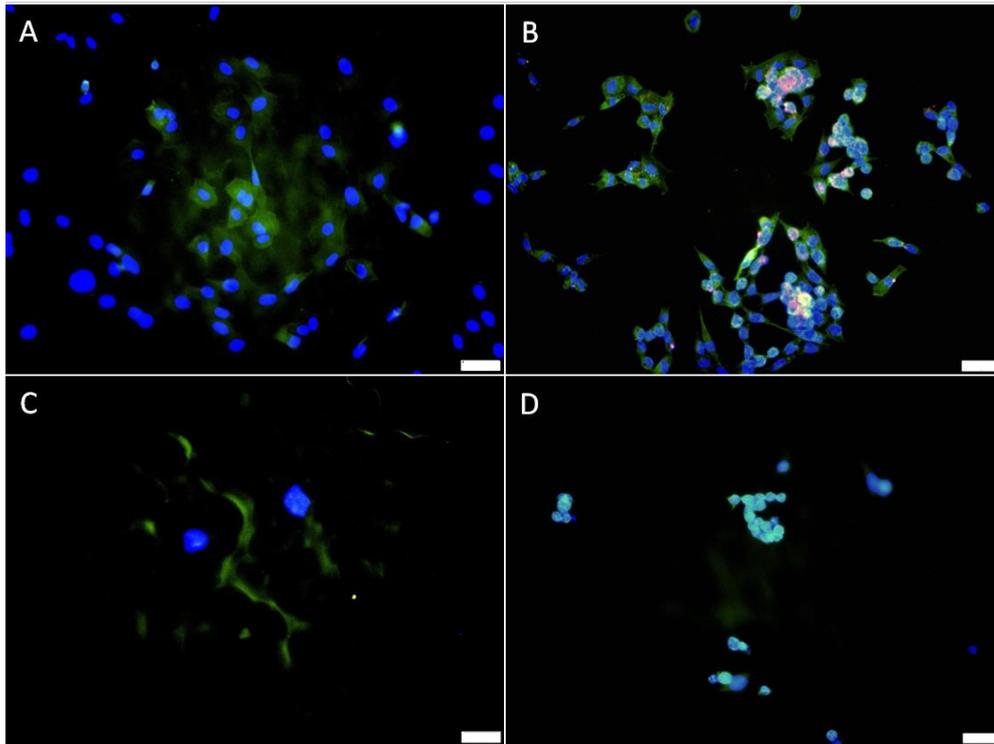


Figure 46 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis sur PC12 NG observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge)) après 1 jour de culture. A : cellules non transduites, sans BPA ; B : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) ; C : cellules non-transduites mais avec BPA (50 μ M) ; D : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) et avec BPA (50 μ M) (barre d'échelle : 50 μ m)

L'observation des cellules sur PC12 greffés nous a permis d'observer que (i) les cellules transduites avec le facteur de croissance TGF- β présentent un cytosquelette moins développé qu'en l'absence de transduction (cf. Fig.47B) ; (ii) l'ajout de BPA seul inhibe complètement la culture cellulaire après un jour, il y avait un peu plus de cellules que sur PC12 NG mais celles-ci étaient très rondes et très peu développées (cf. Fig.47C) ; (iii) le cumul de la transduction de TGF- β et de BPA a un effet synergique sur la culture, avec des cellules en nombre qui possèdent un cytosquelette développé (cellules étoilées) (cf. Fig.47D). Contrairement aux résultats obtenus sur PC12 NG, **l'association de la transduction de TGF- β , de la molécule de BPA et du greffage de pNaSS a abouti à un effet synergique** similaire, mais moindre, à celui obtenu avec les cellules sur fonds de puits et cela après un jour de culture.

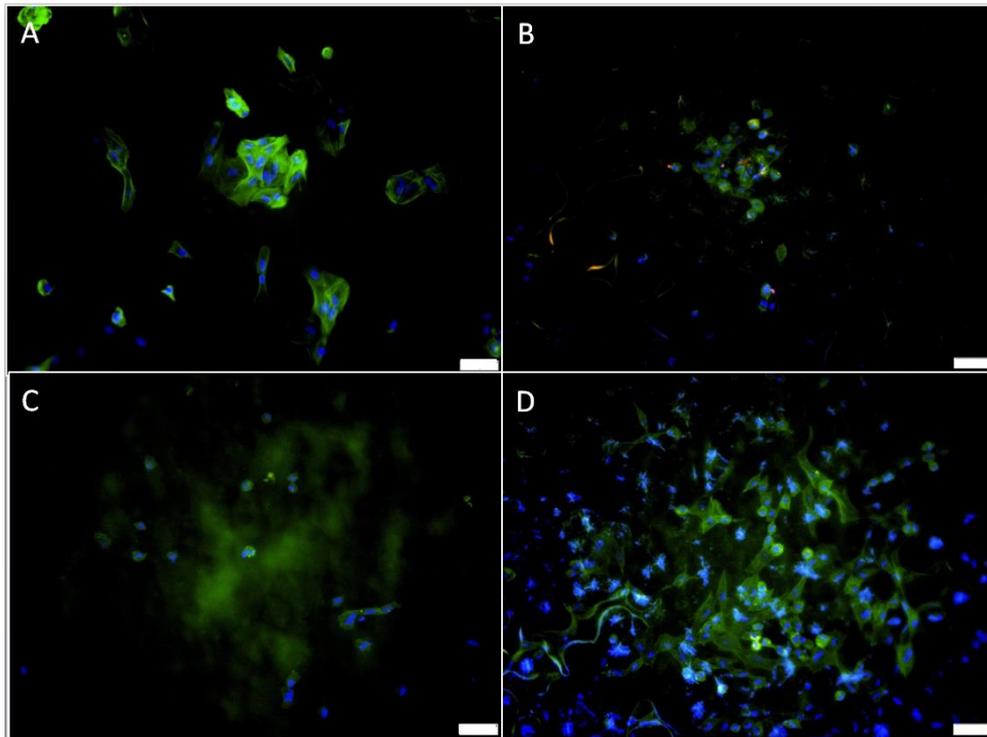


Figure 47 : Culture de cellules primaires d'ACL de brebis sur PC12 G observées en microscopie à fluorescence (noyaux cellulaires marqués au DAPI (bleu) ; cytosquelettes marqués à la phalloïdine (vert) ; rAAV-RFP (rouge)) après 1 jour de culture. A : cellules non transduites, sans BPA ; B : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) ; C : cellules non-transduites mais avec BPA (50 μ M) ; D : cellules transduites (co-transfection TGF- β et RFP) et avec BPA (50 μ M) (barre d'échelle : 50 μ m)

Pour finir, une dernière expérience a été réalisée afin d'évaluer l'adhésion précoce des cellules après 30 min de culture sur PC12 G et NG. Afin d'évaluer les interactions entre le pNaSS et la BPA, deux modes de contact ont été réalisés :

1. un contact appelé « direct » entre la BPA et la PCL, à savoir, comme pour le témoin avec 10% de SVF, une pré-incubation des matériaux pendant 2h avec la molécule de BPA suspendue dans du DMEM non complété avant l'ajout des cellules et leur incubation pendant 30 min ;
2. un contact « indirect » : les matériaux sont alors pré-adsorbés de protéines (10% SVF) pendant 2 heures, puis ils sontensemencés avec une suspension cellulaire contenant du DMEM et de la BPA, après 30 min de culture, les tests d'adhésion sont réalisés.

Les résultats obtenus ont montré que le contact direct de la BPA avec la PCL durant 2h avant l'ajout des cellules n'a pas engendré de différence significative par rapport au contrôle (surfaces pré-adsorbées de SVF) (cf. Fig.48). Seule une légère augmentation, non significative, de l'adhésion a pu être notée que cela soit en statique ou en dynamique. En effet, en condition statique, les films de PC12 NG contenaient $29,4 \pm 2,0$ % de cellules adhérentes en absence de BPA et $37,4 \pm 4,0$ % de cellules adhérentes en présence de BPA tandis que les films de PC12 G contenaient respectivement $33,2 \pm 11,1$ % et $46,6 \pm 16,3$ % de cellules adhérentes. Similairement, en condition dynamique, les films de PC12 NG gardaient $47,3 \pm 7,7$ % de cellules adhérentes après l'essai en absence de BPA et

58,6 ± 12,8 % en présence de BPA ; ce pourcentage d'adhésion était de 70,3 ± 7,9 % sur la PC12 G sans BPA et de 70,6 ± 2,5 % sur la PC12 G avec BPA. On peut supposer que cette légère augmentation est peut être liée à un certain pourcentage de molécules de BPA qui seraient restées en surface de la PCL et qui ainsi auraient pu agir une fois en contact avec les cellules, mais indépendamment du pNaSS greffé. **Il ne semble donc pas y avoir d'interaction entre la molécule de BPA et le greffage de pNaSS.**

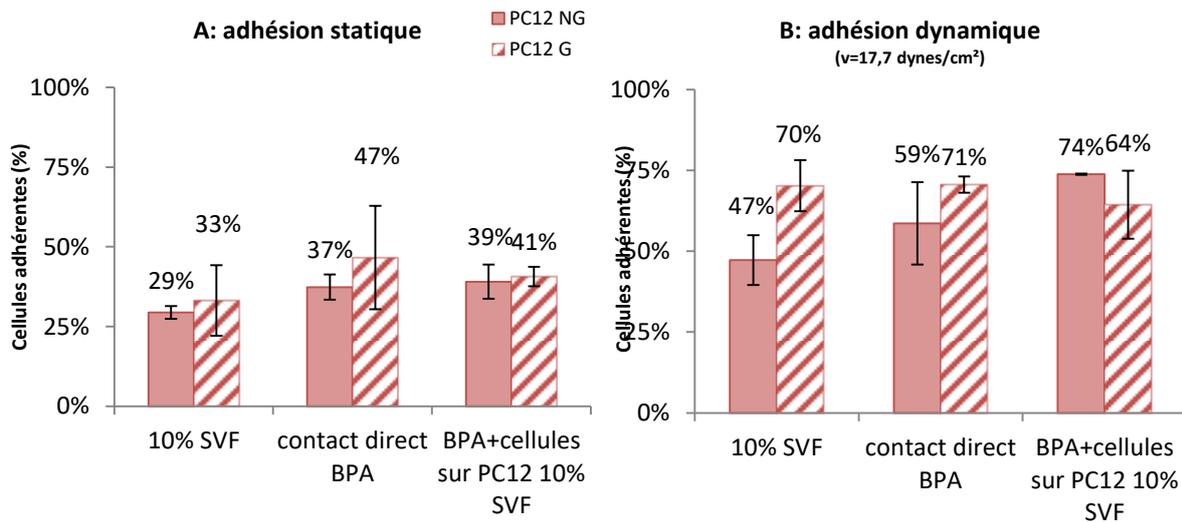


Figure 48 : pourcentage de cellules adhérentes (A) en statique et (B) en dynamique après 15min de contrainte à 17,7 dynes/cm² en présence de BPA ou non

En revanche, les résultats obtenus par le contact indirect de la BPA et de la PCL sont différents et les écart-types sont plus resserrés. Ainsi, les cellules sur PC12 sont plus nombreuses à avoir adhéré dans des conditions statiques avec la BPA (cf. Fig.48A), passant de 29,4 ± 2,0 % à 39,1 ± 5,3 % pour la PC12 NG et de 33,2 ± 11,1 % à 40,7 ± 3,0 % pour la PC12 G. Enfin, la force d'adhésion de ces cellules soumises pendant 15 min à une force centrifuge de 17,7 dynes/cm² est significativement augmentée sur PC12 NG passant de 47,3 ± 7,7 % à 73,8 ± 0,2 % de cellules restantes adhérentes après application d'une contrainte (cf. Fig.48B), se rapprochant ainsi du résultat obtenu sur PC12 G pré-adsorbés de SVF (70,3 (± 7,9) %). Parallèlement, la force d'adhésion sur PC12 G reste similaire en présence de BPA avec un taux de 64,4 (± 10,5) % de cellules adhérentes après application d'une force. **La molécule de BPA mise en contact avec les cellules puis avec la PCL non greffée de pNaSS engendre un effet similaire d'augmentation de la force d'adhésion à celui observé avec les cellules sans BPA et en présence du greffage de pNaSS.** Ces résultats d'adhésion, couplés aux résultats morphologiques, semblent confirmer que **le pNaSS agit sur le cytosquelette des cellules**, et particulièrement sur le réseau d'actine.

En conclusion, ces études complémentaires nous ont permis d'étudier parallèlement les mécanismes de prolifération, d'adhésion et de morphologie selon trois abords différents. En effet, le greffage de pNaSS agit selon un mécanisme de surface vis-à-vis des cellules, impliquant des interactions matériaux/protéines/surfaces cellulaires et utilisant majoritairement la voie des intégrines. La molécule de BPA quant à elle, a une action intracellulaire, elle pénètre les cellules grâce à des transporteurs transmembranaires pour agir directement sur la polymérisation des molécules d'actine[165], [166]. Enfin, la transduction par rAAV est médiée par la voie des intégrines[167] ; le virus une fois endocyté va atteindre le noyau cellulaire afin d'agir métaboliquement sur la cellule.

Les résultats obtenus ont ainsi démontré que le greffage de pNaSS utilisé seul pouvait intervenir favorablement sur la morphologie et l'adhésion cellulaires. La transduction de rAAV seule permet quant à elle d'augmenter la prolifération (grâce au facteur de croissance FGF-2) et d'améliorer la morphologie cellulaire (grâce au facteur de croissance TGF- β). En revanche, l'emploi simultané du traitement de surface et de la thérapie génique a montré des résultats mitigés, non défavorable d'un point de vue prolifératif, mais peu encourageant d'un point de vue morphologique. Ces deux modes d'actions nécessitant tous les deux l'activation de la même voie de signalisation intracellulaire - celle des intégrines - nous pouvons émettre l'hypothèse d'une possible compétition entre eux. D'un autre côté, l'utilisation de la molécule de BPA seule a permis de manière très précoce (30 min) d'augmenter la force d'adhésion des cellulesensemencées sur PC12 NG, mais s'est avérée complètement délétère après 24h de culture. L'association de cette molécule avec le greffage n'a pas donné de résultats concluants non plus. En revanche, nous avons pu voir que l'association des trois modes d'actions engendrait un effet synergique d'un point de vue morphologique après un jour de culture, démontrant ainsi le phénomène complexe et multifactoriel du mode d'action de ces nouvelles solutions.

Chapitre III – Etudes chimiques, mécaniques et biologiques sur faisceaux de fibres de PCL

Le chapitre précédent a permis de montrer que la PCL de grade médical référencée PC12, de masse molaire de $80 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$, permettait d'obtenir de très bons résultats en termes de réponse biologique *in vitro*, avec notamment un effet inhibiteur de l'inflammation. En vue du développement de la future prothèse ligamentaire biodégradable, cette matière première de PCL a été transformée par la société Luxilon afin d'élaborer des fils de PCL d'un diamètre de $110 \pm 5 \mu\text{m}$. Au sein du laboratoire CSPBAT-LBPS, ces fils ont ensuite été assemblés par faisceaux de 20 fils. Compte-tenu du nombre important de faisceaux nécessaires pour les études physico-chimiques et biologiques, un système « homemade » a été développé afin de créer des faisceaux de 20 fils de PCL d'une longueur reproductible de 3 cm, et en quantité importante en réalisant 68 faisceaux simultanément.

Le système développé se compose de deux parties (cf. Fig.49) :

- la première est un support de type « rack » permettant le positionnement de 20 bobines de fils de PCL en parallèle en vue de générer une bobine d'un fil de 20 fils ;
- la deuxième partie est une plaque de Téflon dans laquelle des rainures longitudinales et verticales ont été creusées. Le fil de 20 fils créé précédemment est alors placé dans les rainures verticales et une solution de PCL dans du dichlorométhane ($1,2 \text{ g PC60}/2\text{mL}$) est coulée dans les rainures longitudinales. Le dichlorométhane qui est un excellent solvant de la PCL, est évaporé pendant une nuit, et va permettre de créer un point de colle solidarisant les 20 fils de PCL en un faisceau.

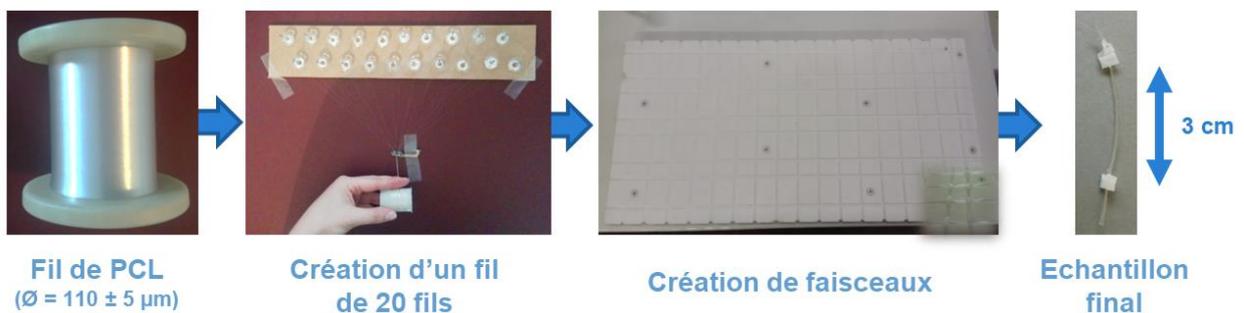


Figure 49 : Système homemade de création de faisceaux de PCL contenant 20 fils

Les faisceaux de 20 fils de PCL représentent un premier modèle très simplifié de la partie intra-articulaire de la future prothèse qui sera composée d'une multitude de fibres parallèles, comme dans le cas du ligament en PET actuellement commercialisé. Ce chapitre présente l'ensemble des résultats obtenus sur ces échantillons sous forme de faisceaux de fibres en termes de greffage chimique et de son impact sur les propriétés mécaniques et la réponse biologique *in vitro*.

III-Partie 1 : Greffage de pNaSS par voie UV

Comme dans le cas des films de PCL, le greffage radicalaire permettant la fonctionnalisation des faisceaux de PCL par le pNaSS s'effectue en deux étapes (cf. Fig.50) :

1. l'activation de la surface par oxydation à l'ozone engendrant la création de fonctions peroxydes et hydroperoxydes ;
2. le greffage à proprement parler, c'est-à-dire la polymérisation radicalaire, par la méthode du « grafting from » pouvant être initiée par voie thermique ou par exposition aux ultra-violets.

À noter, qu'il est également possible de réaliser la fonctionnalisation par greffage radicalaire en une seule étape – sans activation - en utilisant directement l'énergie du rayonnement ultra-violet pour créer des radicaux et amorcer la polymérisation.

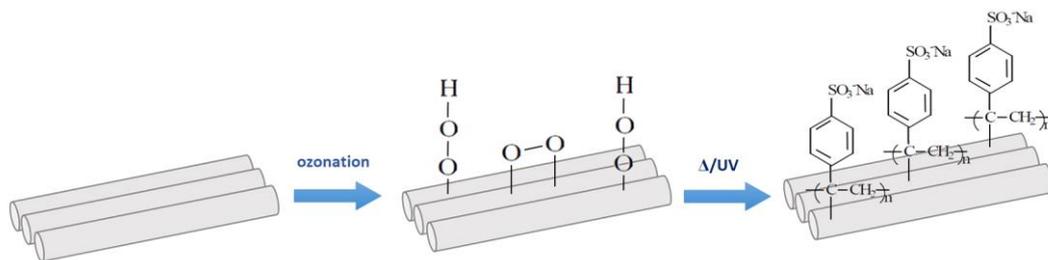


Figure 50 : Représentation schématique du greffage radicalaire du pNaSS sur les faisceaux de PCL

Les conditions du « greffage radicalaire amorcé par voie thermique » ou « greffage thermique » avaient déjà été établies au sein du laboratoire CSPBAT-LBPS, mais afin de compléter l'étude, des cinétiques de polymérisation par voie UV ont été réalisées avec une première étape d'activation de la surface par ozonation ou sans activation. Pour ces expériences, le réacteur contenant la solution de monomère NaSS dégazée à l'argon, ainsi que les échantillons, était placé sous agitation magnétique dans un système fermé et recouvert d'aluminium qui permet de réfléchir les rayonnements UV (cf. Fig.51). La fibre de la lampe était alors insérée dans l'enceinte au niveau d'une fente et placée à une distance précise (3 cm) de la paroi du réacteur.

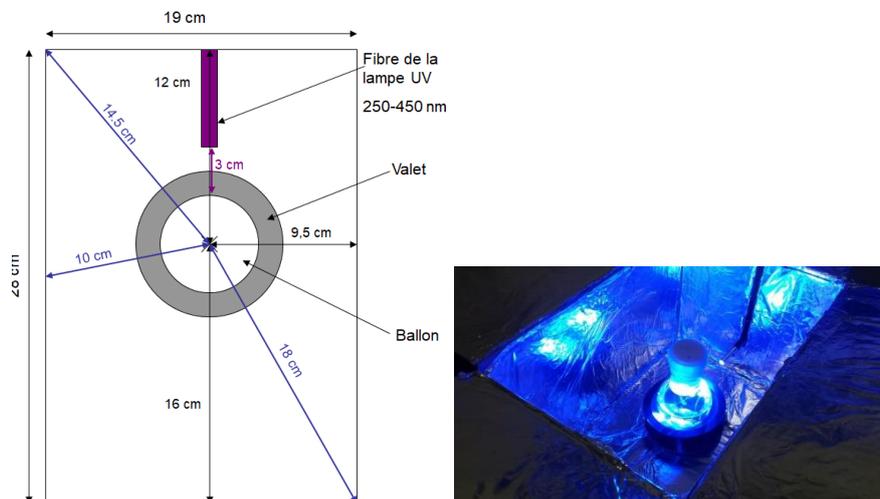


Figure 51 : Représentation schématique et photo du système pour le greffage UV

Les paramètres étudiés étaient (i) la durée de polymérisation de 15, 30 ou 60 minutes et (ii) l'irradiance de 5, 10 ou 15 W/cm² en sortie de source UV qui correspond à des énergies respectives de 45, 200 et 230 mW/cm² dans le réacteur (au niveau des échantillons). La lampe UV utilisée irradiait dans un spectre de longueur d'ondes de 250 à 450 nm et non à une longueur fixe.

Les résultats obtenus en termes de taux de greffage (TG) de la PCL par le pNaSS, déterminés par la méthode colorimétrique au bleu de toluidine (BT) comme décrit dans la partie « matériels et méthodes » de la partie 2 de ce chapitre, sont résumés en Figure 52. Les résultats montrent que **le taux de greffage maximal des faisceaux de PCL est obtenu pour un temps de réaction de 30 min avec une irradiance de 10 W/cm² et après une étape d'activation de la surface** par ozonation. Ce taux maximal TG_{max} est égal à $1,59 \pm 0,24 \mu\text{mol.g}^{-1}$; par comparaison le taux moyen TG_{moyen} obtenu sur ces surfaces par « greffage thermique » est de $0,75 \pm 0,24 \mu\text{mol.g}^{-1}$. Le greffage par voie UV ou « greffage UV », après une activation préalable de la surface par ozonation, permet de multiplier par deux le taux de greffage des faisceaux de PCL par le pNaSS. Par ailleurs, l'analyse des études cinétiques du greffage UV avec ou sans ozonation met en évidence des variations des TG identiques en fonction du temps, avec cependant des taux plus faibles lorsque la surface n'est pas activée.

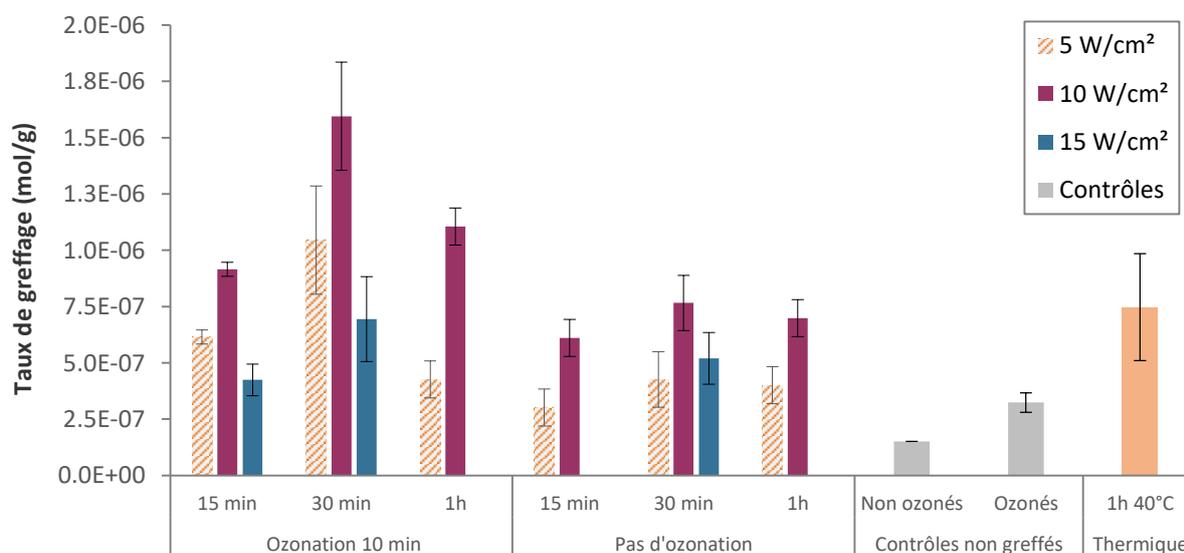


Figure 52 : Taux de greffage obtenus par polymérisation UV des faisceaux de PCL

Pour une même irradiance, la variation du taux de greffage en fonction du temps augmente jusqu'à une valeur maximale – autour de 30 minutes - puis diminue ensuite. En d'autres termes, après un certain temps, plus le temps de polymérisation est élevé, plus le taux de greffage diminue. De la même manière, pour une même durée de polymérisation et à partir d'un certain seuil, l'augmentation de l'irradiance de la lampe entraîne une diminution du taux de greffage. Le temps d'exposition aux rayonnements UV ainsi que le niveau d'irradiance sont les paramètres interdépendants qui permettent de moduler la polymérisation du NaSS à la surface des faisceaux de

PCL. Ainsi, au-delà d'un certain seuil d'énergie, des coupures de chaînes de polymérisation du pNaSS formées à la surface vont se produire, entraînant une diminution du taux de greffage et par voie de conséquence de l'efficacité du greffage.

Des analyses physico-chimiques ont été effectuées afin d'évaluer l'impact du mode de greffage – voie thermique ou voie UV - sur la masse molaire et la cristallinité des faisceaux de PCL.

Tout d'abord, il est intéressant d'observer que l'extrusion des fils de PC12, qui est un procédé complexe nécessitant de nombreux changements de température, a engendré une légère diminution de la masse molaire M_n de la PCL, puisque celle-ci varie de $80481 \pm 1554 \text{ g.mol}^{-1}$ avant extrusion à $74674 \pm 2438 \text{ g.mol}^{-1}$ après extrusion.

De plus, contrairement à ce qui avait été observé sur films dans le cas du « greffage thermique » (cf. chapitre II) c'est à dire une diminution d'environ 4% de la masse molaire M_n , sur faisceaux, quel que soit le mode de **greffage par voie thermique ou par voie UV aucune modification de la taille des chaînes macromoléculaires n'est observée** (cf. Fig.53A). En effet, la masse molaire moyenne en nombre M_n des faisceaux de PCL reste la même avec ou sans greffage : $M_{n \text{ PCL}} = 73960 \pm 4052 \text{ g.mol}^{-1}$ après greffage par voie thermique et $M_{n \text{ PCL}} = 73360 \pm 447 \text{ g.mol}^{-1}$ après greffage par voie UV. De même, l'indice de polydispersité I_p n'est pas modifié par le greffage avec une valeur de $1,24 \pm 0,05$; pour rappel cette valeur était de $1,25 \pm 0,02$ pour les films de PC12.

Enfin, les analyses thermiques par DSC réalisées sur les mêmes échantillons permettent de mettre en évidence que la mise en forme de la PCL par extrusion a conduit à une diminution de la cristallinité de la PCL ainsi le $\chi_{\text{PCL film}}$ est égal à $64,7 \pm 3,3 \%$ alors que $\chi_{\text{PCL faisceaux}}$ est égal à $59,8 \pm 7,5 \%$ (cf. Fig.53B). En revanche, comme cela a été observé pour les films de PC12, le greffage du pNaSS n'a modifié de manière significative ni la température de transition vitreuse ($T_g \approx -60^\circ\text{C}$), ni la température de fusion ($T_f \approx +60^\circ\text{C}$), ni la cristallinité des faisceaux ($\chi \approx 60\%$) ; même si le greffage par voie UV engendre une légère augmentation du taux de cristallinité $\chi_{\text{UV}} = 65,4 \pm 8,7\%$ par comparaison à $\chi_{\text{thermique}} = 60,6 \pm 7,0\%$ obtenu avec le « greffage thermique ».

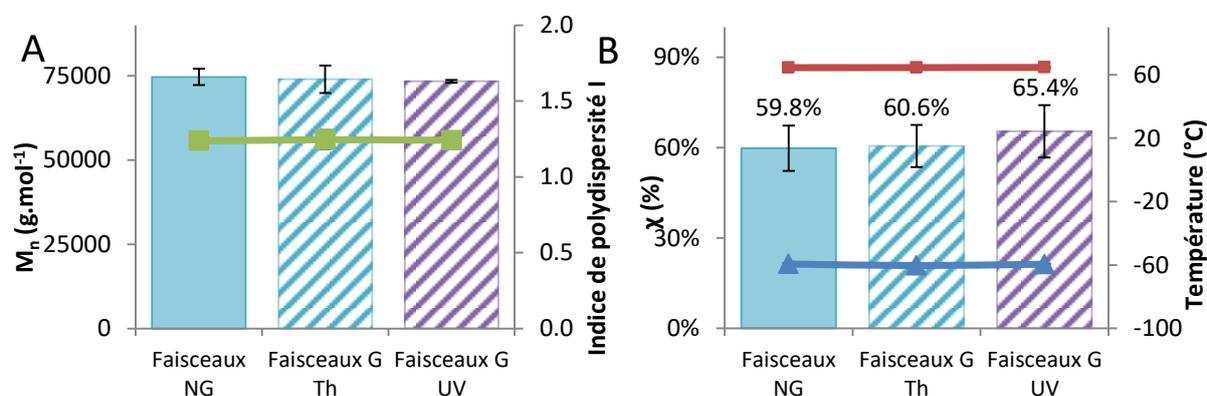


Figure 53 : impacts du mode de greffage (thermique ou UV) sur les caractéristiques physico-chimiques des faisceaux de PCL. (A) résultats des analyses GPC ; (B) résultats des analyses DSC

En conclusion, les résultats montrent que le taux de greffage de pNaSS sur la PCL peut être augmenté par l'utilisation des rayonnements UV couplée à une activation de la surface par oxydation. Par ailleurs, l'ensemble des résultats permet d'affirmer que quel que soit le mode de greffage (voie thermique ou voie UV), les caractéristiques physico-chimiques étudiées ne sont pas significativement modifiées.

III-Partie 2 : Caractérisations mécaniques après différents traitements chimiques et physiques

III.2.1. Résumé

L'ensemble des résultats des analyses chimiques et physico-chimiques réalisées sur les faisceaux de PCL montre qu'il est possible de déterminer des conditions expérimentales de fonctionnalisation permettant de moduler le taux de greffage radicalaire du pNaSS à la surface des faisceaux de PCL sans en modifier les caractéristiques physico-chimiques.

Cependant, il reste à déterminer si ce traitement chimique de surface a un impact sur les propriétés mécaniques finales du matériau. En effet, dans la mesure où l'objectif des travaux réalisés est de développer une structure ligamentaire biodégradable assurant le transfert mécanique de l'implant vers le néo-ligament fonctionnel, il apparaît nécessaire d'avoir une structure de dégradation contrôlée afin de garantir la résistance aux contraintes mécaniques pendant le temps requis à la formation de ce nouveau ligament. Ainsi, le comportement mécanique initial d'une part et la reconstruction tissulaire d'autre part sont les deux points clés d'un tel dispositif.

Il est également important de noter que pour une utilisation à des fins médicales, les fils de PCL doivent subir de nombreuses étapes de traitement et/ou de « lavages » avant de pouvoir être implantés dans le corps humain.

Pour résumer, les différentes étapes auxquelles sont soumises les prothèses de PCL bioactives sont:

- a) L'ensimage. Le processus d'extrusion de la PCL sous forme de fils nécessite une opération de lubrification en sortie de filière afin de faciliter la manipulation et la tenue des fils de PCL au cours de l'élaboration de la prothèse - tricotage, couture, assemblage -. Le lubrifiant utilisé appelé également molécule d'ensimage, bien que de grade médical, est bien souvent très inflammatoire et très mal toléré par le corps humain.
- b) Le désensimage. Une étape dite de « désensimage » est nécessaire pour éliminer toutes les molécules d'ensimage ; cette étape requiert un ou plusieurs lavages intensifs et l'utilisation de solvants.

- c) Le greffage radicalaire par voie thermique ou par voie UV. Le procédé de greffage permettant de lier de manière covalente le pNaSS bioactif à la PCL.
- d) La stérilisation. La prothèse devra être stérilisée avant tout contact avec le milieu biologique.

Après avoir subi ces différents traitements, la prothèse ligamentaire doit être capable de supporter les contraintes physiologiques d'un ligament naturel.

Une étude a été conduite en partenariat avec l'Université de Technologie de Compiègne, afin de **déterminer les propriétés mécaniques des faisceaux de PCL aux différentes étapes du processus de fabrication** : sur faisceaux bruts, désensimés, ozonés, greffés thermiquement, greffés UV et stérilisés par rayonnement β par la société LARS. Le mode de stérilisation utilisé dans cette étude était celui actuellement employé pour la stérilisation des ligaments en PET commercialisés par LARS.

L'ensemble des résultats de cette étude est présenté sous la forme d'un article intitulé « Impact des traitements chimiques et physiques sur les propriétés mécaniques des faisceaux de fibres de poly(ϵ -caprolactone) pour la reconstruction du ligament croisé antérieur » publié dans la revue « Plos One » en octobre 2018. Les résultats principaux ainsi que les conclusions de cette étude sont résumés ci-après.

A. Essais de traction à rupture

L'ensemble des essais ont été réalisés sur des faisceaux de 20 fils de PCL extrudés et fournis par la société Luxilon, maintenus ensemble par un nœud à chaque extrémité. Les premiers essais de traction à rupture ont permis de déterminer que la vitesse de déformation optimale à l'observation des propriétés mécaniques intrinsèques était de $3,6 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$, ce qui correspondait à 0,6% de déformation de l'échantillon par seconde. Cette vitesse permettait en effet de s'affranchir d'un quelconque glissement des fibres à l'intérieur des mors et d'avoir une bonne observation de l'échantillon (durée d'un essai : 210 secondes).

L'influence des traitements chimiques et physiques sur les faisceaux a ensuite été évaluée au travers de la comparaison des caractéristiques mécaniques suivantes : le module de Young E , la déformation élastique ϵ et la contrainte à rupture σ_{max} . **Les valeurs initiales pour les fibres brutes de PCL étaient : un module d'Young $E = 1400 \pm 92 \text{ MPa}$, une déformation $\epsilon = 13,7 \pm 1,0 \%$ et une contrainte à rupture $\sigma_{\text{max}} = 313,5 \pm 6,6 \text{ MPa}$.** Ces valeurs conviennent parfaitement au remplacement du LCA car pour rappel les caractéristiques mécaniques du LCA humain natif sont : $E = 114 \pm 53 \text{ MPa}$, $\epsilon_{\text{endommagement}} = 12,0 \pm 4,2\%$ et $\sigma_{\text{max}} = 24,5 \pm 11,2 \text{ MPa}$ (cf. Chapitre 1).

Par ailleurs, les essais menés entre chaque étape de manipulation et de traitement des faisceaux de PCL ont permis de constater que :

- le procédé de désensimage ne modifie pas les caractéristiques mécaniques étudiées ;
- l'étape d'ozonation, indispensable pour activer la surface avant le procédé de greffage, n'influence pas les valeurs de E et de σ_{\max} mais augmente de manière significative la déformation de 21% ;
- le greffage radicalaire amorcé par voie thermique modifie l'ensemble des valeurs avec une diminution de 17% de la valeur du module de Young et de 6% de la contrainte à rupture mais avec une augmentation significative de la déformation élastique qui atteint alors une valeur de $18,67 \pm 1,05\%$;
- le greffage radicalaire amorcé par voie UV ne modifie pas la valeur du module d'Young, mais diminue de 11,4% celle de la contrainte à rupture ainsi que de 26% la déformation élastique qui chute à $12,65 \pm 0,97\%$, revenant ainsi à sa valeur initiale ($\epsilon_{\text{fibres brutes}}$) ;
- la stérilisation β augmente la valeur du module d'Young, diminue la déformation élastique, et de manière très conséquente diminue la contrainte à rupture de 22,2% pour atteindre une valeur de $217,80 \pm 3,23$ MPa.

Il est important de noter que les résultats obtenus avec le greffage radicalaire amorcé par voie thermique ont été observés de manière identique sur des échantillons ayant subi les mêmes conditions expérimentales (température, solvants, temps) que le greffage thermique mais sans l'ajout du monomère de NaSS dans la solution. Ces informations permettent d'affirmer que **la modification des propriétés mécaniques, notamment l'augmentation de la déformation élastique, est bien liée au traitement thermique et non à la présence du monomère seul**. De plus, les résultats obtenus avec le greffage radicalaire amorcé par voie UV viennent appuyer le fait que ces modifications ne sont pas liées à la liaison covalente de pNaSS.

B. Impacts du traitement thermique

L'observation des courbes de contrainte-déformation des faisceaux de PCL a montré que celles-ci correspondaient parfaitement au comportement d'un matériau semi-cristallin et que **les fibres de PCL avaient un comportement viscoélastique similaire à celui observé sur les courbes** contrainte-déformation **du LCA humain** pouvant être trouvées dans la littérature. En effet, ces courbes présentaient trois domaines caractéristiques : (i) un premier domaine correspondant à l'alignement des fibres du faisceau ; (ii) un second domaine élastique ; (iii) et enfin un domaine plastique allant jusqu'à la rupture de tous les fils.

L'ensemble des différents traitements imposés aux faisceaux de PCL avait pour conséquence de modifier le domaine élastique afin de faire distinctement apparaître un premier domaine élastique linéaire suivi d'un deuxième domaine que nous avons supposé être élastique non-linéaire. Ce dernier domaine non linéaire était présent quel que soit le traitement physico-chimique appliqué, mais était amplifié avec le « greffage thermique », induisant une diminution de la pente de la courbe de l'ordre de 25%.

Afin de confirmer ou d'infirmer que ce domaine était bien élastique, des essais de charge-décharge ont été réalisés. Les faisceaux ont été soumis à une charge à 3,5 N, 24 N ou 51 N, correspondante aux forces requises pour atteindre respectivement la première partie du domaine élastique, la deuxième partie de ce même domaine et le domaine plastique. Les faisceaux ont pu retrouver leur état initial sans déformation résiduelle dans les deux premiers cas et avec une déformation irréversible dans le dernier cas, confirmant ainsi le caractère élastique des deux premiers domaines.

D'autre part, afin de comprendre le mécanisme à l'origine de l'augmentation significative de la déformation élastique du matériau après le « greffage thermique », nous avons étudié l'évolution de la microstructure de films de PCL après différents « traitements thermiques ». Ainsi, il a été observé qu'après le traitement thermique d'un film de PCL de 4 jours à 45°C, un réarrangement des chaînes macromoléculaires dans le domaine cristallin avait lieu avec la formation de deux tailles de sphérolites. Dans le cas des fibres de PCL, les essais de charge-décharge ont révélé des courbes d'hystérésis permettant de calculer une perte d'énergie, suggérant un réarrangement moléculaire engendré par la déformation élastique non linéaire. Les résultats ont en outre montré que la dissipation d'énergie était doublée pour les faisceaux greffés thermiquement, confortant l'idée que le traitement thermique induit une modification de la microstructure augmentant la déformation.

En conclusion, cette étude permet d'affirmer que certains traitements physico-chimiques comme le désensimage ne modifient pas les caractéristiques mécaniques des faisceaux de PCL, alors que d'autres tels que l'ozonation, le greffage radicalaire ou la stérilisation β peuvent influencer le comportement mécanique de la structure finale. En effet, les résultats ont montré que **l'utilisation de rayonnements ionisants tels que les rayons UV ou les rayons β entraîne un durcissement du matériau, augmentant sa rigidité mais aussi sa fragilité.** Au contraire, d'autres traitements, tel que le greffage radicalaire thermique, ont permis une augmentation significative de la déformation élastique non linéaire du polymère, agissant comme un traitement de type « recuit ». Avec ce traitement thermique, la rigidité des faisceaux a diminué, entraînant une dissipation possible d'énergie plus élevée. Ces conclusions corrélées à l'observation de la structure du matériau,

démontrent la **capacité de la PCL de moduler sa microstructure en fonction de son historique thermique.**

Bien que l'objectif principal du greffage soit la modification de la chimie de surface par liaison covalente d'un polymère bioactif pour en améliorer la réponse biologique, **ce procédé, suivant son mode d'action, peut améliorer simultanément la biocompatibilité et la déformation élastique de la PCL au cours d'une seule et même étape.** La déformation des faisceaux de PCL greffés « thermiquement » pendant 3h a été augmentée dans cette étude de $13,7 \pm 1,0 \%$ à $18,80 \pm 1,32 \%$. Or, dans le cas de l'application spécifique de la reconstruction du LCA, la nécessité d'une prothèse capable de supporter une déformation réversible d'environ $13 \pm 2\%$ (contrainte moyenne du LCA pendant la marche)[98] est fortement nécessaire pour maintenir la stabilité du genou et ainsi éviter une distension de la prothèse.

III.2.2. Article paru dans la revue scientifique « Plos One »

Impact of chemical and physical treatments on the mechanical properties of
poly(ϵ -caprolactone) fibers bundles for the anterior cruciate ligament
reconstruction

Amélie Leroux¹, Christophe Egles², Véronique Migonney^{1*}

¹Laboratory of Biomaterials and Polymers of Specialty, UMR CNRS 7244, Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France

²Laboratory of Biomechanics and Bioengineering, UMR CNRS 7338, Sorbonne Universités, Université de Technologie de Compiègne, Compiègne, France

*Corresponding author

E-mail: veronique.migonney@univ-paris13.fr (VM)

Abstract

The anterior cruciate ligament rupture is one of the most common sport injuries. Due to ligaments' poor healing capacity, surgical intervention is often required. Nowadays, these injuries are managed using replacement autografts or to a lesser extent using artificial ligaments. With the expansion of tissue engineering, more recent researches focus on the development of biodegradable structures that could allow graft functioning while enhancing host integration. The main challenge is to develop a structure that gradually loses its mechanical properties when at the same time the neo-ligament gains in solidity. Mechanical behavior and reconstruction of natural tissue are the two key points for such a successful device. This article evaluates the mechanical consistency of poly(ϵ -caprolactone) fibers bundles grafted with sodium polystyrene sulfonate, as a candidate for ligament prosthesis. In order to be medically used, PCL fibers need to cope with multiple steps before implantation including extensive washings, knitting, grafting and sterilization processes. The evolution of mechanical properties at each step of the elaboration process has been investigated. The results show that PCL bundles have the same visco-elastic behavior than the native ACL. Nevertheless, when undergoing physical treatments such as ionizing radiations, like UV or β -rays, the material endures a hardening, increasing its stiffness but also its fragility. At this opposite, the thermal radical grafting acts like an annealing step, increasing significantly the elasticity of the PCL fibers. With this chemical treatment, the stiffness is decreasing, leading to higher energy dissipation. Added to the observation of the structure of the material, this demonstrates the possibility of the PCL to modulate its microstructure. In case of orthopedic prosthesis, the need of such a construct is strongly required to avoid distension of the future prosthesis and to restore good knee stabilization, showing the promising future of PCL ligament prosthesis.

Introduction

The anterior cruciate ligament (ACL) rupture is a common injury which mainly affects young and active population[168]. Faced to this problem, the development of synthetic devices for ligament reconstruction began in the early 80's[169]. After a multiple range of non-adapted materials used, leading to synovitis[170]–[172] or prosthesis rupture[173], [71], the choice of poly(ethylene terephthalate) (PET) appeared to be promising[79], [174], [175]. Nevertheless, nowadays the non-degradable PET synthetic ligaments commercialized still encounter limitations such as the anchorage to the bone, the release of tear particles due to abrasion and a poor cell recolonization with limited tissue ingrowth[176]. Given that, many studies are conducted with the purpose of finding a material and a design which can have similar mechanical properties than the native ACL and be well integrated in the body avoiding adverse reactions as foreign body response [177]–[180]. Different

kinds of surface treatments are possible to improve the bio-integration of prostheses, such as the control of the surface roughness, surface chemistry to increase the hydrophilicity[181] or the grafting of bioactive molecules as peptides or drugs [182], [183] able to interact positively with the biological environment[184]. Moreover, with the expansion of tissue engineering applications, the last objective is to develop biodegradable ligament prostheses which degradation rate should guarantee resistance to mechanical stress during the required time to the formation of a regenerated ligament and can act as a scaffold for cells colonization[76], [141], [97].

Our laboratory has been working for several decades on the elaboration of bioactive surfaces by using sodium poly(styrene sulfonate) (pNaSS) functionalization to allow the control of the cell response[185], [186]. pNaSS polymer has been covalently grafted on PET LARS® ligament by using a grafting “from” technique in order to improve the cell response[187], [188]. After promising *in vitro* studies results [187], [189], an *in vivo* study on sheep confirmed good recovery after 3 and 12 months implantation, demonstrating an improvement of the cell adhesion and colonization along the PET fibers of the prosthesis as well as the cell activity which can be compared to that of native ACL [189], [190]. With the knowledge of this surface chemistry control and within the tissue engineering context, we started working with polycaprolactone (PCL) as a candidate for the elaboration of a future degradable synthetic ligament. PCL is a semi-crystalline polyester which has its glass transition temperature (T_g) at -60°C and its melting point in the range of 59°C to 64°C [191] and which degradation is estimated to take 3 to 4 years depending on its molecular weight[108], [192], [193]. It exhibits a viscoelastic comportment[194], presuming being a good material for ligament reconstruction. In addition, PCL is already used in medical devices on the market such as suture, ophthalmic patch graft, intrauterine device etc., so that its biocompatibility is well-established[191]. The authors have first developed the pNaSS grafting process on PCL films[195], [196] and the process extended to PCL fibers bundles is presented in this study.

In order to achieve and control the extrusion of polymer fibers, the textile industry uses spin finish, waxes or lubricants [197]. Unfortunately, these manufacturing products can be harmful when released from implants in body fluids of patients. Then, in order to be medically used, PCL fibers need to cope with multiple steps before implantation including extensive washings to remove spin finish, knitting into a final prosthesis, grafting process to covalently bind bioactive pNaSS and finally, sterilization process. In this article, we investigated the mechanical properties of PCL fibers bundles after the different steps of the elaboration process: crude fibers, fibers after spin finish removal, fibers that have undergone the pNaSS-grafting process and sterilization. After the elaboration and functionalization of the samples, we firstly checked the presence of the pNaSS grafting using a colorimetric assay. Then, the samples were seeded with primary sheep ACL cells in order to confirm the bioactive feature of pNaSS grafted-PCL fibers. In parallel, we tested the mechanical properties of

PCL fibers through different strain rate to define optimal conditions of mechanical assays. Afterwards, we applied an axial load until samples rupture and determined the intrinsic mechanical properties. Loading experiments were achieved to validate the limit of the elastic domain. Finally, in order to understand the mechanical behavior of the pNaSS grafted and ungrafted PCL bundles, we correlated the mechanical properties results to the microstructure of PCL films elaborated following different thermal treatments.

Material and methods

Samples preparation

Preparation of PCL fibers bundles

20 PCL fibers of $110\pm 15\mu\text{m}$ diameter each (Purasorb PC 12, Luxilon Industries - Belgium) are associated and tied together in order to form 40 ± 10 mm length fibers bundles. To remove the spin finish, bundles 10% (w/v) are sequentially ultrasound washed as following: hexane for 15 min, absolute ethanol for 5 min, then water two times for 5 min. Samples are then dried under vacuum and stored at 4°C until grafting process or experiments.

Preparation of PCL films

Spin coating. PCL films are manufactured using a spin-coating method. A PCL (Sigma-Aldrich, $M_n = 80$ kDa) solution in dichloromethane (30% (w/v)) is dropped onto a glass slide and then spun for 30 seconds at 1500 rpm using a SPIN150-v3 SPS. Films are then dried overnight at room temperature to evaporate the solvent.

Thermal treatments. The following thermal treatments are achieved on PCL films: (a) 4 days at 45°C , (b) 10 min at 60°C (melting temperature) then tempered in frozen water. Films are then cut into small disks of $14\text{ mm} \pm 1\text{ mm}$ diameter and stored at 4°C before observation in SEM. SEM images were carried out using a Hitachi TM3000 SEM operating at 15 kV.

Grafting of poly(sodium styrene sulfonate (pNaSS) on PCL bundles

PCL bundles samples are functionalized with polyNaSS using a grafting "from" technique. After the spin finish removal step, PCL bundles are ozonated at 30°C in distilled water under stirring for 10 min. Ozone is generated using an ozone generator BMT 802 N (ACW) with a gas pressure of 0.5 bars and an oxygen flow rate of 0.6 L min^{-1} . Secondly, the ozonated PCL samples are transferred into a degassed aqueous NaSS solution (15% (w/v)) under argon and maintained either (i) 3 hours at 45°C under stirring for thermal grafting, or (ii) 30 min under UV (irradiance 10 W/cm^2 , Omnicure® Serial 2000, Polydispensing system) for UV grafting, in order to allow the radical polymerization of the

monomer. Then, samples are extensively washed with distilled water for 48 hours and then vacuum-dried. The evidence of the pNaSS grafting is provided by toluidine blue colorimetric assay and the grafting rate is determined according to Ciobanu et al [123].

Cells culture

Cells isolation

Anterior cruciate ligaments (ACL) from sheep are collected thanks to the collaboration with Pr V. Viateau at the ENVA, Maisons-Alfort, France (Ligart protocol). Tissues are cut into small pieces of 1 to 2 mm², washed three times in DPBS (Gibco) and incubated in a 0.1% (w/v) collagenase (Sigma-Aldrich) solution for 6 hours at 37°C under 5% CO₂. The mixture solution is centrifuged (3 min at 1500 rpm): the supernatant is withdrawn and the clot is resuspended in DMEM (Gibco) complemented with 10% Bovine Calf Serum (Sigma-Aldrich), 1% Penicillin-streptomycin (Gibco), 1% L-glutamine (Gibco); cells are cultured in flask until confluence and prior seeding on samples.

In vitro study

pNaSS-grafted and ungrafted PCL bundles samples are placed on the bottom of a 24-wells plate using Teflon inserts. Primary sheep ACL fibroblasts (sACL) are seeded onto the PCL fibers bundles at a density of $5 \cdot 10^4$ cells/well and cultured 3 days at 37°C, 5% CO₂. After this period of time, the bundles are observed with an inverted phase-contrast microscope (CKX31 - Olympus).

Sterilization

Thermally pNaSS grafted fibers bundles were sent to LARS Company for undergoing beta sterilization according to the authorized final process currently used for PET ligaments sterilization.

Mechanical testing

All the mechanical assessments are carried out on PCL bundles samples by using a Bose Electroforce 3230 equipment (Bose).

Traction experiments

Differently treated PCL bundles (effective length = 10mm) have undergone with tensile loading until rupture. Stress strain curves until rupture are recorded and Young's Modulus E in MPa, elongation ϵ in % and the ultimate tensile stress (UTS) in MPa are determined.

Load and unload experiments

Load-unload and fatigue fracture tests. Stress fracture is studied by alternatively applying load and rest periods to the PCL bundle samples. The different bundles samples are submitted to the following loads 3.5, 24 or 51N. The consecutive dissipation of energy is calculated as the integral of the area enclosed by the hysteresis curve from the load displacement graphs.

Statistical analysis and software's

All the experiments are carried out a minimum of 8 times to get at least 6 usable results. Statistics are calculated with ANOVA test ($p \leq 0,005$ is considered statistically significant). Lengths of cells and spherulites are measured with Image J software. Energies dissipation are calculated with OriginPro 8 software.

Results

The presence of grafted pNaSS molecules on PCL fibers bundles samples was determined according to the toluidine blue assays process. The obtained average value of the grafting rate of the fibers bundles ($n=20$) equals $1.14 \pm 0.50 \mu\text{mol.g}^{-1}$.

Cell culture *In vitro* assays

After 3 days of culture, the cell morphology along the PCL fibers of the bundles was clearly different if cells were seeded on pNaSS grafted or on ungrafted fibers bundles as shown in Figure 54. The cell spreading, as defined by the mean surface occupied by the cells, was found to equal $49.5 \pm 17 \mu\text{m}$ on the ungrafted samples whereas it equals $76.5 \pm 27.7 \mu\text{m}$ on the grafted samples. Results showed that cells are two times more spread (+ 54%) when PCL fibers were grafted by pNaSS in comparison to virgin PCL fibers. In addition, the number of adherent cells on surfaces is also higher on the pNaSS grafted- fibers bundle when compared to the ungrafted one as shown in Figure 54.

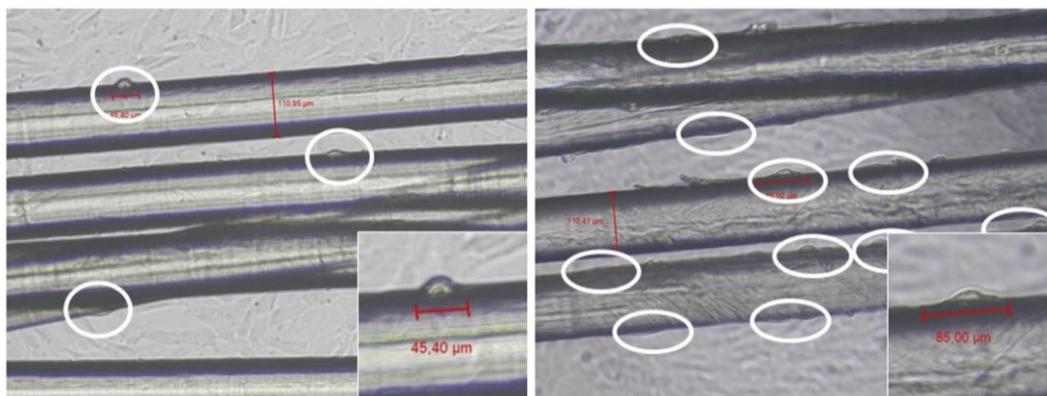


Figure 54 : Images of primary sheep ACL cells seeded onto ungrafted (left) and grafted (right) PCL fibers bundles after 3 days of culture.

Mechanical properties

Determination of the optimal strain rate conditions

Different strain rates were tested to determine the optimal conditions of the mechanical assays on PCL fibers bundles (Table 12). Results presented in Table 12 and 13 evidenced the variations of the deformation when varying the strain rate. According to these results, the best condition which corresponds to the lower value of the strain rate equals $3.6 \text{ mm}\cdot\text{min}^{-1}$ and corresponds to 0.6% sample deformation per second. Indeed, at this strain rate the slippage of the fibers inside the grips is limited and allows sufficient observation time before rupture, with an average of 210 seconds before the sample break. This strain rate value was then used for all the following mechanical experiments.

Table 12: Experiment times and percentages of sample deformation per second at different strain rates tested

strain rate ($\text{mm}\cdot\text{min}^{-1}$)	3.6	6	10	30	50
Time of experiment (sec)	210	126	76	26	15
Percentage of deformation/sec	0.6%	1%	1.7%	5%	8.3%

Tableau 13 : Mechanical data obtained from experimental curves

	Young's modulus	Elastic limit	Yield stress	Elastic strain	Maximum load	Ultimate Tensile Stress	Ultimate strain
	MPa	MPa	MPa	%	N	MPa	%
Bundles with strain rate of 0.06 mm/s	1400 ± 92	163.05 ± 7.99	-	13.65 ± 1.00	59.58 ± 1.25	313.49 ± 6.57	81.96 ± 3.22
Bundles with strain rate of 0.10 mm/s	1482 ± 39	158.33 ± 0.61	-	12.10 ± 0.17	59.21 ± 1.68	311.51 ± 8.84	83.84 ± 5.38
Bundles with strain rate of 0.17 mm/s	1398 ± 96	168.56 ± 10.04	-	13.05 ± 1.14	59.67 ± 1.86	313.92 ± 9.79	78.86 ± 4.61
Bundles with strain rate of 0.50 mm/s	1506 ± 71	170.45 ± 8.98	-	12.79 ± 0.58	61.29 ± 0.71	322.47 ± 3.72	84.54 ± 2.86
Bundles with strain rate of 0.83 mm/s	1547 ± 60	179.44 ± 11.24	-	13.36 ± 1.32	-	-	-
Crude bundles	1400 ± 92	163.05 ± 7.99	246.69 ± 7.94	13.65 ± 1.00	59.58 ± 1.25	313.49 ± 6.57	81.96 ± 3.22
Bundles without spin finish	1404 ± 110	159.36 ± 5.10	246.3 ± 5	13.21 ± 0.40	58.63 ± 2.62	308.47 ± 13.78	76 ± 6.8
Bundles after ozonation	1324 ± 45	160.20 ± 6.60	249.41 ± 2.03	16.06 ± 0.79	59.34 ± 1.42	312.20 ± 7.45	91.08 ± 5.64
Bundles after thermal treatment without pNaSS	1098 ± 82	150.20 ± 6.49	239.36 ± 8.12	18.67 ± 1.05	55.74 ± 2.20	293.25 ± 11.56	92.62 ± 8.33
Bundles after thermal grafting	1125 ± 49	161.42 ± 11.24	237 ± 11	18.80 ± 1.32	53.21 ± 2.67	279.98 ± 14.06	74.88 ± 10.84
Bundles after UV grafting	1301 ± 49	133.30 ± 10.28	226 ± 7	12.65 ± 0.97	52.60 ± 1.40	276.74 ± 7.36	77.89 ± 1.78
Bundles after thermal grafting + β sterilization	1258 ± 51	126.05 ± 8.91	199.50 ± 3.35	15.40 ± 1.40	41.40 ± 0.61	217.80 ± 3.23	78.50 ± 4.23

Influence of chemical and physical treatments on the mechanical characteristics of the pNaSS grafted and ungrafted PCL bundles

The mechanical characteristics - Young's modulus (E) , elastic strain (ϵ) and ultimate tensile stress (UTS) - were determined for PCL bundles having undergone different treatments – spin finish removal, pNaSS grafting comprising ozonation, polymerization at 45°C or under UV and sterilization – (Table 13 and Fig 55).

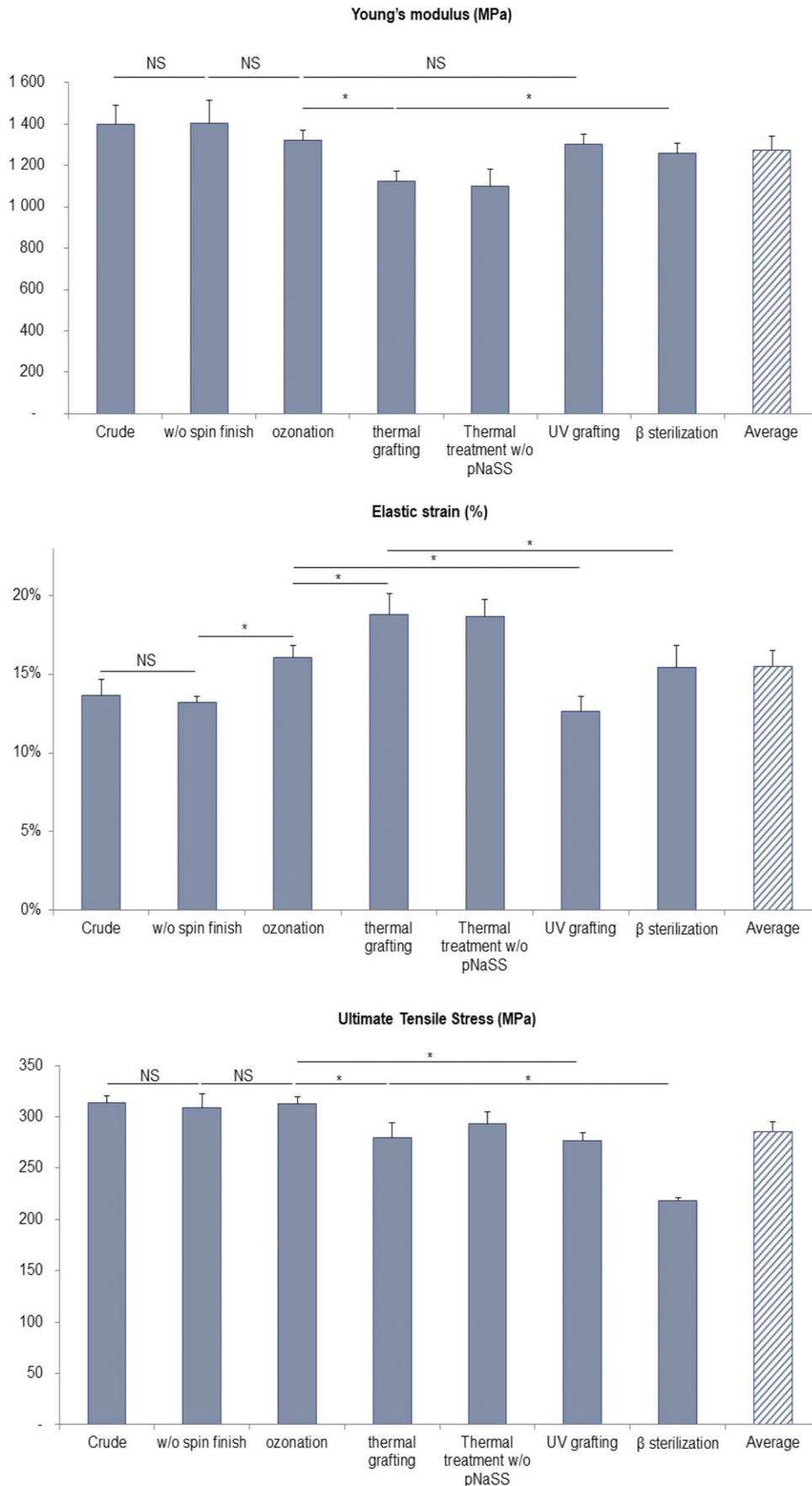


Figure 55 : Young's modulus, elastic strain and ultimate tensile stress obtained from stress-strain curve after different chemical and physical treatments (NS = Not Significant / * $p \leq 0,005$)

Crude fibers and spin finish removal step

Crude PCL fibers bundles: the Young's modulus E equals 1400 ± 92 MPa, with an elasticity ε value of $13.65 \pm 1.0\%$ and a UTS of 313.49 ± 6.57 MPa.

Removal of spin finish: The three values E , ε and UTS are quite identical before and after the removal process of the spin finish (see Table 13).

pNaSS grafting process

The grafting of pNaSS is carried out in two steps: (a) an activation step of ozonolysis to create hydroperoxide and peroxide groups on the PCL surface (oxidation), (b) the polymerization of NaSS from the activated surface (radicals' generation and radical polymerization). The mechanical characteristics of the samples after each step were determined and showed that:

- the first step of ozonation doesn't impact neither the Young's modulus E or the ultimate tensile stress UTS values whereas the elasticity is significantly increased (21%) varying from $13.21 \pm 0.40 \%$ to $16.06 \pm 0.79 \%$
- the second step – polymerization from the surface by thermal grafting – is achieved in water for 3 hours at 45°C . This step is evidenced to significantly impact all the mechanical characteristics: the Young's modulus and the ultimate tensile stress are both decreased, 17% for E which varies from 1324 ± 45 to 1098 ± 82 MPa and 6% for UTS which is decreased from 312.20 ± 7.45 to 293.25 ± 11.56 MPa while the elastic strain is 16% increased from 16.06 ± 0.79 to $18.67 \pm 1.05\%$. These tendencies were identically observed when fibers bundles have undergone the thermal grafting step of 3h at 45°C but without the presence of the NaSS monomer in the solution, demonstrating that these modifications are linked to the temperature treatment and not to the presence of the monomer.
- the UV grafting process, does not impact the Young's modulus as observed after the ozonation step. A slight decrease (11.4%) of the ultimate tensile stress is observed, UTS varies from 312.20 ± 7.45 to 276.74 ± 7.36 MPa. Interestingly, we observed a 26% decrease of the elasticity which varies from 16.06 ± 0.79 to $12.65 \pm 0.97 \%$, going back to the ε observed value of the fibers after the removal of the spin finish. Taking this into account, the previous augmentation of the elasticity observed after the thermal grafting is not linked and cannot be attributed to the covalent binding of pNaSS.

Sterilization impact

The sterilization process was carried out by β rays. It has been achieved on the thermal grafted bundles. Results in terms of mechanical characteristics showed that the β rays sterilization process induced: (a) an increase of the samples stiffness when comparing the Young's modulus value to that was observed after the thermal grafting step (1125 ± 49 MPa); indeed, E value recover the observed value after the ozonation step and equals 1258 ± 51 MPa, (b) a decrease of the elastic strain reaching

ϵ value previously obtained after the ozonation step and equals to $15.40 \pm 1.40\%$, (c) a significant decrease of the ultimate tensile stress of 22.2% which varies from 279.98 ± 14.06 to 217.80 ± 3.23 MPa after β sterilization.

Stress-strain curve - mechanical behavior analysis

The stress-strain curves of the PCL fibers bundles present three domains (see Fig 56): (a) a first domain corresponding of the alignment of the fibers of the assessed bundle, (b) a second domain which corresponds to the elastic domain, followed by (c) a plastic domain going until the rupture of all the fibers. It is worth noting that the stress-strain curves obtained after the different chemical treatments of PCL bundles exhibit altered curves with two slopes within the elastic domain (Fig 56):

-a first linear elastic domain (IIa) corresponding to a deformation ϵ of $1.44 \pm 0.23\%$ of the samples and until a stress of 18.2 ± 3.7 MPa

-a second elastic (IIb) corresponding to a deformation ϵ of $15.5 \pm 2.5\%$ of the samples and a strain force of 150.5 ± 15 MPa. This non-linear elastic domain is present on the stress strain curves of all the PCL fibers bundles samples whatever the applied physico-chemical treatment. This is amplified in the case of the thermal grafting treatment which induces an approximate 25% decrease of the slope.

-a plastic domain (III) appearing for ϵ deformation of $81.8 \pm 7.2\%$ of sample deformation and for a stress of 286 ± 34 MPa.

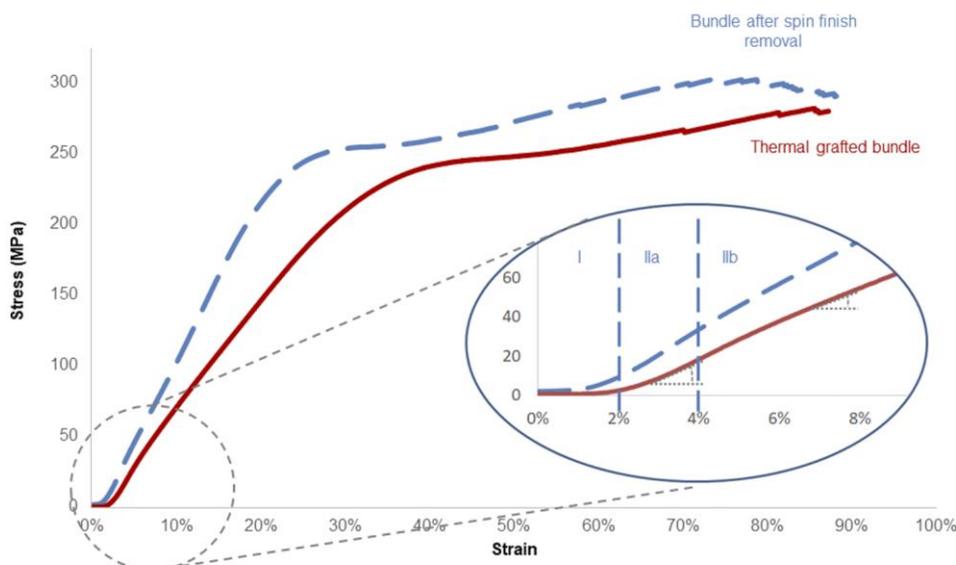


Figure 56 : Typical strain-stress curves and delimitation of domains for bundles after spin finish removal (dashed line curve) and thermal grafted bundles (full line curve)

Load-unload experiments

In order to define the elastic and the plastic domain limits, fibers bundle samples were submitted to load at 3.5N, 24N or 51N, corresponding to the required forces to respectively reach the domains IIa,

IIb and III. The deformation against time chart shows that fibers bundles recover their initial stage without residual deformation for loading values 3.5N and 24N - elastic domain, whereas at 51N loading , a plateau value is observed corresponding to irreversible deformation of the fibers bundle samples (plastic domain) as seen in Figure 57.

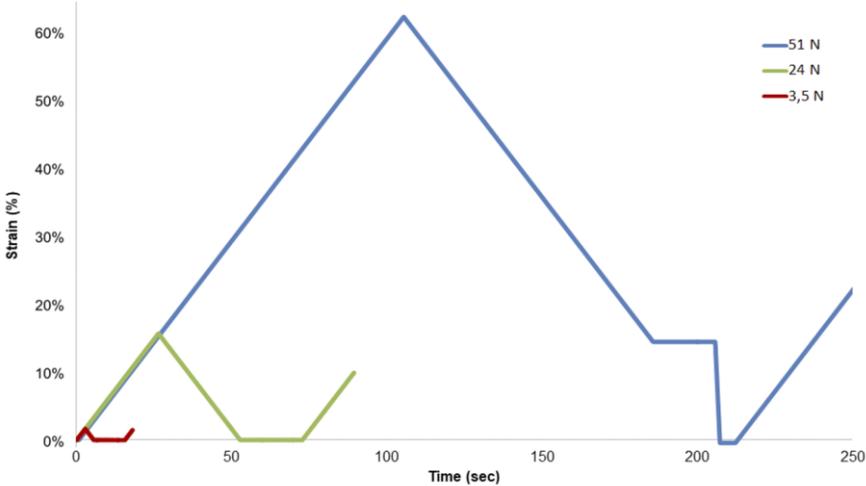


Figure 57 : Deformation in time of bundles which endured loading of either 3.5N, 24N or 51N

Moreover, from the same experiments, the force-displacement curves show an hysteresis loop for each of the three domains (Fig 58).

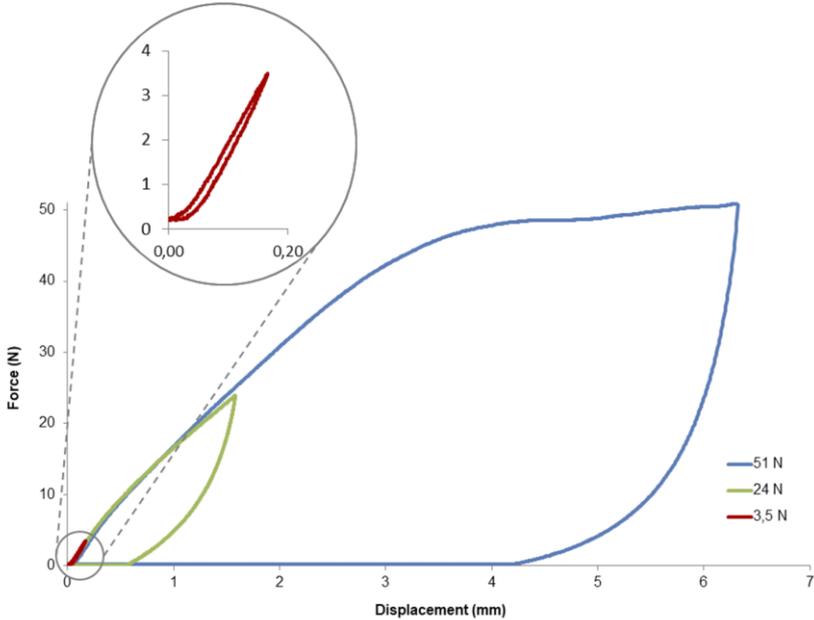


Figure 58 : Hysteresis loops obtained after load-unload experiments onto grafted samples

Insofar as this is the non-linear elastic domain which is increased when the samples have undergone with thermal grafting, the energy loss was calculated from the hysteresis at 24N (Fig 59). For a non-grafted sample, the energy dissipation equals 6.5 ± 0.1 mJ whereas the dissipation of energy is doubled - equals 12.0 ± 0.9 mJ for pNaSS grafted samples.

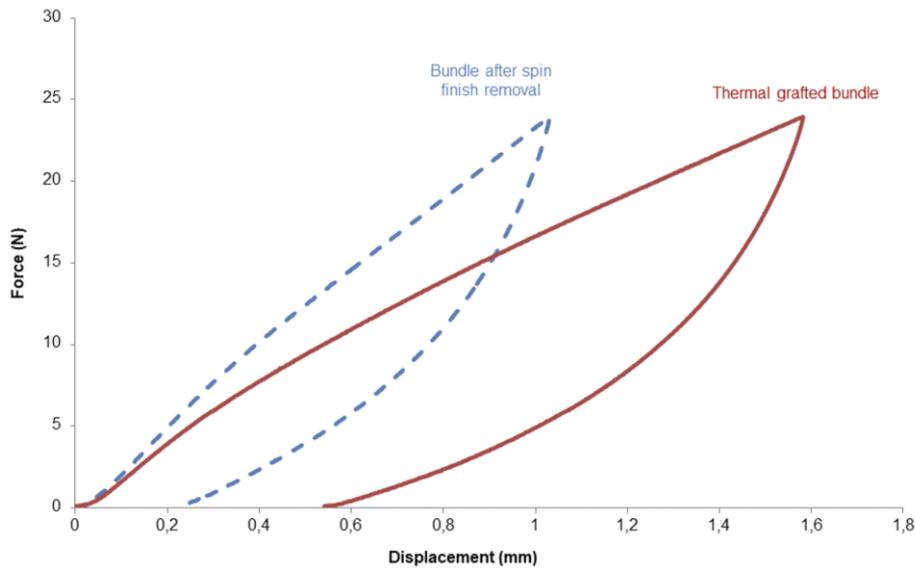


Figure 59 : Comparison of the hysteresis loops for ungrafted (dashed line curve) and grafted (full line curve) samples after a load of 24N

Microstructure of PCL

As the pNaSS grafting process of PCL requires working temperatures from room temperature to 45°C which is not so far from PCL T_m , the alteration of PCL microstructure has been observed by SEM images after different thermal treatments (Fig 60). PCL films left at room temperature after the spin coating process present a crystalline structure with spherulites of average size equaling $22.4 \pm 6.1 \mu\text{m}$ separated by very straight lines. After 4 days at 45°C, the microstructure is changed and a rearrangement of the macromolecular chains within the crystalline domain was observed resulting in the formation of two types of spherulites: big spherulites of size average $27.9 \pm 6.4 \mu\text{m}$ surrounded by smaller ones of $8.1 \pm 2.4 \mu\text{m}$ size. When the film is quenched after melting an amorphous and homogeneous structure is observable.

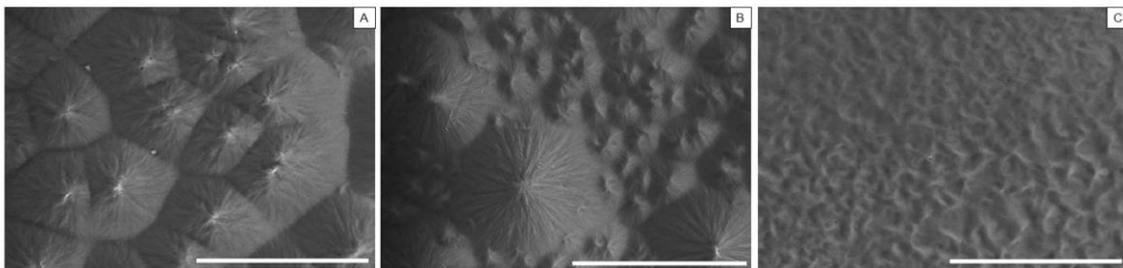


Figure 60 : SEM images of spin-coating PCL films after 1 night at room temperature (A) ; after 4 days at 45°C (B) ; after quenching (C) (Scale bar = 50 μm)

Discussion

Cell response

The *in vitro* cell morphology study showed that the presence of a bioactive coating on the PCL fibers material like the pNaSS grafting significantly improved the cell spreading and the numbers of adhered cells when compared to virgin PCL fibers samples. This result was in agreement with the one

observed on pNaSS grafted PCL films[196] and confirmed the interest of grafting pNaSS on PCL fibers bundles dedicated to the elaboration of implantable synthetic ligament prosthesis. Indeed, it is well known that adhesion, spreading, proliferation and gene expression are interconnected key factors of a good cell activity[198]. The implantation of synthetic materials having a huge impact on the host response, the expected better cell response is encouraging for improving the host response. Nevertheless, the improvement of the biological response by the pNaSS grafting must not be done to the detriment of the mechanical properties especially for orthopedic applications and of the integrity of the structure of the material. It is worth noting that the stress-strain curves obtained for the PCL fibers bundles were comparable to that of native anterior cruciate ligaments.

Mechanical behavior analysis

The mechanical stress-strain curves of PCL fibers bundles (see Fig 56) corresponded perfectly to a semi-crystalline material with a viscoelastic behavior [194]. Because of the values of its glass temperature T_g (-60°C) and melting point T_m (59 to 64°C), poly-caprolactone naturally behaves in caoutchoutic state at room temperature which allows mobility of the molecular chains when compared to other biodegradable polyesters as PLA and PGA[191], [199], [200].

The study of the mechanical properties of pNaSS grafted and ungrafted PCL fibers bundles demonstrated that a treatment like the removal of the spin finish, did not affect the material whereas others treatments as ozonation, radical grafting or β sterilization can influence the mechanical behavior of the final construct. Indeed, the results showed that the use of ionizing radiation like UV or β -rays increases the stiffness of the material but also its fragility resulting in a hardening of the material. The method of sterilization for the future prosthesis has to be chosen very carefully and it will be necessary to extend this study to other sterilization processes as ethanol or ethylene oxide.

In contrast, other treatments like thermal radical grafting were found to increase the non-linear elasticity of the polymer, acting like an annealing step. The first objective of the heating is the modification of the chemical surface by covalent binding of a bioactive polymer, but the results showed that it could also significantly increase the elasticity of the fibers until $18.8 \pm 1.3\%$. In the case of the specific application of the ACL reconstruction, the need of a construct which can endure a reversible deformation around $13 \pm 2\%$ (average strain of the ACL during walking)[201] is strongly required to maintain the stability of the knee by avoiding a distension of the prosthesis. To summarize these data demonstrate, the possibility of improving the biocompatibility of the fibers surface and their elasticity in the same time during the same very efficient process step.

Moreover, we observed that the stiffness is decreasing with the thermal grafting, leading to a higher energy dissipation calculated onto the hysteresis loop. These results, added to the observation of

SEM images done onto films after different thermal treatments, demonstrated the possibility of the PCL to modulate its microstructure with prior thermal treatments. Taking into account that the knee temperature varies from 33°C at rest to 36.7°C after 1h walking[202], the importance of an orthopedic biomaterial implant which can modulate itself with temperature is given[104]. It could be interesting in further studies to mechanically evaluate PCL fibers bundles at temperatures varying from 33°C to 37°C in order to evaluate the evolution of their elasticity.

In a biological response control point of view, Abdel-Sayed et al. have demonstrated the possible impact of the dissipation energy of polymeric scaffolds onto the modulation of chondrogenic expression[203]. They observed a higher gene expression of the cells in contact with the material which has the closest energy dissipation to the healthy cartilage. With the help of the thermal grafting, we were able to increase the energy loss by our PCL fibers material, it will be interesting to study if we can modulate this parameter by modify the protocol of the grafting and then to study the gene expression of the osteoblast and the fibroblast in order to discover if we have the same effect for these type of cells.

Conclusion

The aim of the study was to demonstrate that bioactive poly(caprolactone) fibers bundles can present similar mechanical properties when compared to native ACL. This was demonstrated by different mechanical assays and confirms the interest of the choice of PCL for the elaboration of ligament prosthesis with appropriate mechanical behavior. Moreover, even if PCL is a well-known biocompatible polymer, the functionalization of its surface by a grafted bioactive polymer can significantly improve the biological response to this polymer material. This evolution to an improvement of the biocompatibility requires taking the mechanic modulations of the raw material in account. By studying the mechanical properties after different chemical and physical treatments, we demonstrated the possibility to modulate these features, especially the elasticity, according to the grafting process used. Finally, because the anterior cruciate ligament is naturally stressed in cycle fatigue, fatigue assays need to be performed; these results will allow us to go on starting bioreactor studies.

Acknowledgments

The authors would like to thank Jade Chura for technical help and Herbert Debreuck from Luxilon Industries NV for providing PCL fibers. This work was funded as part of the "Future Investment Project" by the French Public Investment Bank and the French state - PSPC application - Liga2bio project.

III-Partie 3 : Études biologiques

Après avoir établi et contrôlé les paramètres du greffage radicalaire du pNaSS par voie UV puis réalisé l'étude des propriétés physico-chimiques et mécaniques, la réponse biologique de cellules primaires de brebisensemencées sur faisceaux de PCL greffés ou non de pNaSS a été étudiée en termes de cytotoxicité, de prolifération et de morphologie cellulaires.

III.3.1. Etude de cytotoxicité

A. Essais de cytotoxicité – influence du type cellulaire

Comme dans le cas des films de PCL pour lesquels les résultats ont été reportés dans le chapitre II, des essais de cytotoxicité ont été conduits en utilisant différents types cellulaires : les lignées L929 et NIH3T3, ainsi que des cellules primaires de LCA de brebis (sACL). Pour chacun des essais, les faisceaux ont été préalablement soit simplement désensimés – ce sont les faisceaux non greffés (référéncés faisceaux NG), soit greffés de pNaSS par voie thermique (référéncés faisceaux G Th) et les protocoles des essais ont été décrits dans la partie matériel et méthode du chapitre II. Les résultats des essais de cytotoxicité en présence des faisceaux de PCL G et NG sont exprimés en % de viabilité cellulaire et sont présentés en Figure 61. Ils montrent qu'**aucune cytotoxicité n'est observée quelle que soit la nature du faisceau G ou NG et quel que soit le type cellulaire** ; la viabilité cellulaire était toujours supérieure à 87%. Comme pour les films de PCL, on peut noter que les viabilités cellulaires sont plus élevées lorsque les essais sont réalisés avec les cellules L929, cellules fibroblastiques préconisées dans la norme ISO 10993-5.

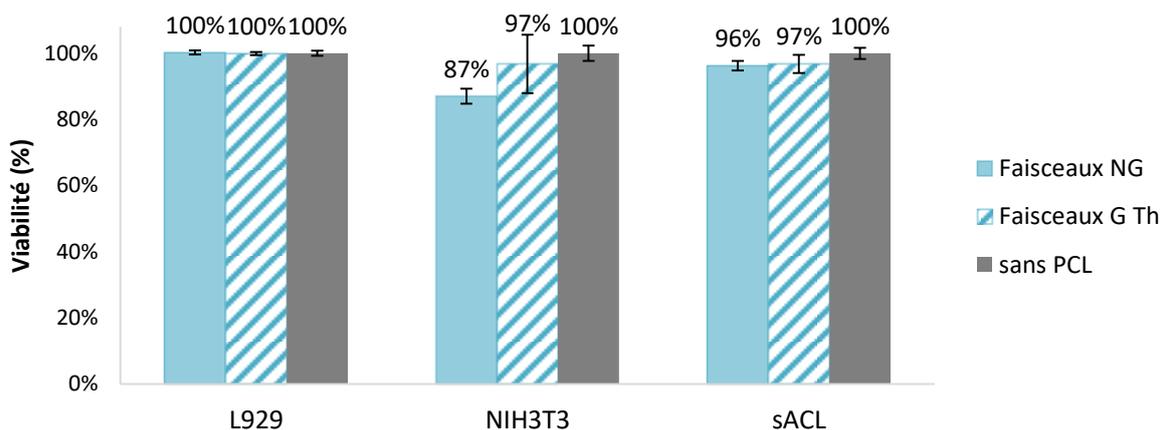


Figure 61 : évaluation de la cytotoxicité des faisceaux de PCL sur les fibroblastes L929, NIH3T3 et primaires de brebis (sACL)

B. Essais de cytotoxicité - effet de l'huile d'ensimage et des procédés de désensimage

Comme évoqué précédemment, l'industrie textile utilise des molécules d'ensimage afin de pouvoir extruder les fils de polymère de manière homogène et contrôlée. Bien que cette molécule d'ensimage - qui est un dérivé d'huile de soja - utilisée par notre partenaire industriel pour former les

fil de PCL soit de grade médical, la cytotoxicité de cette huile a logiquement été testée selon le protocole suivant :

- L'huile seule a été mise en contact direct avec des cellules primaires de brebis.
- Dans cet essai, la concentration d'huile est très élevée puisque 100µL d'huile ont été ajoutés à 400µL de DMEM puis incubés pendant 24h avec les cellules.

Les résultats de cette étude mettent en évidence la **cytotoxicité de l'huile d'ensimage** à cette concentration (absorbance quasi nulle = $0,067 \pm 0,006$). Les résultats du test MTT obtenus au moment de la lecture de l'absorbance sont présentés en Figure 62. Ils montrent des contrôles tout à fait conformes aux résultats attendus :

- le contrôle positif, représentant 100% de viabilité cellulaire, c'est-à-dire les cellules sur fonds de puit sans PCL, est fortement coloré (forte absorbance) ;
- tandis que le contrôle négatif - incubation des cellules avec un solvant polaire organique, le diméthylsulfoxyde (DMSO) connu pour être cytotoxique, présente bien une absence de coloration (très faible absorbance).

L'huile d'ensimage utilisée apparaît donc très cytotoxique vis à vis des cellules primaires de LCA de brebis lorsqu'elle est en solution à cette concentration et dès un contact de courte durée de 24h. Ce résultat montre la nécessité d'éliminer totalement cette molécule par un procédé de désensimage efficace avant toute utilisation médicale du dispositif.

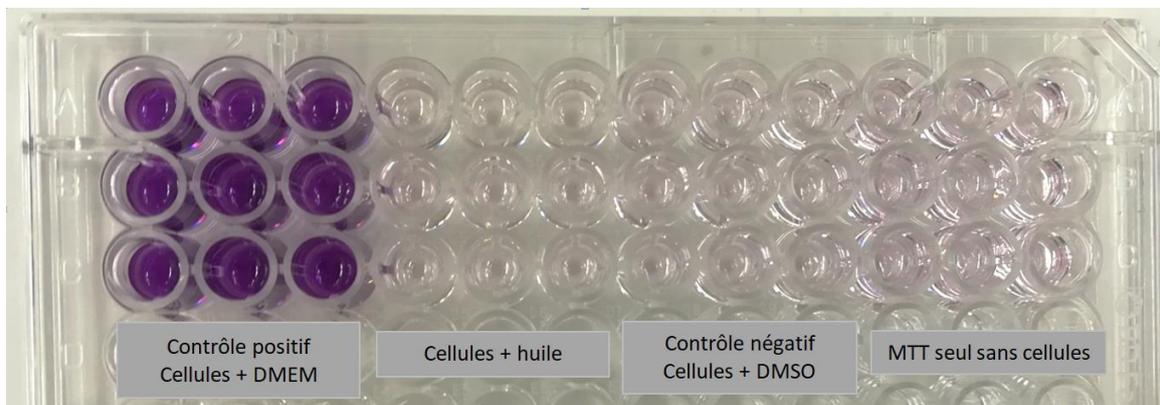


Figure 62 : Résultats MTT avec l'huile d'ensimage seule

Deux protocoles de désensimage ont été testés. En effet, jusqu'à présent au laboratoire LBPS et pour tous les résultats présentés dans cette thèse, les fils de PCL ont été désensimés par un procédé utilisant les bains à ultrasons (US) et l'hexane (cf. matériel et méthode de la partie 2). Cependant, ce protocole même s'il est efficace n'est pas adapté à une application à l'échelle industrielle. Afin d'anticiper cette étape de « scale-up », un procédé de désensimage des fils de PCL par un dispositif de « Soxhlet » utilisant l'éther comme solvant a été mis en place au sein du laboratoire CSPBAT-LBPS

(cf. thèse de T. Nguyen). Les deux procédés de désensimage ont été testés et leur efficacité étudiée en utilisant le test de cytotoxicité déjà décrit sur les fils désensimés par US/hexane et par Soxhlet/éther – la toxicité pouvant être liée à des résidus de molécule d’ensimage ou de solvant (hexane ou éther).

Les cellules primaires de brebis ont été mises en contact direct avec les matériaux (fils de PCL désensimés ou non) pendant 24h. Les résultats obtenus exprimés en pourcentage de taux de survie des cellules sont présentés en Figure 63. Bien que l’huile d’ensimage seule ait présenté un caractère très fortement cytotoxique en solution et à forte concentration, les faisceaux de PCL non désensimés - toujours recouverts de l’huile d’ensimage - n’ont pas engendré de cytotoxicité après 24h. De plus, il a été observé que le procédé de désensimage utilisé n’influçait pas vraiment le taux de survie des cellules, même si le procédé à l’éther a montré des résultats plus homogènes (taux de survie de 93 ± 40 % pour l’hexane et de 98 ± 9 % pour l’éther). **Ces résultats permettent de valider les deux procédés d’élimination de l’huile d’ensimage en termes d’absence de cytotoxicité cellulaire.**

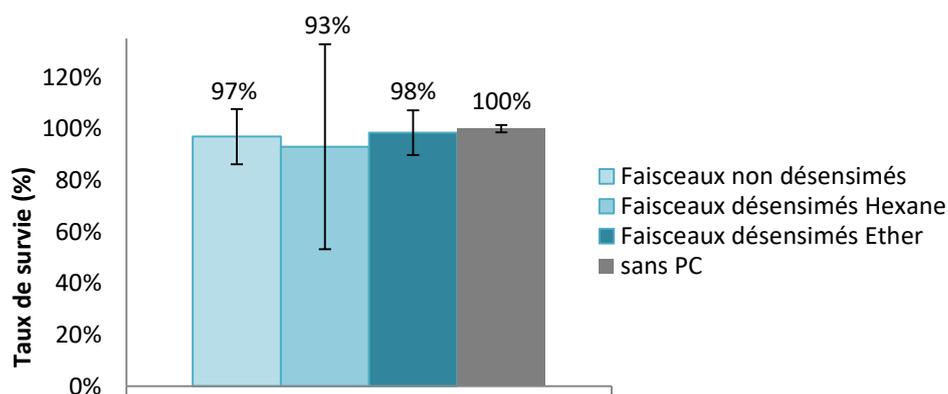


Figure 63 : Taux de survie des cellules primaires de brebis en contact direct avec les faisceaux de PCL

Comme mentionné précédemment, la norme ISO 10993-5 applicable aux dispositifs médicaux implantables tels que la prothèse ligamentaire en PCL, préconise un essai de cytotoxicité réalisé sur extrait du matériau. Des essais de cytotoxicité par « contact indirect » ont donc été effectués. Pour cela, les faisceaux de PCL ont été placés pendant 24 ou 48h dans du milieu de culture à 37°C, après lesquels les milieux ont été récupérés et mis en contact avec les cellules primaires de brebis pendant 24h. Les résultats de viabilité obtenus par le test MTT sont présentés dans le Tableau 14. Les résultats montrent que quelles que soient les conditions testées, la viabilité cellulaire est excellente, avec des taux supérieurs de viabilité cellulaire autour de 100%. **L’absence de cytotoxicité observée avec ce test semble donc indiquer qu’il n’y a pas** sur des temps très courts de 24 ou 48h **de molécules d’ensimage ou de solvants « relargués » dans le milieu ou alors à des concentrations si faibles qu’elles n’engendrent pas d’effet cytotoxique .**

	24H		48h	
	%	SD %	%	SD %
sans PCL	100,00%	0,08%	100,00%	0,09%
Faisceaux non désensimés NG	100,01%	0,06%	99,99%	0,10%
Faisceaux désensimés hexane NG	100,07%	0,10%	100,13%	0,17%
Faisceaux désensimés éther NG	99,98%	0,06%	100,06%	0,05%
Faisceaux désensimés éther G	100,07%	0,08%	100,20%	0,18%

Tableau 14 : Pourcentages de cellules vivantes après test MTT - contact indirect

III.3.2. Prolifération

Des études cinétiques de prolifération cellulaire sur faisceaux de PCL ayant subi différents traitements ont été conduites afin d'évaluer l'influence du mode de greffage et du taux de greffage sur la réponse biologique.

A. Influence du mode de greffage

Dans un premier temps, nous avons évalué l'influence du mode de greffage radicalaire par voie « thermique » pour par voie « UV » sur la prolifération cellulaire. Ainsi, des faisceaux de PCL présentant des taux de greffage identiques ou proches greffés par voie thermique avec un $TG = 0,58 \pm 0,22 \mu\text{mol.g}^{-1}$ et par voie UV avec un $TG = 0,63 \pm 0,22 \mu\text{mol.g}^{-1}$ ont étéensemencés avec 5.10^4 cellules primaires de LCA de brebis et mis en culture. Après 1, 3 et 7 jours de culture les cellules adhérentes aux faisceaux de PCL ont été collectées et comptées. Les résultats obtenus exprimés en nombre de cellules ne révèlent **aucune différence significative du nombre de cellules adhérentes sur des faisceaux greffés par voie « thermique » ou greffés par « voie UV »** (cf. Fig.64). De plus, on observe dans les deux cas que les cellules prolifèrent mieux – en quantité plus importante – sur les faisceaux de PCL greffés de pNaSS que sur les faisceaux de PCL témoin non greffés.

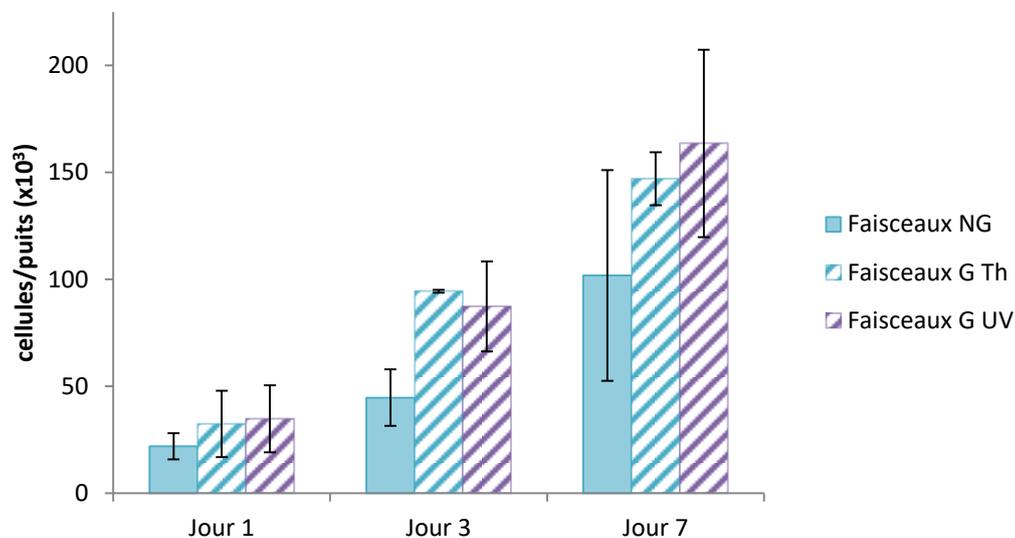


Figure 64 : Prolifération de fibroblastes primaires de brebis sur des faisceaux de PCL non greffés (NG), greffés de pNaSS par voie thermique (G Th) et greffés par voie UV (G UV)

Comme nous avons pu le voir dans la partie 1 de ce chapitre, le greffage de pNaSS est également possible sans activation de la surface par ozonation mais uniquement grâce aux rayons UV. Cependant, ce dernier mécanisme n'a pas encore été bien caractérisé et la liaison entre la surface de PCL et le pNaSS n'est pas obtenue grâce à des fonctions peroxydes et hydroperoxydes comme lors de l'activation de la surface. Ainsi, une étude de prolifération cellulaire a été effectuée afin d'observer des possibles différences de réponse cellulaire entre des faisceaux greffés par voie UV avec et sans l'étape d'ozonation. De nouveau, l'expérience a été réalisée pour un taux de greffage similaire, qui était de $0,40 \pm 0,10 \mu\text{mol.g}^{-1}$ en absence d'activation et de $0,43 \pm 0,08 \mu\text{mol.g}^{-1}$ avec activation. Les résultats obtenus révèlent qu'**aucune différence significative n'a été obtenue entre les faisceaux greffés par voie UV avec ou sans l'étape d'ozonation** (cf. Fig.65). Il est à noter que les résultats obtenus pour cette expérience avec les faisceaux greffés étaient significativement supérieurs à chaque jour d'observation par rapport aux contrôles des faisceaux non greffés. **Le greffage de pNaSS, même à faible taux, semble donc bien avoir un effet bioactif sur les cellules.**

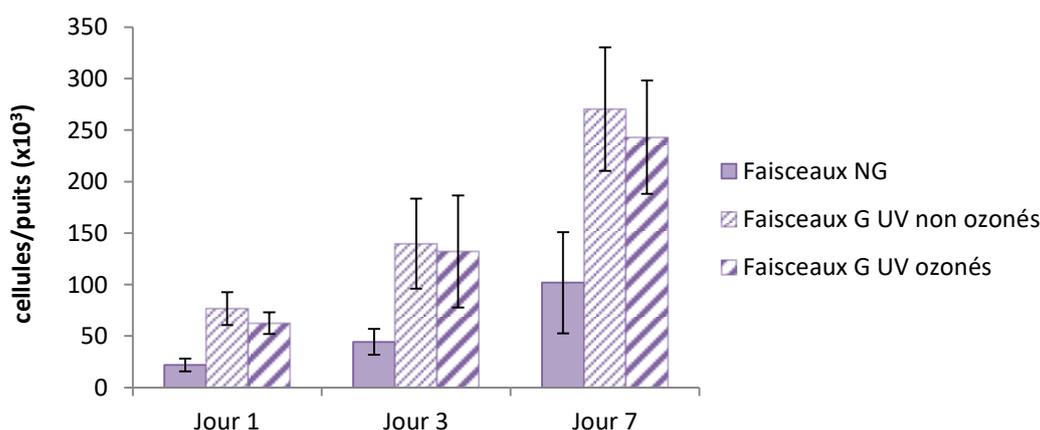


Figure 65 : Prolifération de fibroblastes primaires de brebis sur faisceaux de PCL non greffés (NG) et greffés de pNaSS par voie UV avec activation (G UV ozonés) et sans activation (G UV non ozonés)

B. Influence du taux de greffage

Les expériences réalisées ont permis d'observer que des taux de greffage de pNaSS à la surface des fibres de PCL même s'ils sont faibles permettaient une croissance cellulaire supérieure à celle observée sur des faisceaux non greffés et cela de manière très précoce. Nous avons donc réalisé une étude cinétique de la prolifération cellulaire sur des faisceaux de PCL présentant des taux de greffage de pNaSS croissants (Cf. Tableau 15) afin d'évaluer l'impact du taux de greffage sur celle-ci.

Faisceaux non greffés (NG)	0,28 (\pm 0,21) $\mu\text{mol/g}$
Faisceaux greffés faiblement (low)	0,43 (\pm 0,08) $\mu\text{mol/g}$
Faisceaux greffés moyennement (medium)	0,62 (\pm 0,18) $\mu\text{mol/g}$
Faisceaux greffés fortement (high)	1,59 (\pm 0,63) $\mu\text{mol/g}$

Tableau 15 : Taux de greffage de pNaSS (méthode colorimétrique) des faisceaux de PCL utilisés pour l'étude de prolifération

Les résultats de l'étude de prolifération révèlent de manière très claire, que **plus le taux de greffage de pNaSS est élevé sur les faisceaux de PCL, plus les cellules primaires d'ACL de brebis vont être actives et proliférer à la surface** (cf. Fig. 66). Il y a donc un effet « dose » de la bioactivité du pNaSS.

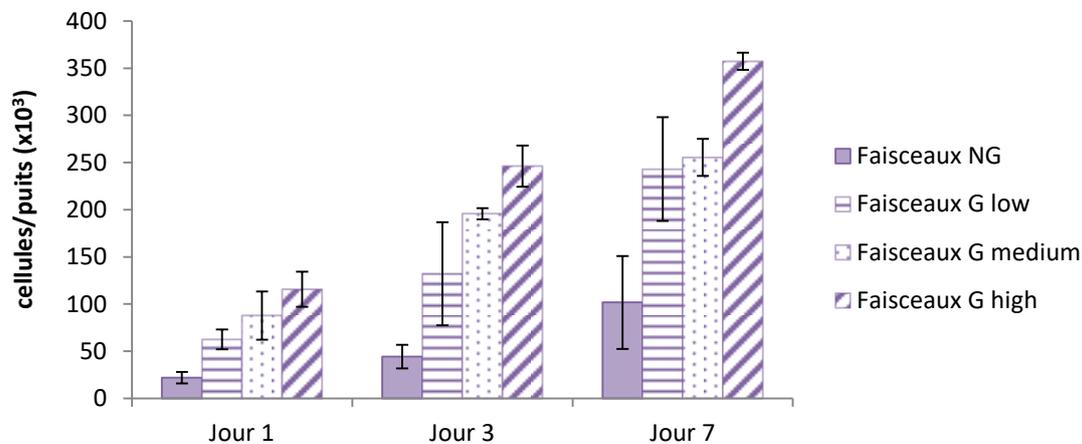


Figure 66 : Prolifération de fibroblastes primaires de brebis sur faisceaux de PCL non greffés (NG) et greffés de pNaSS par voie UV avec taux de greffage croissants

III.3.3. Morphologie

Les études de cytotoxicité et de prolifération sur les faisceaux de PCL ayant montré de très bons résultats en termes de réponse cellulaire, nous avons souhaité compléter cette étude par une observation de la morphologie des cellules primaires sur les faisceaux comme cela a été réalisé sur les films. Toutefois, l'observation de structures tridimensionnelles avec un microscope classique se révèle assez complexe, notamment pour réaliser une mise au point correcte sur l'ensemble de l'image.

Malgré cette difficulté, les résultats de l'étude de la morphologie cellulaire ont été publiés (cf. « Impact des traitements chimiques et physiques sur les propriétés mécaniques des faisceaux de fibres de poly(ϵ -caprolactone) pour la reconstruction du ligament croisé antérieur » publié dans la revue « Plos One » en octobre 2018 et présenté dans la partie 2 de chapitre). Les résultats montrent qu'après 3 jours de culture, la morphologie des cellules proliférant le long des fibres de PCL est clairement différente lorsque les fibres de PCL sont greffées de pNaSS. En effet, l'étalement cellulaire, représenté par la longueur moyenne des cellules sur les fibres, était de $49,5 \pm 17 \mu\text{m}$ pour les cellulesensemencées sur les échantillons de PCL non greffés, et de $76,5 \pm 27,7 \mu\text{m}$ pour les cellulesensemencées sur les échantillons de PCL greffés de pNaSS, soit une augmentation de 54% de l'étalement cellulaire grâce à la présence du polymère bioactif, le pNaSS.

Cette augmentation de l'étalement cellulaire sur les faisceaux de PCL greffés de pNaSS a également été observée après 7 jours de culture pour les différents modes de greffage et les différents taux de greffage (cf. Fig. 67). En effet, la PCL étant naturellement hydrophobe, on peut observer que les

cellules ensemencées sur les faisceaux non greffés présentent une forme très arrondie et sont très peu étalées. En revanche, en présence de pNaSS greffé sur la surface de la PCL, les cellules sont plus étalées et fusiformes, sans distinction de la voie de greffage du pNaSS utilisée – voie thermique ou voie UV – avec ou sans activation de la surface par ozonation - ni du taux de greffage de pNaSS.

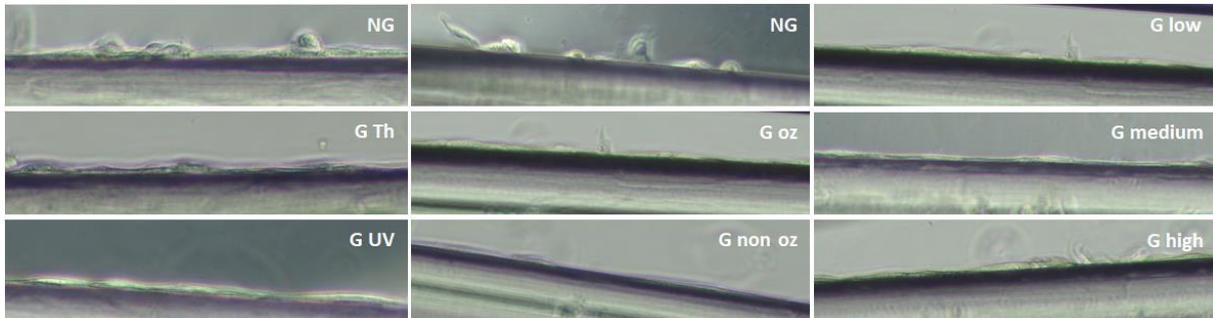


Figure 67 : Observation microscopique de cellules primaires de brebis après 7 jours de culture sur faisceaux de PCL

Pour une meilleure observation microscopique, nous avons coloré les cellules de LCA de brebis cultivées 7 jours sur des faisceaux de PCL à l'aide de bleu de toluidine (cf. Fig.68). Cette expérience nous a permis d'observer que les faisceaux de PCL greffés de pNaSS étaient recouverts de manière homogène par les cellules, contrairement aux faisceaux non greffés. Le nombre de cellules adhérentes était également plus important sur les fibres greffées de pNaSS, comme cela a été observé lors des essais de prolifération. Enfin, une fibre greffée de pNaSS et ensemencée de cellules a été observée en microscopie confocale à épifluorescence. L'image obtenue présentée en figure.69 met en évidence le recouvrement homogène de la surface par les cellules, ainsi que l'absence de pénétration de ces cellules à l'intérieur de la fibre.

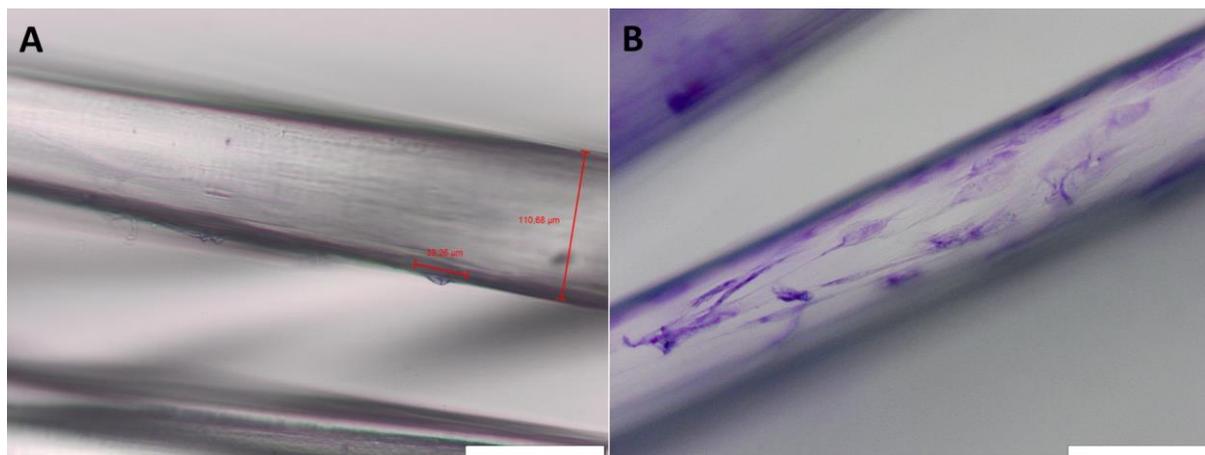


Figure 68 : Observation microscopique de fibroblastes primaires d'ACL de brebis après 7 jours de culture sur faisceaux de PCL non greffés (A) et greffés de pNaSS (G) après coloration au bleu de toluidine. Densité d'ensemencement : $5 \cdot 10^4$ cellules/puits. Barre d'échelle : 100 µm

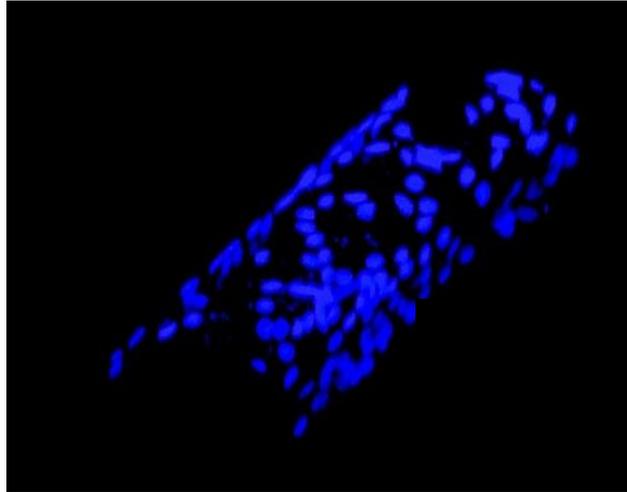


Figure 69 : Observation en microscopie confocale à épifluorescence d'une fibre de PCL ensemencée de cellules marquées au DAPI pour l'observation des noyaux cellulaires

En conclusion, les résultats présentés dans ce chapitre ont permis de démontrer :

- (i) que le greffage de pNaSS était possible sur faisceaux de PCL ;
- (ii) que le taux de greffage de pNaSS, mesuré par méthode colorimétrique, peut être augmenté par la voie UV ;
- (iii) que les propriétés physico-chimiques étudiées ne sont pas impactées par le mode de greffage choisi ;
- (iv) que les propriétés mécaniques des faisceaux sont cohérentes avec l'application prothèse ligamentaire;
- (v) que le greffage thermique peut influencer ces propriétés mécaniques, notamment en augmentant la déformation élastique de la PCL ;
- (vi) que le protocole de désensimage utilisé n'est pas cytotoxique ;
- (vii) que la réponse biologique de la PCL est fortement améliorée par le greffage du pNaSS, d'un point de vue étalement cellulaire, répartition des cellules le long des fibres et prolifération cellulaire, cela de manière indépendante du mode de greffage, avec cependant un effet dose réponse du greffage sur la réponse biologique.

Chapitre IV – Etude de la dégradation hydrolytique de la PCL

Les études chimiques, mécaniques et biologiques réalisées sur des films et des faisceaux de PCL et présentées dans les chapitres précédents ont permis de conforter les décisions prises jusqu'à présent pour le développement d'un implant ligamentaire bioactif et biodégradable. En effet, nous avons pu montrer que la PCL était un polymère de choix pour cette application et que le greffage de pNaSS améliore sensiblement la réponse biologique *in vitro*, sans que ce procédé n'influence fortement les propriétés physico-chimiques étudiées, tout en pouvant moduler les propriétés mécaniques des faisceaux. Ce chapitre dédié à l'étude des mécanismes de dégradation hydrolytique de la PCL s'articule autour de deux axes menés parallèlement : (i) une étude de dégradation dite « naturelle » dans laquelle les échantillons de PCL sont placés en milieu salin aqueux et soumis à deux températures différentes (25°C et 37°C) ; (ii) et une étude de dégradation dite « accélérée » en enceinte de vieillissement dans laquelle les échantillons sont placés en solution saline aqueuse à 37°C et soumis à une irradiation UV. L'objectif de ces études est d'évaluer d'une part la dégradation de la PCL en elle-même afin de confirmer que la cinétique de dégradation est cohérente avec le temps de reconstruction d'un néo-ligament (estimée entre 6 et 12 mois), mais surtout d'étudier l'évolution du greffage avec le temps ainsi que son influence sur le mécanisme de dégradation de la PCL.

IV-Partie 1 : Etude de la dégradation naturelle de films et de faisceaux de PCL

IV.1.1. Résumé

Les résultats de l'étude de la dégradation hydrolytique de films et de faisceaux de PCL en condition dite « naturelle » pendant une période de 2,5 ans sont présentés sous la forme d'un article intitulé « Étude à long terme de la dégradation hydrolytique de films et de fibres de polycaprolactone greffés de poly(styrène sulfonate de sodium) : étude des mécanismes » soumis à la revue « Advanced Materials » en janvier 2019.

Dans cette étude, la dégradation des films et des faisceaux de PCL, greffés de pNaSS ou non et soumis à une température de 25°C ou 37°C, dans une solution saline tamponnée et renouvelée tous les 3 mois, a été suivie pendant une période de 120 semaines. Les temps de dégradation étudiés sont les suivants : 0, 2, 4, 12, 24 semaines, puis toutes les 24 semaines (soit environ 6 mois) jusqu'à 120 semaines de dégradation (soit environ 2,5 ans). Des analyses permettant d'étudier l'évolution des propriétés générales de la PCL tout au long de la dégradation - telles que le pH de la solution en contact avec la PCL, le poids des échantillons, la masse molaire de la PCL, la cristallinité du polymère, la température de fusion, les propriétés mécaniques – et des analyses de surfaces – telles que la topographie, l'hydrophobicité, l'énergie de surface, le taux de greffage, la composition atomique – ont été réalisées. Enfin, une évaluation biologique de la cytotoxicité des produits de dégradation de

la PCL, ainsi que l'impact des surfaces dégradées sur la morphologie cellulaire et l'expression des gènes des collagènes a été conduite.

A. Analyses de la dégradation générale des surfaces de PCL

L'ensemble des analyses des propriétés physico-chimiques de la PCL greffée et non greffée de pNaSS ont montré que **le greffage de pNaSS accélérât la vitesse de dégradation** des échantillons de PCL, avec cependant un **maintien des propriétés physico-chimiques et mécaniques durant les 6 premiers mois de dégradation**.

En effet, l'étude cinétique de l'hydrolyse des chaînes macromoléculaires de PCL greffée et non greffée de pNaSS montre que la vitesse de la réaction est différente lorsque la surface est greffée de pNaSS. Jusqu'à 6 mois de dégradation, les valeurs de la masse molaire M_n des échantillons greffés de pNaSS dégradés à 37°C (PCL G D37) étaient inférieures mais proches de celles des autres échantillons non greffés dégradés à 25° ou 37°C (PCL NG D25 et PCL NG D37) et greffés dégradés à 25°C (PCL G D25) et les valeurs de l'indice de polydispersité indiquaient que les chaînes de PCL étaient lysées de manière homogène pendant cette période ($I_p \approx 1,3$). En revanche, après 6 mois de dégradation, la masse molaire M_n des échantillons PCL G D37 diminue drastiquement (perte de plus de 75% de la valeur de M_n après 2,5 ans) et l'indice de polydispersité augmente pour atteindre une valeur $I_p \approx 2,3$ après 2,5 ans. Ces résultats mettent en évidence une différence de mécanisme de dégradation entre les surfaces de PCL non greffées et greffées ; ces observations étant accentuées par l'augmentation de la température de dégradation de 25 à 37°C.

De plus, l'évolution du poids des échantillons était également différente entre les différentes conditions de dégradation et les différents échantillons :

- a) Les échantillons PCL G D37 n'ont pas donné lieu à une perte de masse durant les 6 premiers mois de dégradation, tandis qu'après le même temps, la perte de masse était déjà d'environ 25% pour les autres conditions et échantillons (PCL G D25, PCL NG 25 et PCL NG 37).
- b) Après 6 mois, la perte de masse des échantillons PCL G D37 était exponentielle et a atteint le même niveau de 25% de perte que les autres conditions.

En revanche, pour toutes les conditions de température et échantillons étudiés, que la PCL se trouve sous forme de films ou de faisceaux, il a été observé que la dégradation hydrolytique augmente la cristallinité du polymère, et par conséquent sa température de fusion. Les propriétés mécaniques des faisceaux de PCL n'ont quant à elles pas révélé de différences significatives entre surfaces greffées et non greffées. L'écart initial observé lorsque la PCL est fonctionnalisée par le pNaSS (cf. résultats présentés dans le chapitre III) avait disparu après 2 à 4 semaines de dégradation, puis les

caractéristiques mécaniques étudiées (E , ϵ et σ_{\max}) sont restées stables jusqu'à 24 semaines de dégradation avant d'être fortement modifiées par la dégradation: diminution du module d'Young E et de la contrainte à rupture σ_{\max} et augmentation de la déformation ϵ . Ces caractéristiques mécaniques sont toutefois toujours supérieures à celles du ligament natif de l'homme jusqu'à au moins 1 an pour la déformation et 2 ans pour le module d'Young et la contrainte à rupture. Enfin, le suivi du pH de la solution saline utilisée pour dégrader la PCL a confirmé, comme on pouvait s'y attendre, une absence d'acidification de la solution avec la dégradation des matériaux quelle que soit la température de dégradation et la nature de l'échantillon de PCL G ou NG.

B. Analyses de surface des échantillons de PCL dégradés

Les analyses de surface effectuées sur les échantillons de PCL dégradés ont confirmé la **différence de mécanisme de dégradation hydrolytique en présence de pNaSS greffé** et ont mis en évidence la **conservation du pNaSS sur les échantillons dégradés même à long terme**.

En effet, l'observation en microscopie électronique à balayage (MEB) des surfaces a montré que la dégradation des films de PCL non greffés conduisait à l'apparition de trous au niveau des zones amorphes alors que la dégradation des films greffés de pNaSS entraînait l'apparition de trous au niveau des zones amorphes et de fissures au niveau des zones cristallines. Il est important de noter que cette dégradation de la PCL initiée au niveau des zones amorphes est tout à fait cohérente avec l'augmentation de la cristallinité et de la température de fusion observées.

Par ailleurs l'analyse par microscopie AFM montre que la nano-topographie des films était différente lorsque le pNaSS est greffé en surface : en effet, le greffage du pNaSS entraîne un lissage des surfaces – ceci avait déjà été observé par Ciobanu et al. dans le cas du PET et par Felgueiras et al. dans le cas du titane. Cependant au cours de la dégradation, en l'absence de greffage, les films de PCL étaient ondulés – peu homogènes en rugosité de surface - puis se lissaient avec le temps ; tandis qu'en présence du pNaSS greffé, la nano-topographie n'était pas modifiée au cours du temps. Cette première observation va dans le sens d'une conservation du pNaSS en surface pendant toute la dégradation et d'une protection de la topographie de la surface par le greffage.

L'accentuation de la vitesse de dégradation de la PCL par le greffage de pNaSS peut s'expliquer par l'augmentation de l'énergie polaire et du caractère hydrophile de la surface (dû à la présence du pNaSS polymère anionique plus hydrophile que la PCL), ce dernier ayant augmenté de + 28,1% lorsque les films de PCL G sont dégradés à 37°C après 120 semaines. Ces augmentations étaient particulièrement importantes après 24 semaines de dégradation, cette durée semble être un point déterminant pour la dégradation à 37°C des échantillons greffés.

D'un point de vue mécanistique, l'hydrolyse des liaisons ester de la PCL, comme décrit dans la littérature, a été corrélée, quelles que soient les conditions, à une augmentation du pourcentage de liaisons atomiques C-O en surfaces de la PCL (analyses XPS), à une diminution du pourcentage de liaisons C=O et à un décalage du pic de la liaison C-O (analyses FTIR). Il est à noter que l'augmentation du pourcentage de liaisons C-O était progressive sur les surfaces greffées tandis qu'elle était brusque sur les surfaces non greffées.

Concernant le greffage de pNaSS, en analyse XPS, le pourcentage atomique de soufre était fortement diminué avec le temps de dégradation mais il était toujours présent après 2 ans de dégradation. Les analyses FTIR, quant à elles, qui reflètent des profondeurs d'analyse plus importantes que l'XPS, confirmait la présence de groupement sulfonates sur les échantillons greffés dégradés à long terme.

Les résultats obtenus sont donc pertinents et cohérents avec le mécanisme de dégradation de la PCL, qui consiste en une coupure des liaisons ester, qui est accélérée par l'augmentation de la température de dégradation et par la présence du pNaSS greffé en surface.

C. Impact biologique

L'analyse de la cytotoxicité des produits de dégradation de la PCL obtenus par dégradation accélérée en pH acide a révélé une absence d'impact cellulaire *in vitro* pour les échantillons de PCL non greffés et greffés de pNaSS.

L'étude morphologique a ensuite montré que les cellules primaires de brebis proliféraient sur des structures de PCL dégradée, et que **l'augmentation de l'étalement cellulaire et du développement du cytosquelette d'actine**, présentée dans les chapitres II et III, **était toujours présente malgré la dégradation des films de PCL** et ceci jusqu'à deux ans de dégradation. Ce résultat confirme ainsi le **fort effet du pNaSS et son maintien après une dégradation à long terme.**

Enfin, l'expression des gènes des collagènes de type I, II et III a montré que **les cellules primaires de brebis ne perdaient pas leur phénotype lorsqu'elles étaient en contact avec une surface dégradée**: elles maintenaient une expression génique élevée et stable des collagènes de types I et III sans différence entre les surfaces non greffées et greffées. En revanche, même si le gène du collagène de type II, correspondant à la lignée du cartilage, n'était presque pas exprimé dans les cellules de ligament primaire, les surfaces non greffées avaient tendance à maintenir le niveau de son expression alors que ce n'était pas le cas avec les surfaces greffées. **Le greffage de pNaSS semble donc limiter la dédifférenciation potentielle des cellules primaires tout en maintenant leur phénotype initial.**

En conclusion, cette étude de dégradation hydrolytique à long terme a permis de **confirmer la description de la dégradation de la PCL par hydrolyse via un mode de dégradation dit « en masse »** (« bulk degradation »), associée à une cinétique de dégradation croissante pour les faibles masses molaires et les températures de dégradation plus élevées. **La présence du greffage de pNaSS en surface des échantillons de PCL a modifié ce mécanisme de dégradation en protégeant la surface durant les six premiers mois de dégradation** - en solution saline à 37°C et en condition statique - puis en amplifiant de manière exponentielle cette dégradation par la suite. D'après les modes de dégradation des polymères dégradables décrits par Woodruff et Hutmacher[100] et les résultats de cette étude, **les surfaces de PCL greffées de pNaSS se dégradent via une dégradation en masse avec une autocatalyse interne.**

IV.1.2. Article en cours de soumission dans la revue scientifique «Advanced Materials»

Long-term hydrolytic degradation study of polycaprolactone films and fibers
grafted with poly(sodium styrene sulfonate) : a mechanism study

Amélie Leroux¹, Tuan Nguyen¹, André Rangel¹, Isabelle Cacciapuoti², Delphine Duprez³,
David G. Castner⁴, Véronique Migonney^{1,*}

¹Laboratory of Biomaterials and Polymers of Specialty, UMR CNRS 7244, Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France

²Inovaron, Paris, France

³ Sorbonne Université, Institut Biologie Paris Seine, CNRS, UMR 7622, Laboratoire de Biologie du Développement, INSERM U1156, F75005 Paris, France

⁴National ESCA and Surface Analysis Center for Biomedical Problems (NESAC/Bio), Departments of Bioengineering and Chemical Engineering, University of Washington, Box 351653, Seattle, WA, USA

*Corresponding author

E-mail: veronique.migonney@univ-paris13.fr

Abstract

Polycaprolactone (PCL) is widely used in tissue engineering as a long-term biodegradable scaffold. Many studies evaluated the hydrolytic or enzymatic degradation of this polymer or its copolymer for a short- to middle-term time periods, sometimes under accelerated degradation conditions, or by mathematic models. In this article, the hydrolytic degradation of different PCL surfaces in simulated physiological conditions (i.e., in saline solution at 37°C) for 2.5 years is studied. Pure PCL alone and PCL grafted with a bioactive polymer, poly(sodium styrene sulfonate) (pNaSS), were investigated. Thanks to the use of a large range of techniques to characterize bulk and surface degradation, we observed that PCL surfaces are hydrolyzed by a bulk degradation mode with increasing degradation kinetics for lower molecular weights and higher degradation temperatures. The impact of the pNaSS grafting on the PCL degradation process was investigated. The pNaSS-PCL surface, in terms of its physico-chemical and mechanical properties, was found to be protective for approximately 6 months before starting an increased degradation process via an autocatalysis. pNaSS grafting acts like a core-shell structure that protected the underlying PCL. These degraded surfaces in contact with primary fibroblast cells exhibited a preservation of cell phenotype with an expression of type-I and type-III collagen genes.

Introduction

Polycaprolactone (PCL) and its copolymers are used in a large number of medical devices and in the challenging field of tissue engineering. The very slow degradation rate of PCL allows this type of structure to stay several months *in vivo* without significant degradation[108], [204]. Plus, these polymers have many advantages such as (i) flexible mechanical properties[205], [180], [206]; (ii) ease of processing and fabrication[207]–[209]; (iii) adjustable degradation kinetics according to crystallinity, molecular weight, structure geometry (porosity, thickness, etc.)[193], [210], [211]; or (iv) the possibility of being functionalized[212], [213]. Currently, there are two common approaches to modifying materials to improve their biocompatibility: surface coating or chemical modification/functionalization of the surface. Functionalization of the surface is generally done by the coupling of small molecules via covalent, ionic or hydrophobic interactions[214], [215]. On the other hand, surface coating can be done by depositing the molecule of interest via methods such as plasma spraying, thermal spraying or electrolytic deposition[216], [217]. These strategies are particularly interesting in the case of synthetic polymers like PCL, which is a hydrophobic material, to make the surface more biocompatible by modifying the cellular response in a favorable interaction reaction.

For several decades our laboratory has successfully developed functionalization methods of polymeric surfaces to introduce carboxylate and sulfonate groups for improving the bio-integration of prostheses[218]–[220]. Especially, the development of grafting poly(sodium styrene sulfonate) (pNaSS) on polyethylene terephthalate (PET) LARS™ ligaments lead to a new generation of biointegrable and bioactive synthetic ligaments[123]–[125]. The excellent *in vitro* and *in vivo* results in a large animal model (i.e., sheep) demonstrated that pNaSS grafting provided (i) an increase of the cell adhesion strength[124]; (ii) a better morphology of the cells that were more spread out and more homogeneously distributed[125], [126], [128] ; (iii) an increase of the type-I collagen production that was accompanied by tissue formation with a better organization[126], [129]; (iv) an improved osteointegration of the prosthesis with the generation of a good bone-implant interface[130]. Based on that, the idea to develop a next generation of synthetic ligament which could be biointegrable, bioactive and biodegradable emerged. Thus, the pNaSS grafting was extended to PCL surfaces – films, scaffold, and fibers so far - and bioactivity improvements of those modified materials were studied[221], [222], [147]. For the ligament reconstruction application, the impact of the grafting process on mechanical properties as well as the feasibility of a rat implantation model were also assessed[152], [223]. However, one essential question remains: how long does the pNaSS-PCL ligament stay in the body before degrading?

In general, the degradation of poly(α -hydroxy esters) is stimulated by the specific action of water and the phenomena of diffusion and reactions that occur within the material. Two distinct processes can occur: (i) a surface degradation where the diffusion of water in the polymer volume is extremely slow compared to the hydrolytic cleavage reaction; or (ii) a mass degradation where the water is able to penetrate through the entire polymer so that random hydrolytic chain splits take place uniformly throughout the matrix [100]. As a poly(α -hydroxy ester), the degradation of PCL is carried out by hydrolysis: the PCL chains are cleaved at the ester bonds, forming carboxyl terminal groups and thereby reducing the size of the molecular chains and yielding water-soluble degradation products such as 6-hydroxylcaproic acid[211], [100], [224], [106]. When the by-products diffuse into the medium, the degradation, and therefore the decrease of the molecular weight throughout the sample are homogeneous, creating a balance between diffusion and hydrolysis reactions[105]. In the case where the by-products do not diffuse into the medium and remain trapped in the mass of the polymer, the presence of the carboxylic acids will catalyze the hydrolysis. Under these conditions a concentration gradient would be present in the material, with the rate of degradation of the core of the structure occurring at an exponential rate due to internal autocatalysis[100].

Many research studies focus on the hydrolytic or enzymatic *in vitro* degradation of PCL copolymers, usually containing polylactic acid, for short- to middle-term applications that are often less than one

year[225]–[228]. Some other studies use accelerated degradation conditions such as extreme pH or UV irradiation[229], [230]. Predictable mathematic models have also been developed specifically for polyester degradation[231], [232]. Nevertheless, very few articles focused on the degradation of pure PCL in a long-term (i.e., >1 year) hydrolytic degradation in simulated physiological conditions (i.e., in saline solution at 37°C)[233]. Moreover, although the degradation of some coated-PCL surfaces can be found in the literature [234]–[237], few studies investigate the degradation of functionalized-PCL surfaces [238], [239]. Given that, this article has two main objectives: (i) investigate the long-term hydrolytic degradation study of two PCL structures - films with a spherulite structure and fibers bundles with a shish-kebab structure – at two degradation temperatures (25°C and 37°C) in saline solution; and (ii) evaluate the impact of functionalization by radical grafting on PCL degradation to investigate the mechanism of degradation for pNaSS-grafted PCL samples. Therefore, the work presented here is organized in three parts: (i) the study of bulk degradation, (ii) surface analysis of the degraded material and (iii) the biologic behavior of the resulting degraded structures. Regarding the long-term study of PCL, degradation results in agreement with the literature were expected and we hypothesized that the pNaSS-grafting will not change the PCL degradation.

Materials and methods

I. Sample preparation

1. PCL film spin-coating

PCL films were cast using a spin-coating method. Raw PCL pellets from Sigma-Aldrich (St Quentin Fallavier, France) (sku. 704105, i.e. PC60) were dissolved in a dichloromethane solution (30%, w/v) under stirring for several hours. When the viscous solution was homogenous, it was dropped onto a glass slide and then spun for 30 sec at 1,500 rpm using a SPIN150-v3 SPS. The cast films were then aged overnight at air pressure and room temperature to allow natural evaporation of the solvent. Using a punch, the cast films were cut in smaller films of 14-mm diameter and then placed at 4°C until further experiments.

2. PCL fiber bundles

20 PCL fibers (diameter $110 \pm 15\mu\text{m}$) from Luxilon Industries, Belgium, were placed in a handmade Teflon plate in which longitudinal and vertical grooves had been dug. The fibers were placed in the vertical grooves and a PCL solution (1.2 g of PC60 dissolved in 2 ml of dichloromethane) was cast in the longitudinal grooves. After overnight evaporation of the dichloromethane, glue dots joined the 20 fibers together forming PCL fiber bundles with a nominal length of 30 ± 1 mm.

3. Grafting of poly(sodium styrene sulfonate) (pNaSS) on PCL samples

Purification of the NaSS monomer

Sodium 4-vinylbenzenesulfonate salt (sku. 94904, Sigma-Aldrich) was purified by recrystallization in a mixed solution of ethanol-distilled water (90:10, v:v). Typically, 90 g NaSS were dissolved in 1,780 mL of the mixed solvent at 70°C overnight. The mixture was then filtrated and the filtrate placed at 4°C for 48 h. After final filtration, the filter cake (recrystallized NaSS) was collected, vacuum-dried for 6 h at 30°C, and kept at 4°C until further experiments.

Radical grafting

The PCL films and bundles were functionalized with pNaSS using a grafting "from" technique. 6 PCL samples were placed in 100 mL of distilled water and ozonated either for 20 min (films) or 10 min (bundles) at 30°C under stirring. Ozone was generated using an ozone generator BMT 802 N (ACW) with a gas pressure of 0.5 bars and an oxygen flow rate of 0.6 L.min⁻¹. Next, the ozonated PCL samples were transferred into a degassed aqueous NaSS solution (15%, w/v) under argon and maintained for 3 h at 45°C under stirring to allow for radical polymerization of the monomer. The grafted samples were extensively washed with distilled water for 48 h and then vacuum-dried.

II. Degradation study design

The degradation of PCL was assessed by immersion in a saline solution ($0.5 \pm 0.1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) at 25°C or 37°C for 2.5 years. The buffered saline solution was composed of 0.14 mol.L⁻¹ NaCl, 0.01 mol.L⁻¹ Na₂HPO₄, 0.002 mol.L⁻¹ KH₂PO₄ and 0.05% of NaN₃ to avoid contamination. This solution was renewed every three months and its pH was measured until the degradation time points were reached (original pH = 7.4). The degradation of grafted and non-grafted PCL samples was evaluated at 0, 2, 4, 12 and 24 weeks and every 24 weeks after that until 120 weeks (2.5 years).

1. Characterization of degradation evolution

pH measurements

At each time point and for each condition examined the solutions from three randomly assigned samples were kept apart and the others were pooled together. The pH of those four solutions was measured by a benchtop pH-meter (HI 2210, Hanna Instruments, France).

Weight loss

The mass variation of the samples can be used as a degradation indicator. Therefore, after a given time of immersion, the samples were washed twice in ultra-pure water for 10 min, dried under

vacuum and weighed. The mass of the films was then followed throughout degradation process, but the mass of fibers was too small to be followed.

Determination of molecular weights

The PCL number average molecular weight (M_n), weight average molecular weight (M_w), and polydispersity index (PDI) were determined by size exclusion chromatography (SEC) analysis using a Shimadzu Prominence instrument LC20AD pump equipped with a SIL-20A-CHT auto sampler and a Shimadzu RID-10A differential refractive index detector (Shimadzu Europa GmbH, Duisburg, Germany). The samples were dissolved in tetrahydrofuran (ROTISOLV CLHP, Roth Sochiel EURL, Lauterbourg, France) at 5 mg.mL⁻¹ and eluted through 2 columns (phenomenex phenogel, Torrance, USA). A conventional calibration curve was generated using a series of narrow polydispersity poly(methyl methacrylate) standards. Three samples were analyzed per condition.

Differential scanning calorimetry method

Differential scanning calorimetry (DSC) analyses were carried out with a DSC 8000 calorimeter (Perkin Elmer, Waltham, USA) under nitrogen atmosphere. The samples were scanned once from -75°C to 100°C at a heating rate of 10°C.min⁻¹. The glass transition temperature (T_g), melting temperature (T_m), and melting enthalpy (ΔH_m) of the PCL films were determined from the first scan. The glass transition temperature was assessed using the midpoint method (temperature at which the measured curve is equidistant between the upper and lower tangents). The melting temperature was taken at the maximum of the peak. The melting enthalpy was calculated as the melting peak area. The degree of crystallinity (X_c) was calculated according to **Equation 1**:

$$X_c = \Delta H_m / \Delta H_{m0} \times 100$$

Where ΔH_{m0} stands for the melting enthalpy of 100% crystalline PCL ($\Delta H_{m0} = 135.44 \text{ J.g}^{-1}$)[145].

Mechanical testing

Mechanical assays were performed in a Bose Electroforce 3220 equipment (TA instruments, USA). Only the PCL fibers bundles were examined. The effective length of samples was set at 10 mm and the strain rate used was 3.6 mm.min⁻¹. Stress strain curves until rupture were recorded and Young's Modulus E in MPa, elongation ϵ in % and the ultimate tensile stress (UTS) in MPa were determined.

SEM images

The micro-topography of PCL surface was carried out using a Hitachi TM3000 SEM operating at 15 kV. For PCL films, the two sides of the sample were observed. No specific sample preparation was done.

Atomic force microscope

The nano-topography of the PCL surface was studied by Atomic force microscopy (AFM) using a MultiMode 8 model (Bruker, Billerica, USA) and the NanoScope Analysis 1.8 software (Bruker). Each PCL sample was analyzed in air at room temperature using the ScanAsyst mode (tapping mode). The tip used was symmetric, 2.5 to 8 μm height with a spring constants of 0.4 N/m (70 Hz). The cantilever was made from silicon nitride and had a triangular geometry. The regions of interest for scanning were selected based on the view of the sample in the built-in optical microscope on the AFM instrument. Scanning size performed on PCL was 500x500 nm^2 .

Mean roughness was calculated by the **Equation 2**:

$$Ra = \frac{1}{lr} \int_0^{lr} |Z(x)| dx, \text{ where Ra is arithmetic average (nm).}$$

Contact angle measurements

Static solvent contact angles were measured using a DSA10 contact angle measuring system from KRUSS GmbH. A droplet of solvent was suspended from the tip of a microliter syringe supported above the sample stage. The image of the droplet was captured and the contact angle was measured using DSA drop shape analysis program from KRUSS-PT 100. The contact angle of dH_2O (2 μL) on the surface was recorded 8s after contact, 3 measurements were taken and averaged.

The surface energy (γ_s) was calculated based on Young's equation:

$$\gamma_s = \gamma_L \cos \theta + \gamma_{SL} \text{ (Equation 3)}$$

Where γ_L is the liquid surface free energy in $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$; θ is the contact angle in $^\circ$; γ_{SL} is the solid/liquid interfacial energy in $\text{mN}\cdot\text{m}^{-1}$.

The extended Fowker's method was used in these calculations:

$$\gamma_1 (1 + \cos\theta) = 2(\gamma_1^d \gamma_2^d)^{1/2} + 2 (\gamma_1^p \gamma_2^p)^{1/2} \text{ (Equation 4)}$$

Water (polar), ethylene glycol (polar) and methylene iodide (unpolar) were the liquids used.

X-Ray photoelectron spectrometry (XPS) analysis

All spectra were taken on a Surface Science Instruments S-probe spectrometer that has a monochromatized $\text{Al K}\alpha$ X-ray and a low energy electron flood gun for charge neutralization of non-conducting samples. The PCL film samples were fastened to the sample holder using double-sided tape and run as insulators. X-ray spot size for these acquisitions was approximately 800 μm . Pressure in the analytical chamber during spectral acquisition was less than 5×10^{-9} Torr. Pass energy for survey spectra (to calculate composition) was 150 eV and pass energy for high resolution scans was 50 eV. The take-off angle (angle between the sample normal and the input axis of the energy

analyzer) was approximately 0°. This take-off angle corresponds to a sampling depth of approximately 100 Å. The Service Physics Hawk Data Analysis Software was used to determine peak areas using a linear background, to calculate the elemental compositions from peak areas, and to peak fit the high resolution spectra. The binding energy scales of the high-resolution spectra were calibrated by assigning the lowest binding energy C1s high-resolution peak a binding energy of 285.0 eV. Three spots were analyzed on each sample for elemental composition calculations. Analysis included a survey spectrum, detailed spectra of the Na1s, N1s, S2p, and Si2p peaks, along with a high-resolution spectrum of the C1s peak from one spot of each sample. Due to the geometry of fibers, this analysis could not be performed on PCL bundles.

Colorimetric method

The evidence of the pNaSS grafting was tested using the toluidine blue colorimetric assay. The method described by Ciobanu *et al.* was adapted as follows: an aqueous solution of toluidine blue (Roth Sochiel EURL) was prepared at 5×10^{-4} M and drops of 1 M NaOH was slowly added to reach and maintain the pH solution value of 10.0 ± 0.1 . Samples were immersed in 5 mL of this solution at 30°C for 6 h and then washed three times in 5 mL of 10^{-3} M NaOH for 5 min. Each sample was placed in aqueous acetic acid solution (50%, v/v) - in 10 mL for films and in 2 mL for fibers - for 24 h at room temperature. The decomplexation solution was analyzed by UV/visible spectroscopy (Perkin Elmer lambda 25 spectrometer, Waltham, USA) at 633 nm. On the grafted surfaces, 1 mole of toluidine blue was assumed to complex 1 mole of sulfonate group from pNaSS. The grafting rate (GR) in mol.g^{-1} was then calculated according to **Equation 5**:

$$GR = \frac{OD \cdot V}{\epsilon \cdot l \cdot m}$$

Where, OD is the optical density, V is the aqueous acetic acid volume (L), ϵ is the extinction coefficient of toluidine blue solution ($\text{L.mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$), l is the length of the spectrophotometer tank (cm), and m is the mass of the PCL films (g). The extinction coefficient was calculated based on a dilution curve using the initial toluidine blue solution.

ATR-FTIR analyses

The Fourier-transformed infrared (FTIR) spectra, recorded in an attenuated total reflection (ATR), were obtained using a Perkin Elmer Spectrum Two spectrometer. The PCL films were uniformly pressed against a diamond crystal and for each surface, 128 scans were acquired from 4000 to 400 cm^{-1} at a resolution of 2 cm^{-1} .

2. Cell culture analyses

Preparation of the samples for cell culture

Prior to experiments, all PCL films were packaged and sterilized as follows: 3x washing (3 h in 0.15 M NaCl), 20 min in 70% ethanol, 10 min in ultra-pure water, and 15 min UV irradiation (both sides of the samples). All steps were performed under stirring. The PCL films were kept in sterile PBS solution at -20°C until further experiments. The samples were then slowly defrozed and placed overnight at 37°C under 5% CO₂ in cell culture medium (DMEM, Gibco) without supplementation followed by an overnight incubation at 37°C under 5% CO₂ in cell culture medium supplemented with 10% FBS.

Isolation and culture of primary sheep anterior cruciate ligament fibroblasts

Anterior cruciate ligaments (ACL) were isolated from one sheep (2-year old female Merino sheep free of degenerative joint disease, ~ 60 kg) in accordance with the German legislation on protection of animals and the NIH Guidelines for the Care and Use of Laboratory Animals [NIH Publication 85-23, Rev. 1985], and as approved by the local governmental animal care committee[146]. Tissues were cut into small pieces of 1-2 mm², washed three times in DPBS, and incubated in a 0.1% (w/v) collagenase (Sigma-Aldrich) for 6 h at 37°C under 5% CO₂. The mixture solution was centrifuged 3 min at 1,500 rpm. The supernatant was withdrawn and the clot resuspended in DMEM complemented with 10% bovine calf serum (BCS) (Sigma-Aldrich), 1% penicillin-streptomycin (Gibco), and 1% L-glutamine (Gibco). The primary sheep ACL (sACL) fibroblasts were maintained in T-75 flasks until confluence was reached. pNaSS-grafted and non-grafted PCL films were placed on the bottom of a 24-well plate using Teflon inserts. The cells were then seeded at a density of 5.10⁴ cells/well and cultured at 37°C under 5% CO₂ over the time of the experiment.

Cell viability

PCL films were chemically degraded for one month in 2 mL of HCl solution (1 mol.L⁻¹) at 40°C. The macroscopic degraded pieces of PCL were collected and analyzed by SEC; while, the solvent suspensions were equilibrated to pH 7 with NaOH (1 mol.L⁻¹). After sterilization under 0.22 µm filtration, the solutions containing the PCL degraded products were put in contact with sACL fibroblasts for 24 h in DMEM complemented with 10% serum (dilution factor 1/5).

The medium was removed and 500 µL of MTT solution (Sigma, Saint Louis, USA) at final concentration of 1 mg.mL⁻¹ diluted in fresh culture medium without phenol red was incubated for 4 h at 37°C. The supernatant was then discarded and 350 µL of DMSO was added to each well for 10 min at room temperature. Each well was thoroughly mixed and the absorbance was read at 570 nm. The

percentage of live cells in presence of PCL degraded products was calculated using a calibration curve between the number of cells and the corresponding absorbance.

Histological and fluorescence analyses

sACL fibroblasts were harvested, fixed for 30 min with 4% formaldehyde, and rinsed twice with PBS. For histological analyses (hematoxylin and eosin - H&E - staining), hematoxylin (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Germany) was first added to each well for 10 min. The wells were then washed once with distilled water and a solution of 1% HCl was briefly added. Prewarmed water (60°C) was added for 4 min, followed by addition of hematoxylin for 3 min, removal, and washing once with distilled water. Eosin (Carl Roth GmbH) was then incubated for 2 min and extensively washed with distilled water. Stained samples were kept at 4°C until observation under a light microscope (Olympus BX 45, Hamburg, Germany).

For fluorescence analyses, the cells were fixed and the samples washed once with PBS and once with 3% bovine serum albumin (BSA)/PBS (Acros Organics, Geel, Belgium). The cells were then permeabilized with 0.1% Triton-X 100 in PBS for 5 min at room temperature. After two washes in PBS, the samples were incubated in 3% BSA/PBS for 1 h at room temperature. The cells were then incubated with Fluorescein Phalloidin (FITC, Molecular probes, Eugene, USA) at 1:40 in 1% BSA/PBS for 1 h at room temperature in the dark. After two washes in PBS, 2% 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) dissolved in distilled water was added for 10 min at room temperature. The samples were stored in distilled water at 4°C until observation under a fluorescent microscope (Olympus CKX41).

Total RNA extraction and real-time q-PCR analyses

Sheep ACL cells were cultured for 7 days on grafted or non-grafted PCL films, which have been subjected to 24, 48, 84 and 96 weeks of degradation. For each condition, total RNA was isolated using the RNeasy mini kit according to the manufacturer's protocol (Qiagen, Hilden, Germany). For each experimental condition, 100 ng RNA was reverse-transcribed using the high capacity retrotranscription kit (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific). Quantitative PCR was performed using SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) using the following primers (Sigma, Aldrich, Merck), COL1A1 (type-I collagen alpha 1), COL2A1 (type-II collagen alpha 1), and COL3A1 (type-III collagen alpha 1), which are listed in Table 16. COL1A1 and COL3A1 identify ligament collagens, while COL2A1 identifies cartilage collagen. We used GAPDH as housekeeping gene for internal control. All primers were used at the 3 µM final concentration. The threshold cycle (Ct) value for each gene of interest was measured for each amplified sample by using the StepOne software (Applied Biosystems, Thermo Fisher Scientific) and was normalized to GAPDH expression. The relative mRNA levels were calculated using the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method described by Livak

and Schmittgen[240]. The ΔC_t values were obtained by calculating the differences: $C_t(\text{gene of interest}) - C_t(\text{housekeeping gene})$ in each sample. We obtained the $\Delta\Delta C_t$ values by calculating the differences between $\Delta C_t(\text{Experiment})$ and the average of $\Delta C_t(\text{control})$ values. For relative mRNA level analysis, the COL2A1 values of non-grafted and non-degraded PCL were used as control and normalized to 1.

Table 16 : primers used for q-PCR

COL1A1	Forward 5'-CGTGATCTGCGACGAACTTA-3' Reverse 5'-TCCAGGAAGTCCAGGTTGTC-3'
COL2A1	Forward 5'-CAACCAGGACCAAAGGGACA-3' Reverse 5'-GTCACCACGATCACCTCTGG-3'
COL3A1	Forward 5'-CCGTGCCAAATATGCGTCTG-3' Reverse 5'-GTGGGCAAACCTGCACAACAT-3'
GAPDH	Forward 5'-ACAGTCAAGGCAGAGAACGG-3' Reverse 5'-CCAGCATCACCCCACTTGAT-3'

Statistical analysis

All the bulk analyses were carried out on three independent samples, all the surface analyses were carried out on three different spots on one sample, all the biologic experiments were carried out using one to three samples per condition. Statistical analyses were performed using ANOVA with $p \leq 0.05$ considered statistically significant.

Results

1. Bulk analysis of degraded material

pH measurement

No significant change was found in the pH of the solution after 120-weeks of degradation ($p > 0.05$), the pH never deviated more than 3% from the original 7.4 pH value for the different conditions studied (see **Figure 70A** for films and **Figure A1** in appendix for fibers).

Weight loss

The weight loss percentage of PCL films as function of time displayed different behavior for the grafted films at 37°C compared with other conditions. Both the grafted and non-grafted samples at 25°C and non-grafted samples at 37°C had progressive weight loss over the first six months before reaching a plateau. The grafted samples at 37°C initially had little variation for the first six months ($p > 0.05$), but then had an almost linear weight loss progression until finally reaching a plateau at 72

weeks of degradation. In addition, the mean value of mass reduction for the grafted films at 37°C is almost 15% higher than the values observed for the other samples. The evolution of all samples is shown in the **figure 70B**.

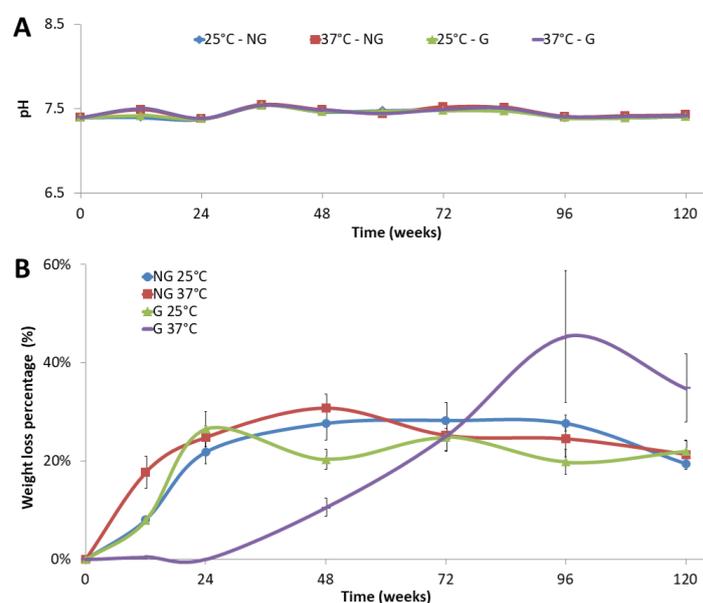


Figure 70 : (A) pH variation of the saline solution used for degradation of PCL films (B) Weight loss percentage for 120 weeks of degradation for grafted and non-grafted films kept at 25 °C and 37 °C.

Molecular weight

The monitoring of the molecular weights over time revealed different degradation processes, depending on the sample type and experimental conditions (cf. **Figure 71A**). For the non-grafted samples M_n decreased slowly over the first year (i.e., 48 weeks) and then reached a plateau. After 2.5 years of degradation (i.e., 120 weeks), the non-grafted PCL film molecular weight decreased by $11.4 \pm 2.6 \%$ ($p \leq 0.05$). The PDI of the non-grafted remained constant over the 2.5 year period with a value of 1.29 ± 0.02 (cf. **Figure 71B**). These trends in M_n and PDI were similar whether the degradation occurred at 25°C or 37°C, even if the loss in molecular weight was slightly increased at the higher temperature ($p \leq 0.05$). The non-grafted PCL films overall appeared to degrade slowly.

For the grafted samples, the degradation kinetics were significantly different ($p \leq 0.05$). First, the molecular weight loss depended on whether the films were degraded at 25°C or 37°C. At 25°C, the molecular weight loss of the grafted samples was $8.0 \pm 1.4\%$ ($p \leq 0.05$) after the first 6 months, which increased to $30.7 \pm 6.2 \%$ loss ($p \leq 0.05$) after 1 year and finally stabilized at $40.1 \pm 2.7\%$ loss ($p \leq 0.05$) after 1.5 years (cf. **Figure 71A**). The PDI followed this same evolution and reached a value of 1.49 ± 0.10 ($p \leq 0.05$) after 1.5 years of degradation (cf. **Figure 71B**). At 37°C, the degradation kinetics of the grafted sample were accelerated. After 6 months there was already a decrease of $27.7 \pm 0.2\%$ ($p \leq 0.05$) in molecular weight, which reached a plateau at 1 year of $76.5 \pm 6.3\%$ molecular weight loss ($p \leq 0.05$) (cf. **Figure 71A**). The observation of the PDI for this sample was different from the

other conditions, for the first 6 months (i.e. 24 weeks) the PDI was stable at 1.35 ± 0.06 and then it increased to 2.30 ± 0.15 ($p \leq 0.05$) after 1 year of degradation (cf. **Figure 71B**).

The same observations, to a lesser extent, can be made for the PCL bundles degradation (cf. **Figure A2** in appendix). The initial molecular weight of the fibers was higher than the films (i.e., $74,317 \pm 412 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the fibers *versus* $60,438 \pm 203 \text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$ for the films), which slowed down the degradation process.

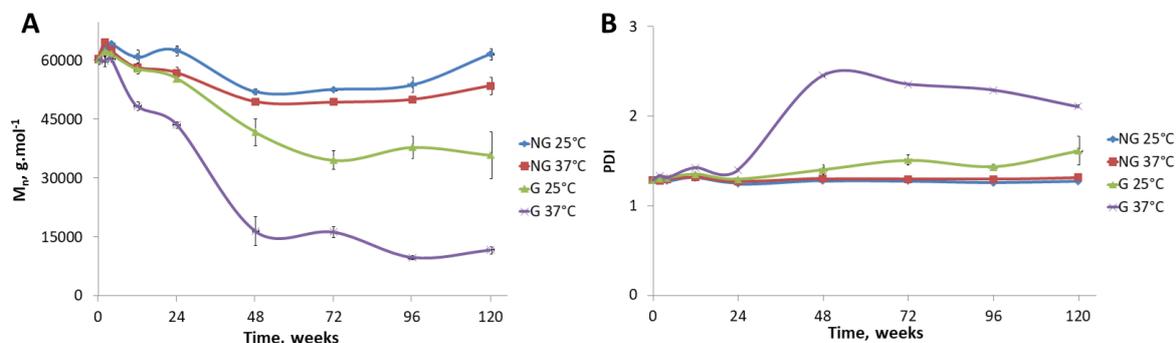


Figure 71 : SEC analysis results. (A) evolution of M_n over degradation time, (B) evolution of PDI over degradation time

DSC

For all conditions, the degradation of the films was linked to an increase of the crystallinity and of the melting temperature (T_f). These increases were different at 25°C compared to 37°C.

The crystallinity of the non-grafted samples degraded at 25°C for 120 weeks increased by 4.4% ($p > 0.05$), whereas the crystallinity of the grafted samples at 25°C for 120 weeks increased by 12.8% ($p > 0.05$). After 120 weeks at 37°C there was no difference between grafted and non-grafted samples, which had crystallinity increases of 16.1% ($p \leq 0.05$) (see **Figure 72A**).

The degradation temperature significantly influenced the T_f with an increase of 6% ($p \leq 0.005$) when films were degraded at 25°C (from $T_f = 60.52 \pm 0.58^\circ\text{C}$ to $T_f = 64.41 \pm 0.02^\circ\text{C}$) compared to an increase of 8.8% ($p \leq 0.005$) when degraded at 37°C (from $T_f = 60.52 \pm 0.58^\circ\text{C}$ to $T_f = 66.34 \pm 0.20^\circ\text{C}$) (see **Figure 72B**). Similar trends were observed for the DSC results from fibers (see **Figure A3** in appendix).

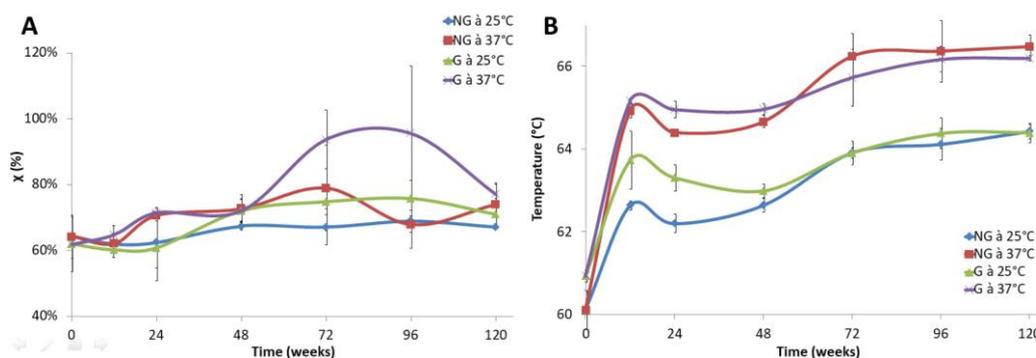


Figure 72 : Crystallinity (A) and melting temperature (B) of PCL films over degradation time

Mechanical

Tensile tests were carried out over 2.5 years of degradation on the PCL bundles to follow the evolution of crucial characteristics in the mechanical performance of the studied materials. After only 2 weeks of degradation, all samples exhibited a reduction of the Young Modulus values ($p > 0.05$), the reduction being more prominent for non-grafted samples, which reached the same mean value of the grafted samples after 4 weeks of degradation (i.e., $E \approx 1075$ MPa) (cf. **Figure 73A**). Those values remained stable for the next 20 weeks and then progressively decreased until 72 weeks of degradation. From 72 to 120 weeks the Young modulus is once again stable for both samples at 25°C and the non-grafted samples at 37°C. In contrast, the grafted sample at 37°C continued to decrease during this time period, reaching 1/3 of the original value after 120 weeks of degradation ($p \leq 0.05$) (i.e. $E \approx 370$ MPa).

Similarly, after the first two weeks of degradation the elastic deformation for grafted and non-grafted samples converge to similar values (i.e., $\epsilon \approx 14\%$, $p > 0.05$). These values remained relatively constant for the next 10 weeks and then experienced a substantial increase after 24 weeks of degradation ($p \leq 0.005$). After 24 weeks the elastic deformation of both samples degraded at 25°C remained fairly constant. In contrast the elastic deformation of both samples degraded at 37°C decreased. The elastic deformation decrease for the grafted sample began at 24 weeks while the elastic deformation decrease for the non-grafted sample didn't begin until 72 weeks (**figure 73B**).

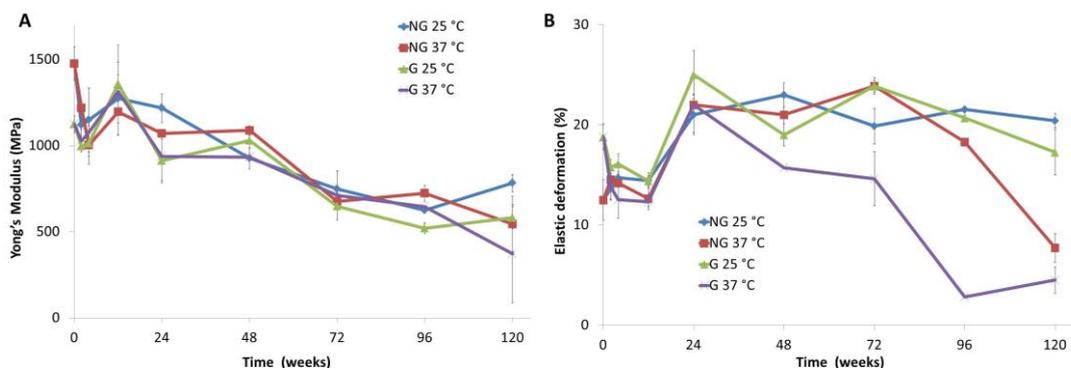


Figure 73 : (A) Evolution of Young Modulus for PCL bundles over degradation time; (B) Evolution of elastic deformation percentage for PCL bundles over degradation time.

The behavior of these two parameters can be associated with weakening of the material by the degradation process. The reduction of the ultimate stress also showed the grafted samples degraded more rapidly at 37°C ($p \leq 0.05$) (cf. **Figure 74A**). **Figure 74B** shows the stress-strain profiles for the grafted sample degraded at 37°C along with the evolution of ultimate stress for all samples as a function of degradation time.

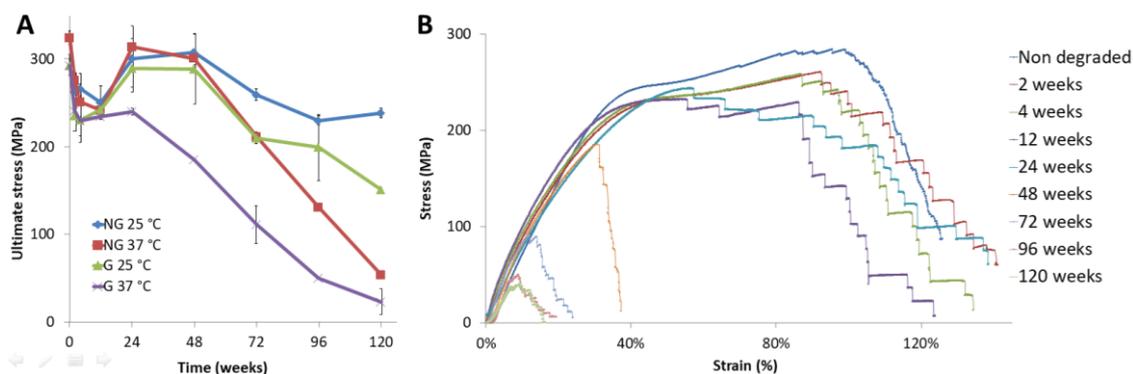


Figure 74 : (A) Evolution of the ultimate stress with degradation time; (B) Strain stress curves for grafted samples degraded at 37 °C

2. Surface analysis of degraded samples

Micro-topography

PCL spin-coated films presented a microstructure composed by amorphous and crystalline parts arranged in spherulites structures (see **Figure 75**). The pNaSS grafting did not change the size of the spherulites nor their proportion in the films, but some straight lines appeared. After 24-weeks of degradation, the non-grafted samples lost their amorphous part (see circles in Figure 6) while the grafted films started to present additional cracks in the crystalline part (see arrows in Figure 6). At 48- and 72-weeks of degradation, we observed a rearrangement of the structure with an increase in spherulite size. The grafted films presented some microscopic holes between spherulites and a lot of cracks localized in the germination points (see respectively stars and arrows in Figure 6). At 96-weeks, the spherulites returned to their initial size. The first layer of the grafted films started to disappear and films became very brittle. It was less obvious on the non-grafted samples where almost no cracks of the crystalline part appeared over degradation time. At 120-weeks of degradation, the films recovered a homogenous micro-topography which looks very crystalline with the grafted films still presenting a lot of cracks in this crystalline structure (see arrows in Figure 6). The same observations were made on non-grafted and grafted films when degraded at 25°C.

On PCL fibers bundles, due to spinning process, we assumed that the initial structure was organized in a shish-kebab pattern. The fibers micro-structure observed by SEM did not show any differences between non-grafted and grafted surfaces, or between 25°C- and 37°C- degradation. The only observation was that fibers looked “rougher” (casting ridges accentuated) with degradation time and 120-weeks of degradation at 37°C was required to start observing holes at the surface (see **Figure 4A** in appendix).

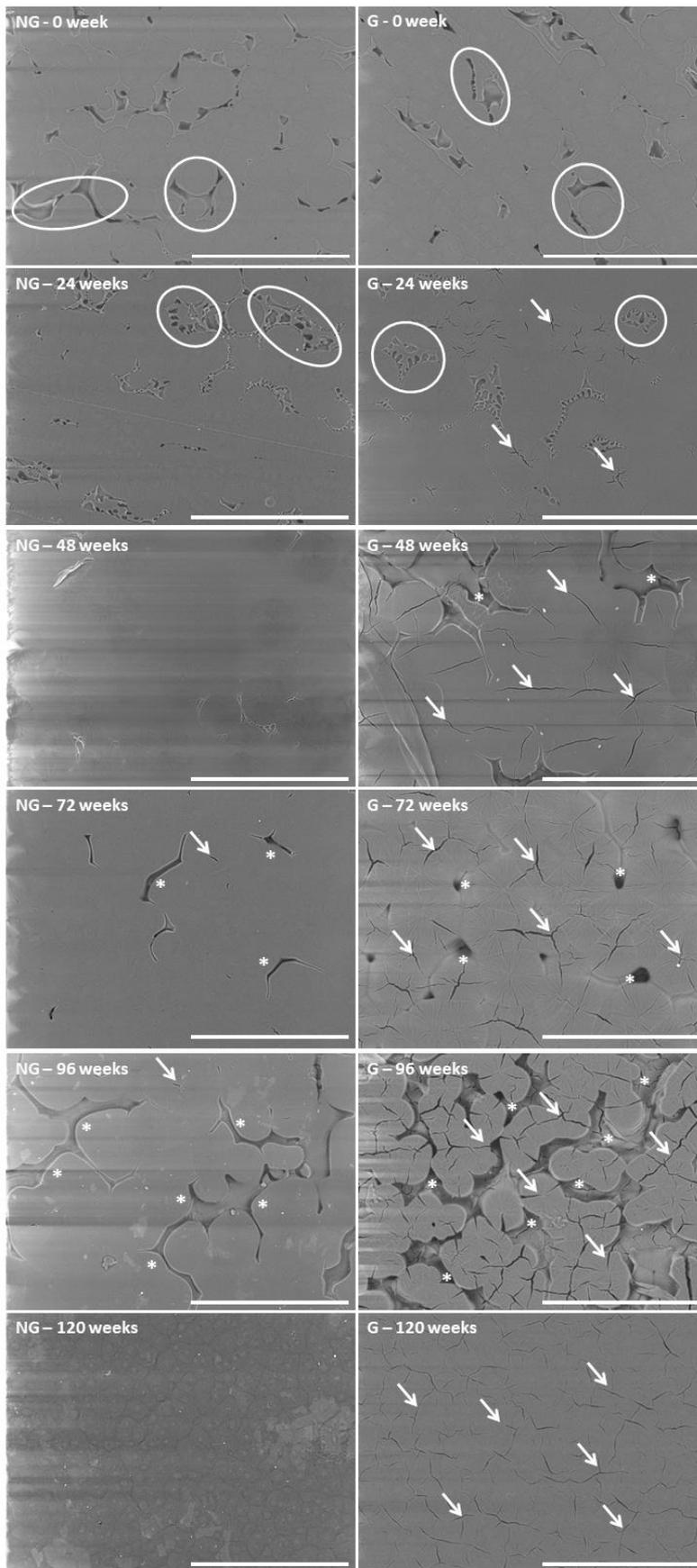


Figure 75 : SEM images of non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C for 0-, 24-, 48-, 72-, 96- and 120 weeks. Scale bar = 300 μ m. Legend: circle: amorphous part / arrow: cracks / star: hole

Nano-topography

AFM analysis demonstrated a difference in the surface topography between non-grafted and grafted surfaces. The increase of image mean roughness (Ra) going from 2.85 nm at 0 weeks of degradation to 14.3 nm at 120 weeks of degradation ($p \leq 0.05$) demonstrated that the non-grafted surface became rougher after long term degradation. The degradation, represented by a roughness increase, also occurred with grafted film but was significant only after at 120 weeks degradation (Ra = 8.4 nm, $p \leq 0.05$) (see **Figure 76**).

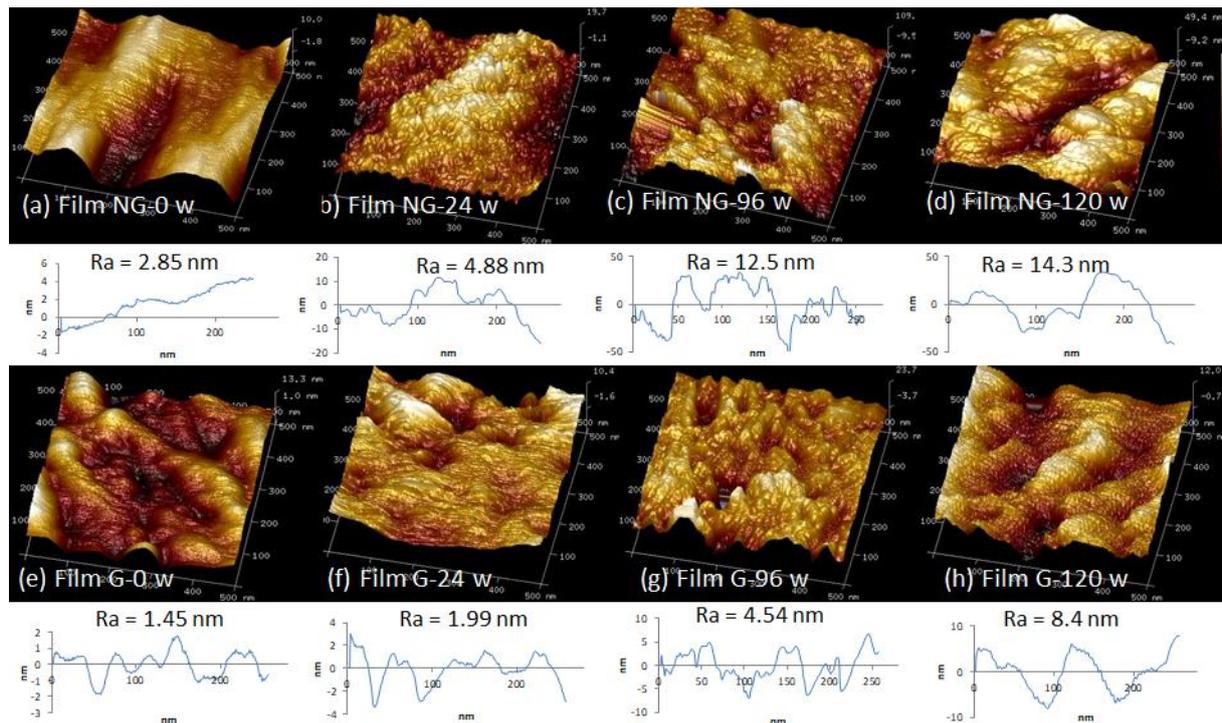


Figure 76 : Nano-topography of non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C for 24, 96 and 120 weeks (500x500 nm²).

The similar phenomenon happened with poly(caprolactone) fibers at the same conditions (see **Figure A5** in appendix).

Contact Angle measurement

The non-grafted samples degraded at 25°C and 37°C, as well as the grafted films degraded at 25°C, did not exhibit a significant change in their water contact angle measurements with degradation time ($p \leq 0.05$). In contrast, the grafted films degraded over 120 weeks at 37°C displayed a significant decrease in the water contact angle going from 66.6 ± 0.9 to 54.0 ± 4.3 (28.1% decrease, $p \leq 0.05$). This decrease is consistent with an increase of the surface hydrophilicity with degradation (**table 17**).

Table 17 : Water contact angle on PCL film degraded over time at 25°C and 37°C

Time (week)	Contact angle (°) water			
	Degradation at 25°C		Degradation at 37°C	
	Non grafted	Grafted	Non grafted	Grafted
0	77.0 ± 0.5	66.6 ± 0.9	77.0 ± 0.5	66.6 ± 0.9
12	77.4 ± 1.8	64.2 ± 5.1	68.3 ± 1.1	70.2 ± 3.6
24	67.7 ± 1.6	26.0 ± 4.9	67.2 ± 2.8	15.1 ± 2.1
48	76.5 ± 0.9	66.3 ± 6.9	72.3 ± 3.8	76.1 ± 2.6
72	71.3 ± 7.6	73.1 ± 4.8	82.1 ± 0.3	63.2 ± 0.6
96	71.4 ± 1.6	66.2 ± 0.2	75.4 ± 2.5	50.1 ± 3.1
120	72.8 ± 2.0	68.3 ± 2.3	73.0 ± 1.6	54.0 ± 4.3

The surface energy, calculated according to **Equation 3** (see in appendix Tables A1 and A2 for contact angle results with ethylene glycol and diiodomethane), was higher on the grafted than on the non-grafted films due to the presence of sulfonate groups on the surface of the grafted films (see **table 18**). The degradation of the PCL films did not significantly impact the surface energy ($p > 0.05$) and retained the initial difference observed between non-grafted and grafted samples.

Table 18 : Surface energy (total) of non-grafted and grafted films degraded at 25°C and 37°C

Time (week)	γ_s (mN.m ⁻¹)			
	Degradation at 25°C		Degradation at 37°C	
	Non grafted	Grafted	Non grafted	Grafted
0	40.6 ± 0.3	44.5 ± 0.5	40.6 ± 0.3	44.5 ± 0.5
12	44.8 ± 1.1	46.0 ± 1.6	45.9 ± 0.9	46.9 ± 0.3
24	45.3 ± 0.5	55.4 ± 1.3	44.0 ± 0.6	57.5 ± 0.6
48	43.4 ± 0.4	45.9 ± 0.9	42.2 ± 1.4	43.9 ± 0.5
72	43.2 ± 0.5	46.4 ± 1.9	43.0 ± 0.3	46.0 ± 1.4
96	43.5 ± 1.6	45.6 ± 0.6	42.8 ± 0.7	52.4 ± 1.1
120	36.2 ± 2.6	47.0 ± 3.2	42.6 ± 0.9	53.2 ± 2.5

Additionally, the polar energy of non-grafted films was not changed by the degradation process, but an increase of this energy to 8.8 ± 1.6 mN.m⁻¹ was observed for the grafted samples degraded at 37°C for 120-weeks (**table 19**).

Table 19 : Polar fraction of non-grafted and grafted films degraded at 25°C and 37°C

Time (week)	γ^p (mN.m ⁻¹)			
	Degradation at 25°C		Degradation at 37°C	
	Non grafted	Grafted	Non grafted	Grafted
0	2.4 ± 0.1	3.7 ± 0.2	2.4 ± 0.1	3.7 ± 0.2
12	1.6 ± 0.3	4.8 ± 0.5	4.1 ± 0.2	3.1 ± 0.3
24	5.1 ± 0.4	17.2 ± 1.2	3.6 ± 0.5	19.0 ± 0.5
48	2.1 ± 0.3	4.9 ± 0.6	2.8 ± 1.2	2.2 ± 0.4
72	2.7 ± 0.1	3.6 ± 1.3	1.0 ± 0.1	4.9 ± 0.5
96	3.5 ± 0.5	4.5 ± 0.2	3.3 ± 0.6	9.4 ± 0.9
120	2.8 ± 0.8	5.1 ± 1.1	3.7 ± 0.5	8.8 ± 1.6

Noteworthy, we noticed a significant drop of the contact angle along with a large increase of the polar energy for the grafted films degraded for 24 weeks in saline solution at both temperatures ($p \leq 0.05$). The 24-weeks degradation time point seems to be a key starting point for the degradation of grafted samples that is linked with the generation of polar groups. We assumed that the return of the original value of these two parameters after this time point was related to a rearrangement of the microstructure of the PCL films to hide those polar groups.

XPS analysis

The XPS analysis provided information about the degradation of the PCL films in the outer ~ 100 Å of the samples. For the non-grafted samples degraded at 37°C , no significant variation of the carbon species concentrations was observed in the first 72 weeks of degradation, but at 96 weeks of degradation (i.e., 2 years) an increase of 42% of the C-O bonds was observed (cf. **Figure 77A**). Interestingly, the XPS analysis on the grafted PCL films presented the same increase of 42% in C-O bonds after 96 weeks of degradation, but with a more continual increase with degradation time (11% and 17% after 24 and 72 weeks of degradation, respectively) (cf. **Figure 77B**).

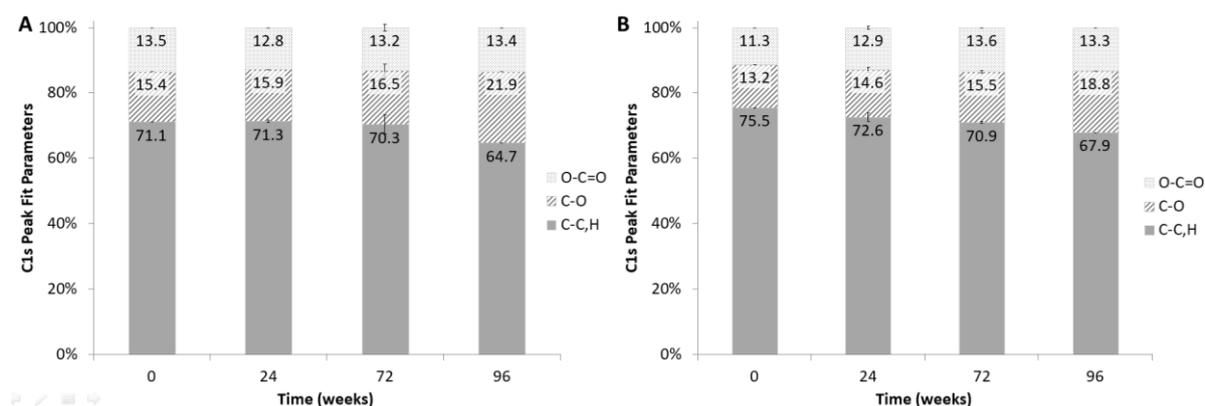


Figure 77 : C1s peak fit parameters - percentages of atomic bonds for (A) non-grafted PCL films degraded overtime at 37°C and (B) grafted PCL films degraded overtime at 37°C

The XPS determined atomic concentrations for all degraded PCL films were similar, but trace amounts of sulfur (~ 0.2 atomic percent) were detected on the grafted PCL films after degradation (see **Table 20**). The grafted samples prior to degradation exhibited a significantly different XPS elemental composition, due to the presence of the NaSS film (increased sulfur, increased oxygen and decreased carbon). The colorimetric method could not be used to measure the amount of grafted NaSS on the degraded samples due to a significant increase in the non-specific coloration of the degraded damaged surfaces ($p \leq 0.05$, see results on non-grafted samples in Table 20). XPS showed a decrease of the sulfur concentration (1.8 to 0.2 atomic percentage sulfur) upon degradation (see **Table 20**).

Table 20 : Grafting rates (GR) determined according to equation 5 (see materials and methods) and surface concentration (XPS atomic percent) for non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C for 0, 24, 72 or 96 weeks

	GR ($\mu\text{mol.g}^{-1}$)		Atomic concentration %					
	TB before	TB after	C 1s	O 1s	S 2p	Na 1s	N 1s	Si 2p
NG – 0 week	0.70 ± 0.27		72.1±0.9	22.7±0.9	-	-	-	3.4±0.1
NG – 24 weeks	1.05±0.45	0.99±0.35	76.3±0.4	21.9±0.4	-	0.2±0.1	-	1.7±0.2
NG – 72 weeks	0.47±0.40	2.13±0.70	76.8±0.9	20.2±0.9	0.1±0.0	0.3±0.1	1.5±0.6	1.1±0.3
NG – 96 weeks	0.30±0.12	7.26±0.96	73.1±0.8	22.7±0.7	0.1±0.1	0.6±0.1	2.3±0.2	1.2±0.1
G – 0 week	10.5±0.06		61.4±0.7	29.6±0.8	1.8±0.1	0.9±0.1	-	1.5±0.4
G – 24 weeks	8.51±0.81	41.30±5.46	74.5±0.0	22.5±0.4	0.3±0.0	0.6±0.0	-	2.2±0.4
G – 72 weeks	4.79±0.87	96.70±3.16	77.3±0.4	21.1±0.4	0.2±0.1	0.5±0.0	0.5±0.2	0.5±0.2
G – 96 weeks	3.31±1.34	156.00±9.57	75.5±0.9	22.9±0.9	0.2±0.0	0.7±0.1	0.4±0.2	0.3±0.1

Fourier Transforms Infrared Spectra

During the degradation process, the 1720 cm^{-1} ($\gamma(\text{C}=\text{O})$) and 1167 cm^{-1} peaks ($\nu_{\text{as}}(\text{C}-\text{O})$) decreased (under 0.6 % of transmittance – see the decrease of red intensity on colors maps) after 84 weeks for the non-grafted PCL film (see **Figure 78**). The increase of a number of C-OH and COOH groups caused the significant decrease of these peaks. That phenomenon is related to the increased percentage of -CO and O-C=O bonds in the XPS C1s spectra as the degradation proceeded.

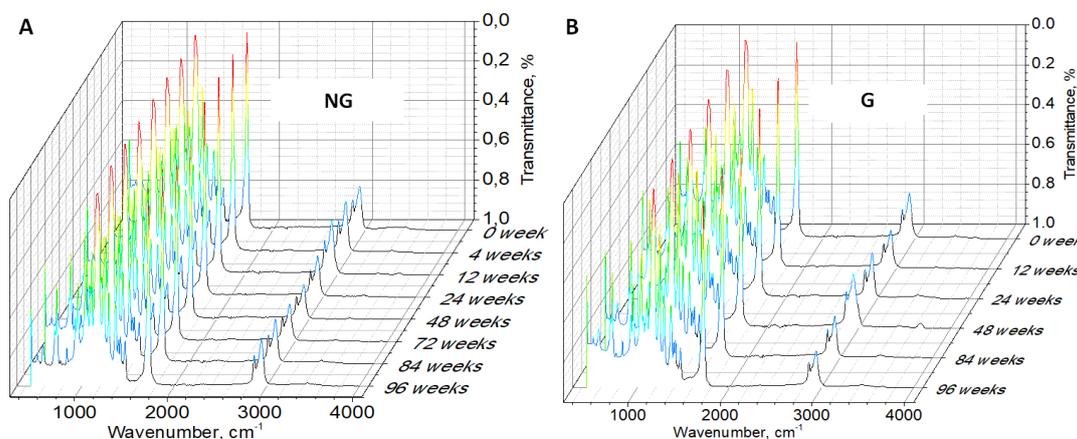


Figure 78 : Fourier Transforms Infrared Spectra of non-grafted (A) and grafted (B) PCL films degraded at 37°C over time.

The increase of alcohol and acid groups on polymer chain could be observed by a shift of the C-O peak position[241]. By breaking the C-O-C bond to form a C-OH bond, the C-O stretch changed, leading to the blue-shift of the C-O peak from 1160 to 1180 cm^{-1} (see Figure 79A). The decrease of transmittance and the blue-shift of C-O peak are important keys to predict the surface degradation. Following the sulfonate groups with degradation time, by monitoring the 1008 cm^{-1} peak, revealed the presence of sulfonate groups even after 96-weeks of degradation. However, this peak lost intensity as the degradation process proceeded, as observed in the XPS analysis (see Figure 79B).

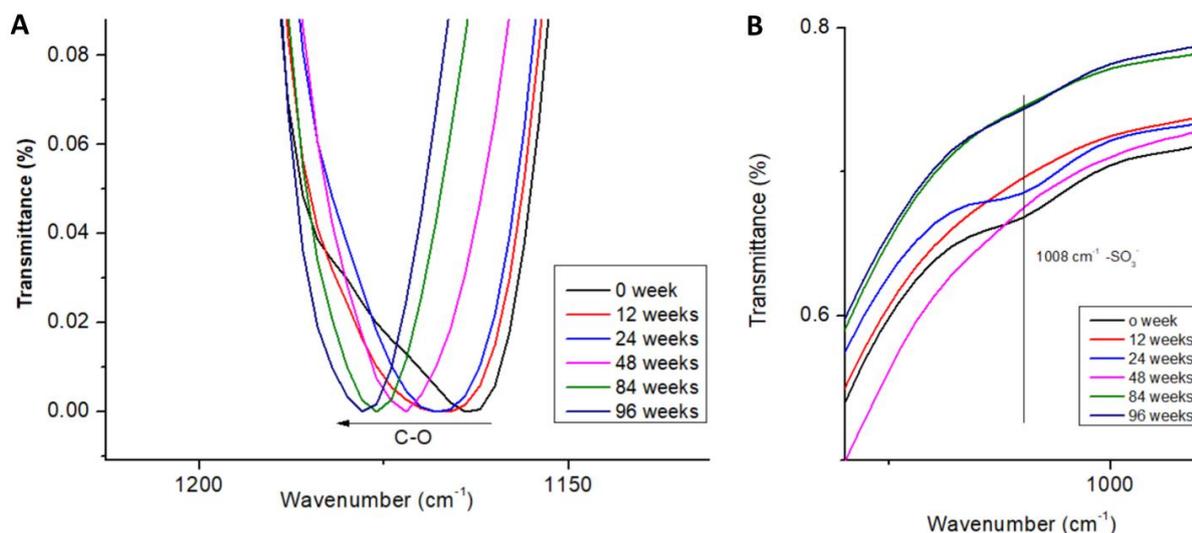


Figure 79 : (A) The C-O-C peak of FTIR spectrum showing the blue shift with degradation time for the grafted PCL samples degraded at 37°C and (B) evolution of $-\text{SO}_3^-$ groups on grafted-PCL films degraded at 37°C over time.

3. Impact on biologic behavior

Cell viability

A SEC analysis of the macroscopic pieces of PCL chemically degraded revealed a M_n of 11228 ± 2481 $\text{g}\cdot\text{mol}^{-1}$ independently of the grafting. This molecular weight was similar to that observed for grafted-PCL films naturally degraded for 2.5-years at 37°C. The solution from the chemical degradation was then put in contact to cells to study the cytotoxicity effect of the PCL degradation products. The percentage of live cells in the degradation solutions from the non-grafted films and grafted films was 100.01 ± 0.12 % and 100.26 ± 0.22 %, respectively ($p > 0.05$).

Cell morphology

The fluorescence observation cells showed that primary ACL cells were better spread on the grafted PCL films compared to the non-grafted PCL films (see **Figure 80**). Although the number of nuclei did not seem to differ between the two conditions, the actin cytoskeleton was more developed for the cells on the grafted samples. As the degradation of PCL proceeded at 37°C, the examination of the fluorescence images became more complicated due to nonspecific attachment of the fluorochromes, but it appeared the difference observed between the non-degraded non-grafted and grafted films was maintained during the degradation process. These observations were confirmed with the eosin/hematoxylin staining at selected time points. The same results were observed for the films degraded at 25°C.

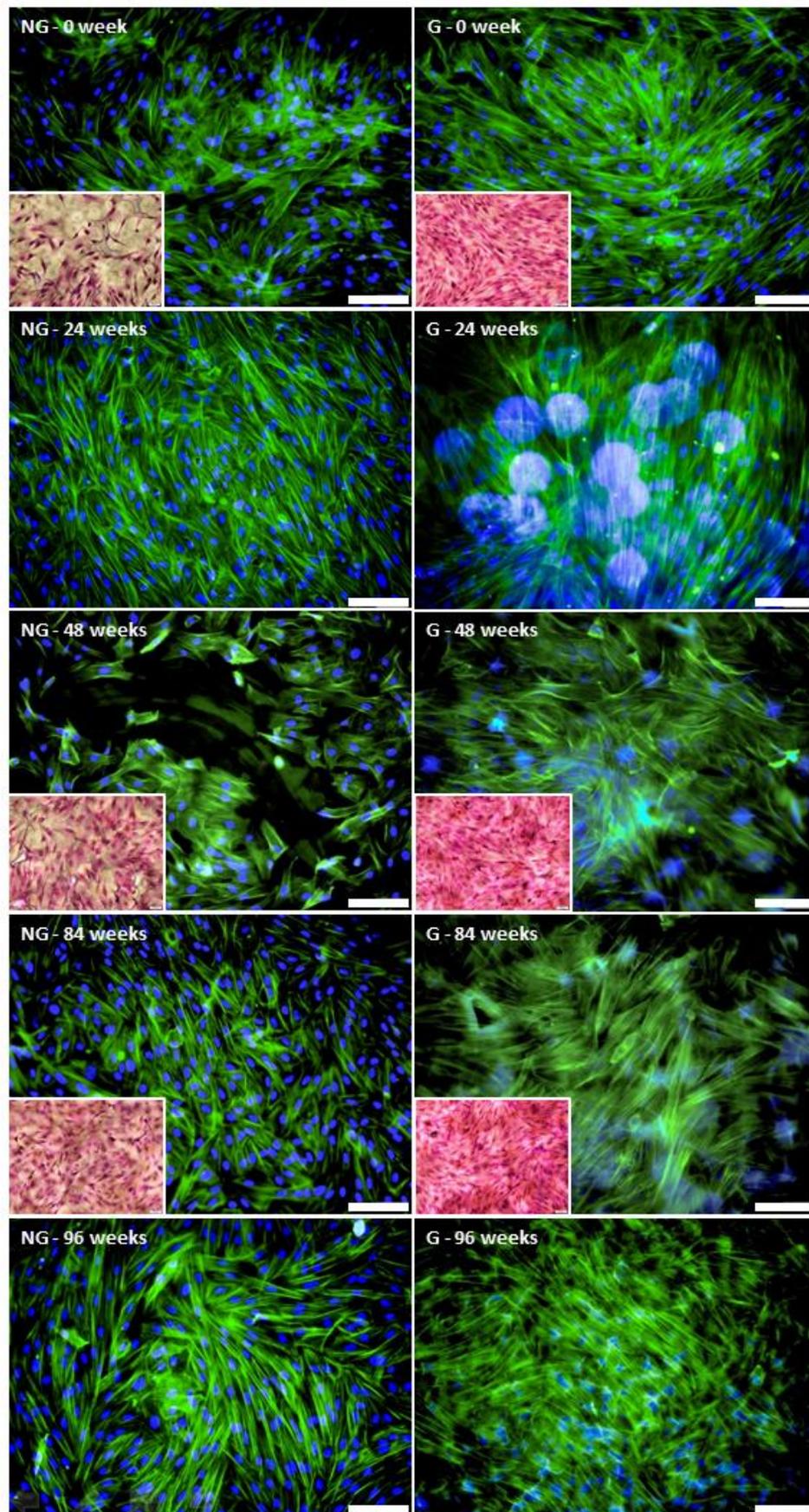


Figure 80 : Morphologies of sACL fibroblasts seeded for 7 days on non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C over the time period shown. Phalloidin (green)/DAPI (blue) labelling (scale bar = 100 µm) and H&E staining (insets).

Gene expression

The expression of collagen genes, associated with the fibroblast/ligament phenotype, COL1A1 and COL3A1, was not modified in sheep ACL cells cultured on grafted or non-grafted PCL films subjected to degradation over the 96 week time period (see **Figure 81**). The expression of COL2A1 gene, a specific marker of cartilage, was not detected in sheep ACL cells at any of the experimental conditions, indicating that ACL cells did not differentiate into cartilage when cultured on degraded PCL. This molecular analysis showed that the PCL degradation process did not affect the ligament phenotype of ACL cells.

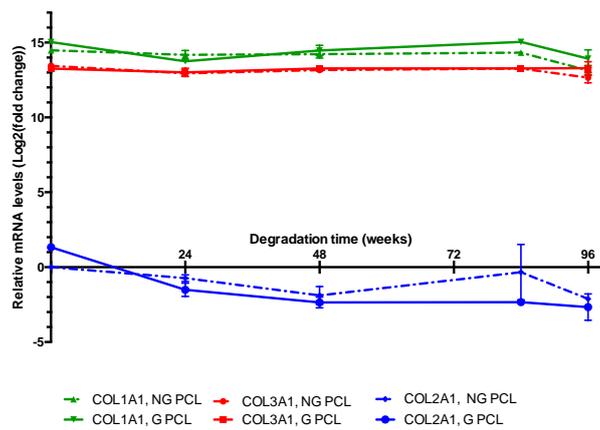


Figure 81 : RT-qPCR analysis of the expression levels of COL1A1, COL3A1 and COL2A1 genes in sheep ACL cells, cultured during 7 days, on non-grafted (NG) and grafted (G) PCL films degraded at 37°C for 24, 48, 84 and 96 weeks. Graphs show means +/- standard deviations of 1 to 3 samples of gene expression. The relative mRNA levels for each gene in the different experimental conditions were calculated as described in the Materials and methods. For all genes and experimental conditions, the COL2A1 values of NG PCL at T=0 were used as control and normalized to 1. Consequently, all the relative mRNA levels are comparable between them. Cts of COL2A1, COL3A1 and COL1A1 were around 33 cycles, 20 cycles and 19 cycles, respectively. COL2A1 was not expressed in the ACL cells, while COL3A1 and COL1A1 displayed high levels of expression in all the experimental conditions.

Discussion

Bulk analysis of material degradation

The natural degradation of PCL samples – films and fibers bundles – with or without a grafted bioactive polymer - was studied at two temperatures (i.e. 25°C and 37°C) for 120 weeks in a saline solution. As expected, no modification of the pH solution appeared, indicating that release of acid species from the PCL degradation could not be detected. However, during the first six months of degradation at 37°C, the pNaSS grafting was found to protect the PCL surfaces from significant mass loss, but by 1.5 years this sample have reached the same level of weight loss (~25%) as the other samples.

The hydrolysis degradation process of the PCL polymeric chains appeared to be different when the surface was grafted with pNaSS. In particular after six months the grafted samples exhibited accelerated molecular weight losses and increased PDIs. It should be noted that during the first 6 months, the SEC determined molecular weights for 37°C-degraded grafted samples were only slightly lower than the other samples and that the PDI results demonstrated that the PCL chains were cut homogeneously during this time. After 6-months of degradation, the SEC results showed a drastic drop of Mn and a significant increase of PDI. These effects were accentuated at the higher degradation temperature. In any conditions, the degradation increased the global crystallinity of the polymer, as determined by the increased melting temperature detected during the first scan of DSC for both films and fibers bundles. This increase in crystallinity was due to the preferential loss of the amorphous component in the films.

Mechanical properties under rupture load on non-grafted and grafted PCL bundles reached the same level after 2 to 4 weeks of natural degradation. The studied properties (E , ϵ and σ_{max}) remained relatively stable until 24 weeks of degradation and then became noticeably modified by the degradation process (decreased E and σ_{max} ; increased ϵ). In comparison to the native human ligament, after 96 weeks of natural static degradation the grafted fibers had higher rigidity (i.e., EPCL fibers, 96-weeks = 646 ± 31 MPa versus Enative ligament = 114 ± 53 MPa) and ultimate stress (i.e., σ_{max} (PCL fibers, 96-weeks) = 50.0 ± 21.3 MPa versus σ_{max} (native ligament) = 24.5 ± 11.2 MPa). After 48 weeks of natural static degradation the grafted fibers had higher elasticity (i.e. ϵ PCL fibers, 48-weeks = 15.7 ± 1.4 % versus ϵ native ligament = 12.0 ± 4.2 %) than the native human ligament.

These bulk properties analyses demonstrated that even if the grafting accelerated the degradation kinetics of the PCL samples, the physico-chemical and mechanical properties were stable for the 6 first months of natural degradation and showed a difference in the degradation mechanism when surfaces were grafted with pNaSS.

Surface analysis with degradation

The micro- and nano-topography observations were consistent with different modes of degradation between the grafted and non-grafted samples. The degraded non-grafted films exhibited holes in the amorphous regions, whereas the grafted films exhibited holes in the amorphous regions plus cracks in crystalline regions. Moreover, at the nanoscale, the roughness increase of PCL surfaces after 120 weeks of degradation was lower on the grafted PCL films compared to non-grafted PCL films. These observations suggest conservation of pNaSS grafting over degradation time.

The contact angle measurements showed an increase of 28% in the hydrophilicity of the grafted films degraded at 37°C for 120 weeks, which can explain why the pNaSS grafting accelerated the degradation process after 6 months. Furthermore, the polar energy also increased over time, consistent with the surface segregation of polar groups linked to the PCL degradation. These observations were specifically important at 24-weeks of degradation (i.e., 6 months).

Surface characterization demonstrated an increase of C-O species for all degradation conditions, consistent with the hydrolysis of the ester bonds of the PCL. These results were consistent with the degradation mechanism of the PCL described by Woodruff and Hutmacher[100]. Noteworthy, the molecular breakage was more gradual overtime on the pNaSS grafted surfaces compared to non-grafted. In the XPS sampling depth - around 100Å depth - a decrease sulfur concentration over degradation time was observed, but trace amounts of sulfur were still detected on all degraded, grafted films. The colorimetric method commonly used to quantify the amount of sulfonate groups present could not be used due to high levels on non-specific toluidine blue binding to the degraded polymer. The surface characterization at a deeper sampling depths by FTIR demonstrated a reduction of the C=O peak coupled with a blue shift of the C-O peak for all conditions over degradation time. These results were relevant for the PCL degradation process, which consists of the cutting of the ester bonds and was accelerated by the increase of degradation temperature as well as the pNaSS grafting. Finally, the FTIR analysis, which probes deeper into the sample than XPS, detected the presence of pNaSS after long-term degradation confirming the pNaSS grafting remains after long-term of natural degradation.

Biological impact of degraded material

The cytotoxicity experiments confirmed the absence of *in vitro* cytotoxicity from the PCL degradation products, as has been reported in the literature[107], but also demonstrated no cytotoxicity from the degradation products from the pNaSS grafted surface. The cell morphology study showed that cells still have the ability to grow on the degraded surfaces, which likely was amplified by the increased surface roughness produced by the degradation process[153], [242]. Moreover, it has been already

demonstrated that pNaSS grafting can modulate the fibroblast morphology, adhesion and activity[124], [130]. With the morphology images presented in this article, we observed that the improvement in cell spreading due to the pNaSS grafting still present for degradation times up almost 2 years. This result confirmed the effect of pNaSS and its presence over the long-term natural degradation as observed by AFM, XPS, FTIR and contact angles. Finally, the collagen gene expression revealed that primary ligament cells did not lose their phenotype when in contact with degraded surface: they maintained a high and stable type-I and –III collagens gene expression without significant differences between non-grafted and grafted surfaces. In contrast, the type-II collagen gene, corresponding to the cartilage lineage, did not appear to be expressed in primary ligament cells.

Conclusion

This study evaluated the long-term hydrolytic degradation of two different types of PCL (films and fibers) with different microstructures and molecular weights (i.e., films: $M_n = 60614 \pm 743 \text{ g.mol}^{-1}$ and spherulites structure *versus* fibers bundles: $M_n = 74674 \pm 2438 \text{ g.mol}^{-1}$ and shish kebab structure). The results obtained confirmed the literature reports that PCL hydrolyzes by a bulk degradation mode (see **Figure 82a**) with increasing degradation kinetics for lower molecular weights and higher degradation temperatures[211], [105], [192], [110].

The aim of this study was to evaluate the impact of the pNaSS grafting on the PCL degradation process. The results obtained revealed a difference in the degradation process. Based on the degradation modes of degradable polymers described by Woodruff and Hutmacher[100], the pNaSS-grafted PCL surfaces seems to degrade via a bulk degradation with autocatalysis (see **Figure 82b**). At 37°C in saline solution under static conditions the pNaSS grafting would act like a core-shell structure that protected the underlying PCL during the first 6 months before initiating an increased degradation rate.

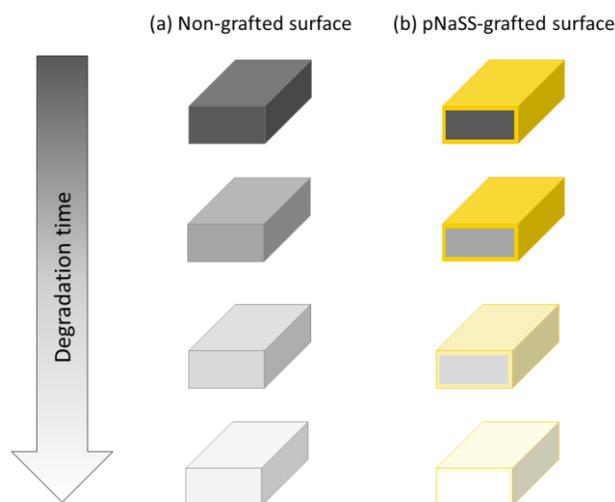


Figure 82 : Degradation mechanisms of PCL surfaces (a) non-grafted and (b) grafted with pNaSS

Acknowledgments

This work was funded as part of the "Future Investment Project" by the French Public Investment Bank and the French state - PSC application - Liga2bio project (VM). The XPS experiments done at NESAC/Bio were supported by NIH grant EB-002027. We would like to thank Gerry Hammer (NESAC/Bio) for his technical help with the XPS analysis and Laila Farias-Colaco for her technical help on mechanical testing.

Appendix

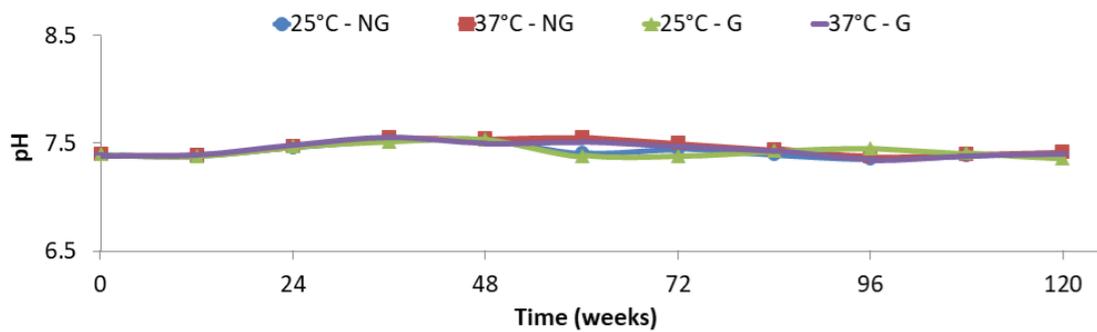


Figure A 1: pH variation of the saline solution used for degradation of the PCL fibers bundles

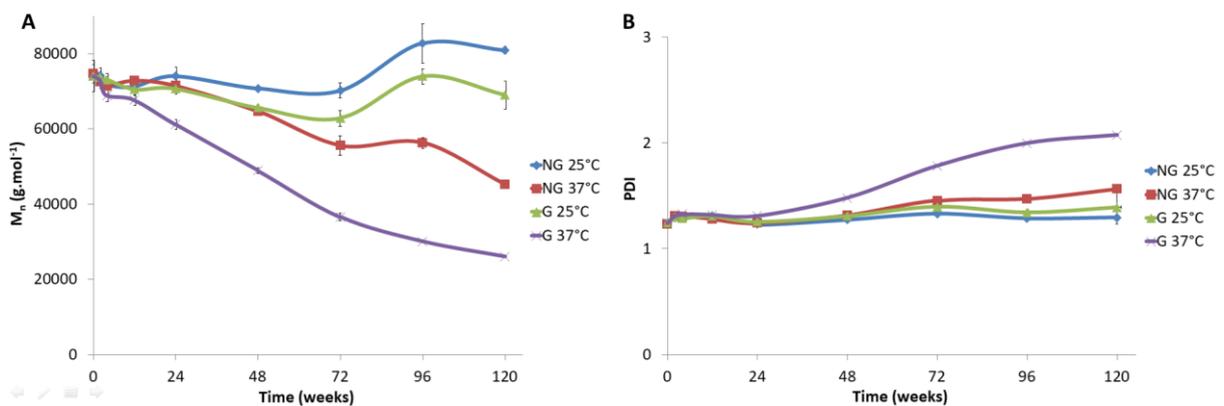


Figure A 2 : SEC analysis results. (A) evolution of M_n over degradation time, (B) evolution of PDI over degradation time

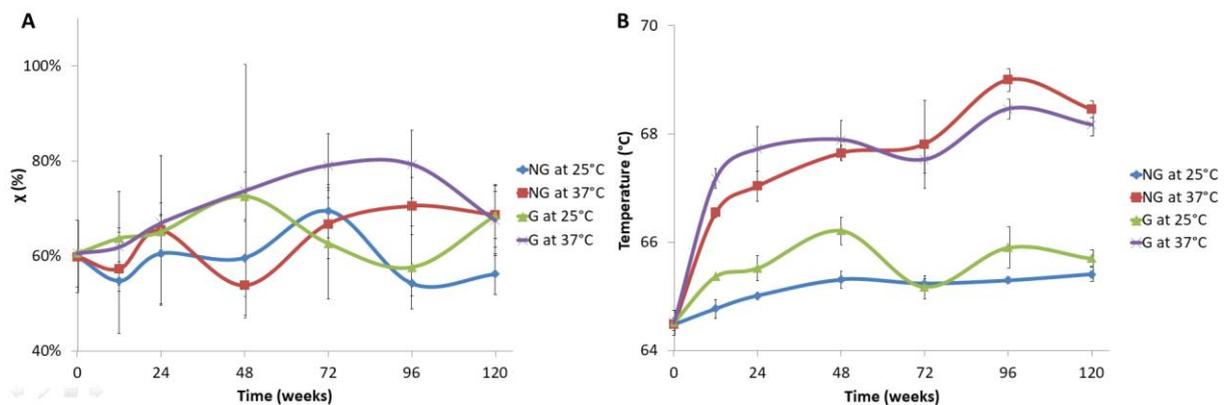


Figure A 3 : Crystallinity (A) and melting temperature (B) of PCL fibers bundles over degradation time

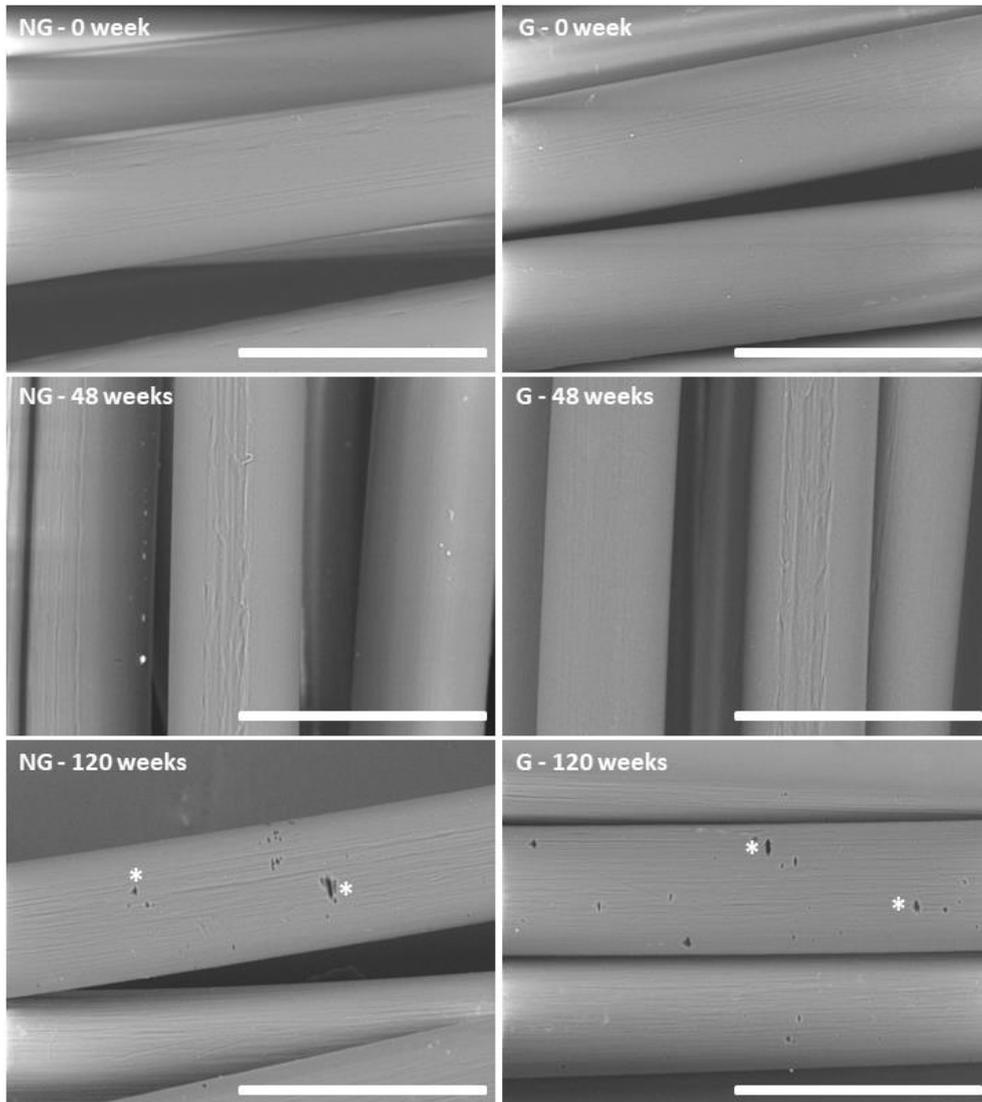


Figure A 4 : SEM images of non-grafted (NG) and grafted (G) PCL fibers bundles degraded at 37°C for 0-, 48- and 120 weeks. Scale bar = 200 μ m. Legend : star shows hole in the fiber

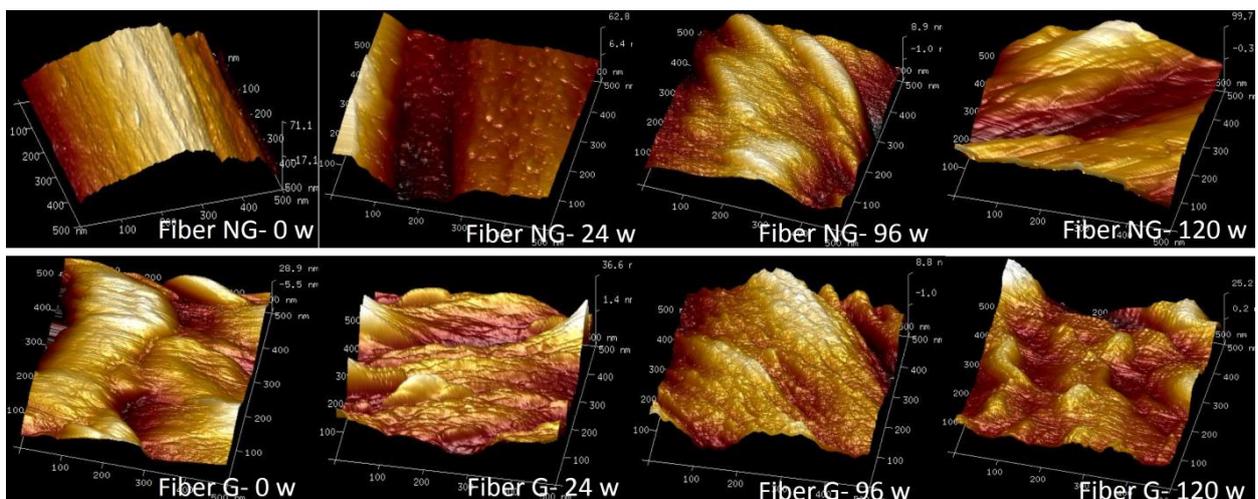


Figure A 5 : The surface of non-grafted and NaSS grafted poly (caprolactone) fibers degraded at 37°C for 0, 24, 96, and 120 weeks (500 nm \times 500 nm).

Table A 1 : Ethylene glycol contact angle on PCL film degraded over time at 25°C and 37°C.

Time (week)	Contact angle (°) Ethylene glycol			
	Degradation at 25°C		Degradation at 37°C	
	Non grafted	Grafted	Non grafted	Grafted
0	58.0 ± 0.2	66.6 ± 0.9	58.0 ± 0.2	66.6 ± 0.9
12	52.8 ± 1.9	48.5 ± 3.1	46.2 ± 0.2	46.35 ± 2.2
24	43.6 ± 2.3	35.1 ± 4.2	54.7 ± 3.1	33.2 ± 1.7
48	53.3 ± 4.6	45.1 ± 3.8	56.3 ± 0.3	51.4 ± 2.7
72	56.4 ± 1.2	40.9 ± 0.6	46.4 ± 1.5	49.2 ± 1.1
96	50.5 ± 1.7	48.5 ± 5.2	47.3 ± 3.7	34.2 ± 4.3
120	68.1 ± 3.8	38.4 ± 1.6	49.4 ± 2.8	27.2 ± 1.8

Table A 2 : Diiodomethane contact angle on PCL film degraded over time at 25°C and 37°C.

Time (week)	Contact angle (°) Diiodomethane			
	Degradation at 25°C		Degradation at 37°C	
	Non grafted	Grafted	Non grafted	Grafted
0	35.4 ± 0.1	21 ± 0.4	35.4 ± 0.1	21 ± 0.4
12	24.8 ± 2.5	27.0 ± 2.8	27.6 ± 2.3	22.5 ± 0.1
24	32.7 ± 0.2	28.7 ± 0.4	28.1 ± 0.3	26.4 ± 0.2
48	29.8 ± 0.2	29.6 ± 0.7	32.3 ± 0.5	29.4 ± 0.4
72	28.7 ± 1.2	28.8 ± 1.6	29.2 ± 0.6	26.5 ± 3.6
96	32.4 ± 2.8	28.4 ± 1.2	36.2 ± 0.2	20.2 ± 0.8
120	42.9 ± 3.6	30.0 ± 5.4	36.2 ± 1.0	19.1 ± 3.2

IV-Partie 2 : Etude de la dégradation accélérée en enceinte de vieillissement de faisceaux de PCL

L'étude de la dégradation naturelle de la PCL nous a permis d'évaluer l'effet du temps sur l'hydrolyse de la PCL. Cette étude très coûteuse en termes de nombre d'expériences et d'échantillons (2475 échantillons) a duré 2,5 ans mais ne nous a cependant pas conduit à une dégradation totale de la PCL, notamment en ce qui concerne les faisceaux de PCL qui ont une masse molaire plus importante que les films. Pour accélérer le processus de dégradation, nous avons effectué une étude de dégradation dite « accélérée » en utilisant une enceinte de vieillissement. Le dispositif utilisé, disponible au laboratoire "Matériaux et Santé", EA 401 (dirigée par le Pr N. Yagoubi) de l'Université Paris-Sud 11 à Châtenay-Malabry, était une enceinte à arc au Xénon Q-SUN Xe-1 (société Q-Lab) reproduisant le spectre complet de la lumière solaire (cf. Figure 83A). Des faisceaux de PCL non greffés et greffés de pNaSS ont ainsi été placés dans l'enceinte de vieillissement à 37°C et en solution saline aqueuse (cf. composition de la solution dans la partie « matériel et méthode » de l'article présenté en IV.1.2), pendant une durée de 100, 200, 300 et 400 heures sous une irradiance de 1,5 W/m² (cf. Figure 83B). D'après l'expérience des utilisateurs, 9h dans l'enceinte correspondrait à une exposition de 30 jours, ce qui nous a permis de simuler une exposition de 1, 2, 3 et 4 ans pour les échantillons de PCL. Pour chacun des temps étudiés, les mêmes analyses de caractérisation générale de la PCL que celles réalisées dans l'étude de dégradation naturelle ont été mises en place. En termes d'analyse de surface, seul le dosage colorimétrique au bleu de toluidine a été effectué.



Figure 83 : (A) Enceinte de vieillissement à arc au xénon Q-SUN Xe-1 ; (B) positionnement des échantillons à l'intérieur de l'enceinte

Les résultats obtenus dans cette étude ont révélé une absence d'acidification du pH de la solution tout au long de l'étude quel que soit le temps d'incubation dans l'enceinte de vieillissement : le pH restait constant à une valeur d'environ $7,52 \pm 0,05$ (cf. Figure 84A). Il est à noter que dans cette étude, le milieu de dégradation n'a pas été renouvelé comme cela était le cas dans l'étude de dégradation naturelle.

Le suivi du poids des échantillons en fonction du temps passé dans l'enceinte de dégradation a révélé des évolutions de la perte de masse différentes de celles observées dans des conditions de dégradation « naturelle » entre échantillons G et NG (cf. Figure 84B). En effet, de manière analogue aux résultats présentés précédemment, la perte de masse des faisceaux greffés de pNaSS a eu lieu moins rapidement et dans une moindre mesure que celle des faisceaux non greffés ($\Delta_{m,max} = 8,1 \pm 0,4\%$ après 400 heures). Un plateau d'environ 20% de la perte de masse des échantillons non greffés est progressivement atteint entre 100 et 200 heures de dégradation.

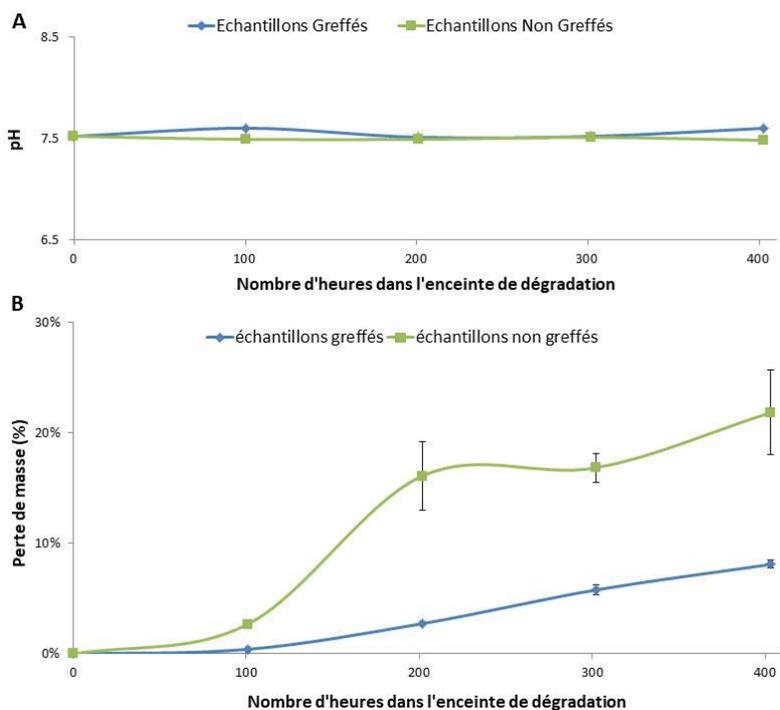


Figure 84 : (A) évolution du pH de la solution de dégradation au cours du temps ; (B) évolution du poids des faisceaux de PCL greffés et non greffés exprimé en pourcentage de perte par rapport au poids initial (n=3)

Toutefois, les analyses de mesure de masse molaire n'ont pas révélé de diminution significative du M_n , ni de modification de l'indice de polydispersité au cours de cette expérience (cf. Figure 85). Les faisceaux de fils de PCL ne semblent donc pas avoir été dégradés par leur séjour dans l'enceinte de vieillissement.

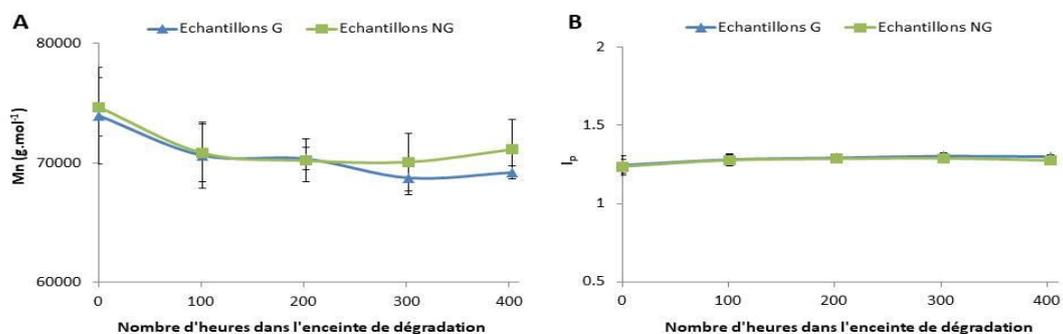


Figure 85 : Suivi de la masse molaire moyenne en nombre (A) et de l'indice de polydispersité (B) des faisceaux de PCL greffés (G) et non greffés (NG) en fonction du nombre d'heures dans l'enceinte de vieillissement (n=3)

Par ailleurs, les analyses par calorimétrie différentielle sur les échantillons n'ont pas révélé non plus de différence significative de cristallinité ($\chi_{\text{moy}} = 66,7 \pm 7,8\%$) ou de température de fusion ($T_{f,\text{moy}} = 64,6 \pm 0,4 \text{ } ^\circ\text{C}$) des faisceaux non greffés et greffés après le temps indiqué passé dans l'enceinte de vieillissement (cf. Figure 86). Ces résultats vont dans le sens d'une absence de dégradation des faisceaux de PCL par le système utilisé.

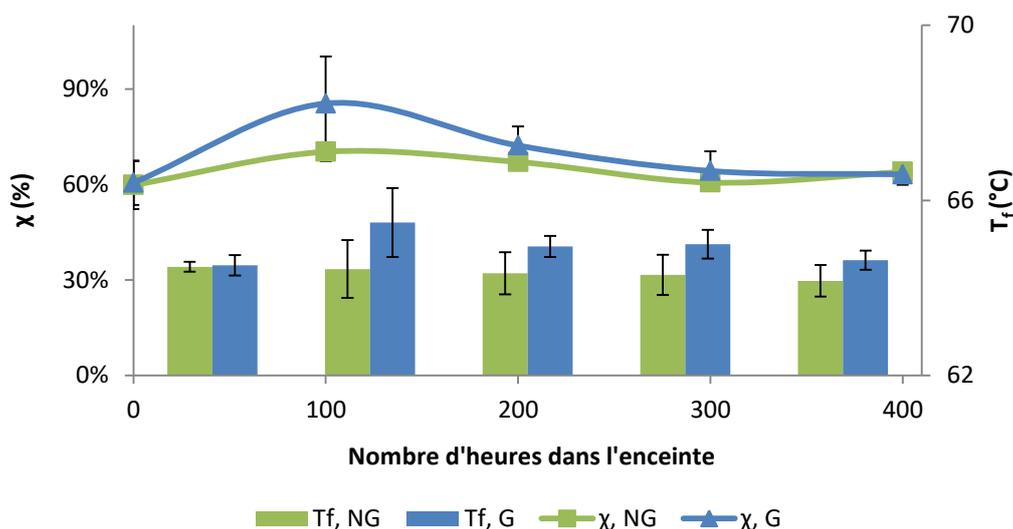


Figure 86 : Suivi de la cristallinité χ (lignes) et de la température de fusion T_f (barres) des faisceaux de PCL greffés (G – en bleu) et non greffés (NG – en vert) en fonction du nombre d'heures dans l'enceinte de vieillissement (n=3)

De plus, les résultats des essais de traction à rupture sur ces faisceaux ne nous ont pas permis d'observer d'altération des propriétés mécaniques étudiées (cf. Tableau 21).

Tableau 21: Propriétés mécaniques des échantillons non greffés (NG) et greffés (G) des faisceaux de PCL ayant été placés 0, 100, 200, 300 ou 400 heures dans l'enceinte de vieillissement (n=8)

	Module d'Young E (MPa)	Déformation élastique ϵ (%)	Force à la rupture F_{max} (N)	Contrainte à la rupture σ_{max} (MPa)	Déformation plastique ϵ (%)
Faisceaux NG - non dégradé	1404 ± 110	13,21 ± 0,40	58,63 ± 2,62	308,47 ± 13,78	76,00 ± 6,80
Faisceaux NG - 100h	1302 ± 47	15,41 ± 0,79	57,61 ± 0,78	303,13 ± 4,13	86,06 ± 4,87
Faisceaux NG - 200h	1314 ± 61	14,39 ± 2,32	45,76 ± 1,20	295,99 ± 14,04	91,18 ± 8,19
Faisceaux NG - 300h	1463 ± 75	14,82 ± 0,70	56,47 ± 1,60	297,10 ± 8,43	79,10 ± 7,78
Faisceaux NG - 400h	1385 ± 54	13,99 ± 1,42	55,50 ± 1,86	292,00 ± 9,79	80,20 ± 4,64
Faisceaux G - non dégradé	1125 ± 49	18,80 ± 1,32	53,21 ± 2,67	279,98 ± 14,06	74,88 ± 10,84
Faisceaux G - 100h	1108 ± 30	20,20 ± 0,93	55,44 ± 1,64	291,71 ± 8,65	92,69 ± 5,56
Faisceaux G - 200h	1188 ± 45	18,37 ± 1,41	54,63 ± 1,58	287,43 ± 8,29	85,13 ± 5,44
Faisceaux G - 300h	1231 ± 71	18,02 ± 1,33	52,02 ± 3,59	273,71 ± 18,86	80,81 ± 16,96
Faisceaux G - 400h	1226 ± 46	17,45 ± 1,37	53,96 ± 0,83	283,90 ± 4,35	94,54 ± 2,50

L'ensemble des résultats précédents, hormis la mesure du poids des échantillons, n'a pas révélé de modification des propriétés physico-chimiques et mécaniques des faisceaux de PCL par le système de vieillissement accéléré utilisé, que les échantillons de PCL soient non greffés ou greffés de pNaSS. Toutefois, l'analyse de la surface réalisée par l'utilisation du dosage colorimétrique au bleu de toluidine a révélé des résultats intéressants. En effet, le taux de greffage des faisceaux greffés de pNaSS a été divisé par deux par l'exposition aux rayonnements émis dans l'enceinte de dégradation ($TG_{moy,avant} = 1,07 \pm 0,20 \mu\text{mol.g}^{-1}$ versus $TG_{moy,après} = 0,52 \pm 0,14 \mu\text{mol.g}^{-1}$) ; tandis que le taux mesuré pour les faisceaux non greffés – pour rappel, il s'agit de la fixation non spécifique du colorant au polymère - était multiplié par deux ($TG_{moy,avant} = 0,15 \pm 0,03 \mu\text{mol.g}^{-1}$ versus $TG_{moy,après} = 0,35 \pm 0,03 \mu\text{mol.g}^{-1}$) (cf. Figure 87). Ces phénomènes ont eu lieu dès 100 heures dans l'enceinte, et sont restés stables dans le temps. La diminution du taux TG mesuré pour les faisceaux greffés est en parfaite corrélation avec les observations faites lors des essais de greffage radicalaire de la PCL par voie UV présentés dans le chapitre III - partie 1 : greffage de pNaSS par voie UV. Nous avons en effet mis en évidence, le fait qu'une exposition longue à des rayonnements de type UV entraînait la coupure de la chaîne de pNaSS formée à la surface de la PCL engendrant ainsi une diminution du taux de greffage. On peut tout à fait supposer ici un phénomène similaire de rupture de chaîne de pNaSS par les rayonnements « UV » de l'enceinte.

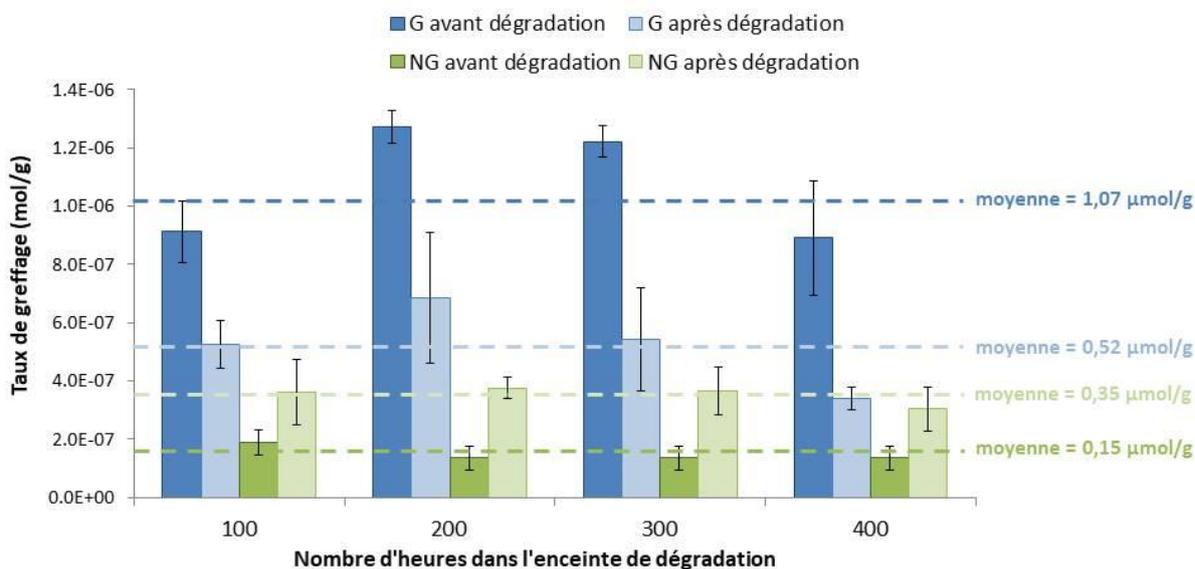


Figure 87 : Taux de greffage mesurés par dosage colorimétrique au bleu de toluidine sur les faisceaux de PCL non greffés (NG) et greffés (G) avant et après leur passage dans l'enceinte de vieillissement (n=3)

Cette étude de dégradation « accélérée » en enceinte de vieillissement ne s'est pas révélée concluante quant à l'évaluation de la dégradation hydrolytique de la PCL en milieu salin aqueux et à 37°C. En effet, les résultats obtenus n'ont pas pu être mis en parallèle avec ceux obtenus lors de l'étude de dégradation « naturelle ». Les données de la littérature semblent indiquer que les

polyesters ne sont que très peu dégradés par ces enceintes de vieillissement et qu'une durée minimale de 1200 à 1600 heures dans l'enceinte, ou un rayonnement plus intense en énergie que celui du spectre solaire, auraient été nécessaire pour commencer à observer des effets de dégradation sur nos matériaux de PCL[243]. Cette étude nous aura toutefois permis d'observer une diminution de la masse des échantillons de PCL couplée à une augmentation de la non-spécificité des surfaces non-greffés grâce à la complexation par le bleu de toluidine ainsi qu'à une diminution du taux de greffage mesuré sur les échantillons greffés. Ces résultats indiquent que les faisceaux de PCL non greffés et greffés ont subi une faible dégradation par érosion de la surface par le rayonnement du spectre solaire de l'enceinte de vieillissement, en condition statique, en solution saline et à 37°C. Ici encore, le greffage de pNaSS semble protéger la surface de la perte de masse liée à la dégradation accélérée, cette dégradation s'en trouve ainsi ralentie.

En conclusion, ce chapitre nous a permis d'évaluer les mécanismes de dégradation de la PCL non greffée et greffée de pNaSS. Bien que l'hydrolyse naturelle de la PCL soit augmentée par la présence du pNaSS à la surface des échantillons, nous avons pu voir que ce greffage protège le matériau durant les six premiers mois de dégradation et reste pérenne sur les temps les plus longs étudiés. Or c'est durant ce laps de temps que le néo-ligament se formera à la surface de l'implant synthétique, d'autant plus avec la préservation du polymère bioactif à sa surface. De plus, les propriétés mécaniques des faisceaux dégradés en condition statique sont très encourageantes sur la tenue à long terme de la prothèse. Seuls les essais *in vivo* à plus long terme nous permettrons de juger de la dégradation et de la tenue mécanique *in situ* de l'implant ligamentaire. Enfin, bien que l'étude de dégradation accélérée n'ait pas permis d'anticiper des temps de dégradation de 3 à 4 ans de nos matériaux, les résultats obtenus nous mettent en garde sur les conditions de stockage des futurs implants bioactifs et biodégradables : une conservation en environnement sec et à l'abri de la lumière sera en effet à préconiser.

Chapitre V – Études in vivo chez le rat

Les résultats des études chimiques, biologiques et mécaniques, présentés dans les chapitres précédents ont permis d'étudier et de mettre à jour le comportement de films et de faisceaux de PCL greffés de pNaSS au travers d'essais de greffage, de dégradation en laboratoire, d'essais mécaniques ou encore d'essais biologiques *in vitro*. Bien que ces travaux aient abouti à une meilleure compréhension des phénomènes qui se produisent dans la partie intra articulaire qui composera la future prothèse ligamentaire biodégradable, rien ne peut remplacer les essais *in vivo* pour confirmer la résistance structurelle (choix de la PCL pour sa dégradation lente) et la résistance mécanique (maintien dans le temps) du futur implant. En effet, bien que l'ensemble des tests biologiques aient été réalisé avec des cellules primaires de brebis, avant de réaliser les essais *in vivo* sur un modèle de « grand animal » comme la brebis, il est apparu nécessaire d'effectuer des essais de faisabilité de l'étude *in vivo* chez le petit animal – ici le rat. Ainsi, le dernier chapitre de cette thèse est consacré à la création d'un implant ligamentaire synthétique bioactif et biodégradable implantable chez le rat. Pour réaliser cela, des études préliminaires notamment en terme de stérilisation et de dimensionnement de la prothèse ont été menées au laboratoire LBPS puis un essai a été réalisé chez un rat dit « pilote », avant de passer à l'étude *in vivo* à proprement parlé réalisée en collaboration avec le Pr V Viateau de l'ENVA et le Dr N Boucard de la société Texinov™.

V-Partie 1 : Études préliminaires

L'ensemble des essais préliminaires ont été réalisés en utilisant des faisceaux de PCL greffés de pNaSS par « voie thermique » avant de procéder au dimensionnement et à la réalisation de prototypes implantables chez le rat.

V.1.1. Impact de la stérilisation sur les faisceaux de PCL

Comme cela a été discuté (cf. chapitre III), les propriétés mécaniques des faisceaux de PCL sont fortement impactées par le procédé de stérilisation par les rayonnements β ; en effet celle-ci entraîne une augmentation de la rigidité du matériau, associée à une perte de déformation élastique et de résistance à la rupture. Afin de limiter la fragilisation de la prothèse, nous avons étudié deux autres modes de stérilisation : la stérilisation à l'éthanol (EtOH) communément utilisée en laboratoire mais non applicable à l'échelle industrielle et la stérilisation à l'oxyde d'éthylène (OE) comme solution alternative industrialisable.

A. Effet de la stérilisation sur les caractéristiques mécaniques des faisceaux de PCL

Les essais mécaniques réalisés sur les faisceaux stérilisés selon les différents procédés ont montré que les deux modes de stérilisation, EtOH et OE, n'engendraient pas de modification de la rigidité, ni de la contrainte à rupture par comparaison aux faisceaux non stérilisés (cf. Fig.88). La déformation

élastique des faisceaux s'est quant à elle trouvée légèrement augmentée après la stérilisation à l'OE puisque la valeur ϵ varie de $18,8 \pm 1,3$ % pour les faisceaux non stérilisés à $23,0 \pm 1,1$ % pour les faisceaux stérilisés à l'OE.

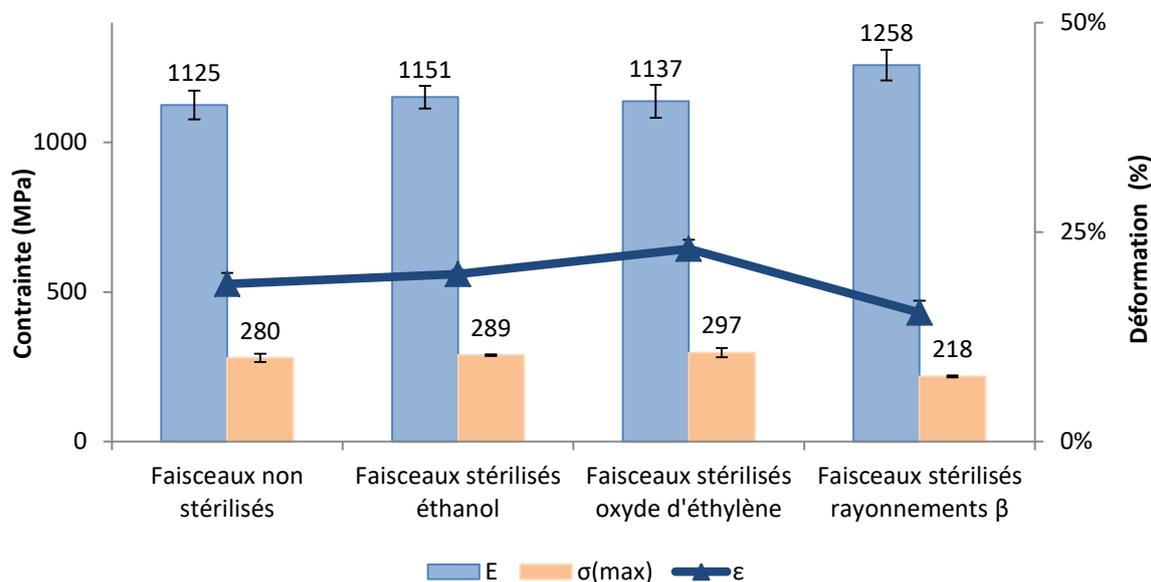


Figure 88 : Module d'Young (E), contrainte à rupture (σ_{max}) et déformation élastique (ϵ) des faisceaux greffés de pNaSS par voie thermique non stérilisés ; stérilisés à l'éthanol ; stérilisés à l'oxyde d'éthylène ou stérilisés par rayonnements β

B. Effet de la stérilisation sur les caractéristiques physico-chimiques des faisceaux de PCL

Les caractéristiques physico-chimiques des faisceaux de PCL stérilisés selon trois méthodes EtOH, OE et rayonnements β ont été déterminées et comparées à celles des faisceaux non stérilisés. Les résultats obtenus montrent une absence de modification de la masse molaire moyenne en nombre M_n et donc de la longueur des chaînes macromoléculaires lorsque la stérilisation est réalisée à l'éthanol et à l'oxyde d'éthylène (cf. Tableau 22). En revanche, la stérilisation β diminue significativement la masse molaire moyenne en nombre des faisceaux de PCL puisque la valeur de M_n diminue de 18%, passant de 75234 ± 1405 g.mol⁻¹ à 61784 ± 1247 g.mol⁻¹; de même une augmentation de l'indice de polydispersité est observée, elle est corrélée à la diminution de la valeur de M_n ce qui suggère et confirme une lyse des chaînes macromoléculaires par le rayonnement β .

	M_n (g.mol ⁻¹)	M_w (g.mol ⁻¹)	I
Faisceaux non stérilisés	75234 ± 1405	92258 ± 107	1,23 ± 0,02
Faisceaux stérilisés éthanol	73598 ± 2225	91601 ± 1094	1,24 ± 0,02
Faisceaux stérilisés oxyde d'éthylène	74974 ± 1880	91828 ± 614	1,23 ± 0,02
Faisceaux stérilisés rayonnements β	61784 ± 1247	84439 ± 931	1,37 ± 0,01

Tableau 22 : Analyses GPC des faisceaux de PCL suivant le mode de stérilisation utilisé

Par ailleurs, l'étude calorimétrique a révélé que la cristallinité des faisceaux de PCL n'était pas modifiée par les stérilisations éthanol et oxyde d'éthylène, tout comme la température de transition vitreuse et la température de fusion (cf. Fig.89). En revanche, une fois de plus, la stérilisation par

rayonnements β se différencie des autres modes de stérilisation, par une augmentation de 17% du taux de cristallinité χ qui évolue de $58,8 \pm 6,8$ % avant stérilisation à $68,8 \pm 0,4$ % après stérilisation. Ce résultat est en parfait accord avec les résultats de l'étude mécanique : une augmentation de la rigidité avait été observée lors des essais.

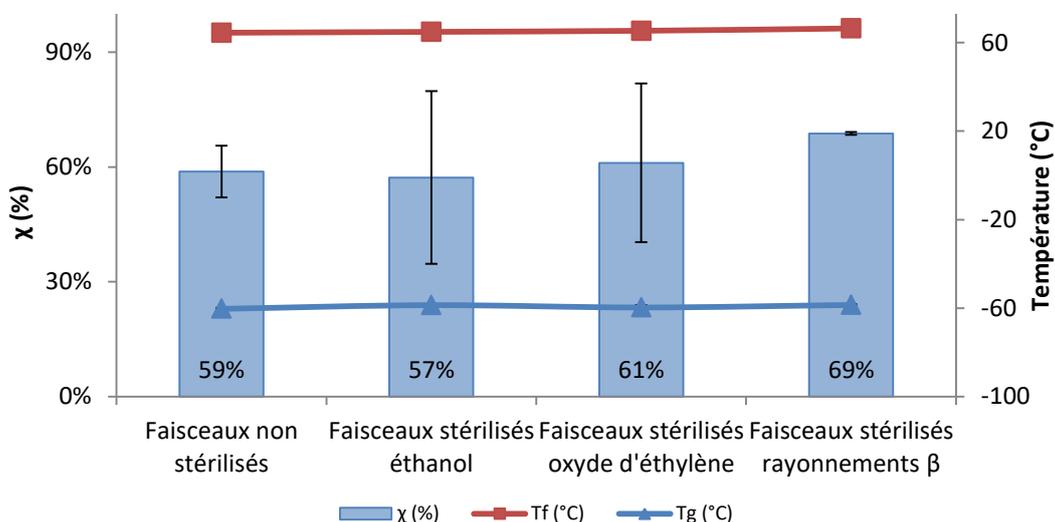


Figure 89 : Analyses calorimétriques des faisceaux de PCL suivant le mode de stérilisation utilisé

Enfin, un dosage du taux de greffage en pNaSS par analyse colorimétrique au bleu de toluidine (BT) a été réalisé afin d'évaluer si la stérilisation avait affecté le taux de greffage (TG). Les résultats obtenus ne montrent pas de diminution du taux de greffage quel que soit le mode de stérilisation (cf. Fig.90). La stérilisation à l'éthanol n'affecte pas le TG ni la mesure du TG par dosage au BT, en revanche les stérilisations à l'oxyde d'éthylène et aux rayonnements β semblent modifier l'état de surface des faisceaux de PCL, engendrant une augmentation du taux de greffage, probablement liée à une oxydation de la PCL (stérilisation à OE) ou une dégradation de celle-ci (β) induisant une fixation non spécifique du BT sur les fibres de polymère. Dans tous les cas, la stérilisation semble ne pas altérer le greffage du pNaSS ; des analyses sont toutefois à réaliser pour comprendre les effets des stérilisations à l'oxyde d'éthylène et aux rayonnements β sur la PCL.

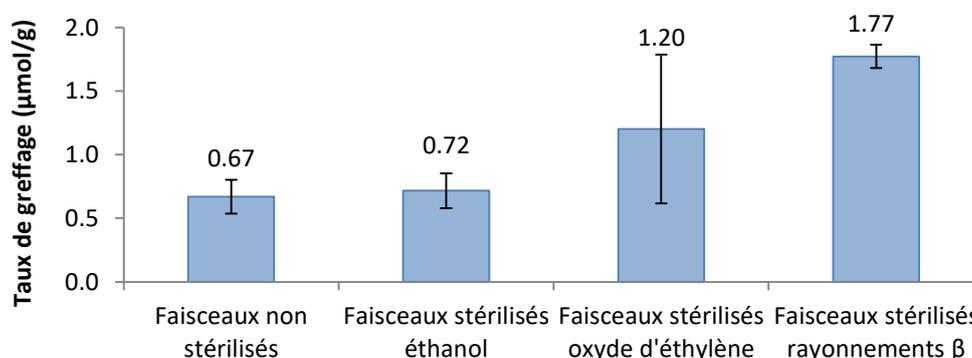


Figure 90 : Taux de greffage mesurés par dosage colorimétrique au bleu de toluidine des faisceaux de PCL stérilisés suivant les différents modes étudiés

L'étude de l'impact du mode de stérilisation **sur les caractéristiques de la PCL** (diminution de σ_{\max} et M_n ; augmentation de E , I et χ) révèle :

- **une forte influence du rayonnement β sur celles-ci.** Ce mode de stérilisation n'est donc pas préconisé pour la suite du projet.
- **que la stérilisation à l'éthanol est celle qui affecte le moins la structure de la PCL** même si ce mode de stérilisation apporte le moins de certitude quant à la stérilité des échantillons et n'est pas applicable à l'échelle industrielle.
- que **la stérilisation à l'oxyde d'éthylène semble être un bon compromis**, sans modification des propriétés mécaniques - hormis une légère augmentation de la déformation élastique, qui n'est pas défavorable dans notre cas - et sans modification des propriétés physico-chimiques de la PCL.

V.1.2. Études mécaniques

Avant d'entreprendre des implantations animales des ligaments de PCL, des essais mécaniques de traction à rupture ont été conduits sur des échantillons « humides », c'est-à-dire immergés une nuit dans du PBS. L'objectif de ces essais « humides » était d'observer si la PCL pourrait avoir un comportement mécanique différent une fois humide – plus proche des conditions physiologiques que les essais « à sec ». Qu'il s'agisse des faisceaux de PCL désensimés non greffés ou greffés de pNaSS, aucune différence de propriétés mécaniques n'a été observée entre les deux conditions « humides » et « sec » (cf. Tableau 23).

	E (MPa)	ϵ (%)	σ_{\max} (MPa)
Faisceaux désensimés NG - sec	1404 ± 110	13,21 ± 0,40	308 ± 14
Faisceaux désensimés NG - PBS	1332 ± 44	12,46 ± 1,35	281 ± 8
Faisceaux greffés Th - sec	1125 ± 49	18,80 ± 1,32	280 ± 14
Faisceaux greffés Th - PBS	1149 ± 50	17,80 ± 2,05	283 ± 6

Tableau 23 : Module d'Young (E), la déformation élastique (ϵ) et contrainte à rupture (σ_{\max}) déterminés sur des faisceaux non greffés et greffés « sec » ou « humide » (PBS)

L'avancement du projet et les différentes discussions avec les partenaires industriels, nous ont amené à reconsidérer le temps de polymérisation du pNaSS lors du greffage radicalaire, qui historiquement avait été établi à 3h pour la PCL. Une étude cinétique de la polymérisation radicalaire en surface (« grafting from ») amorcée par voie thermique sur les faisceaux de PCL a été conduite et les résultats permettent d'observer que des taux similaires, voire légèrement supérieurs, sont obtenus avec 1h de polymérisation à 40-45°C (cf. Fig.91). Afin d'assurer un taux de greffage du pNaSS

maximal grâce à des conditions de polymérisation radicalaire du NaSS optimisées, la température de polymérisation de la PCL à 45°C a été conservée.

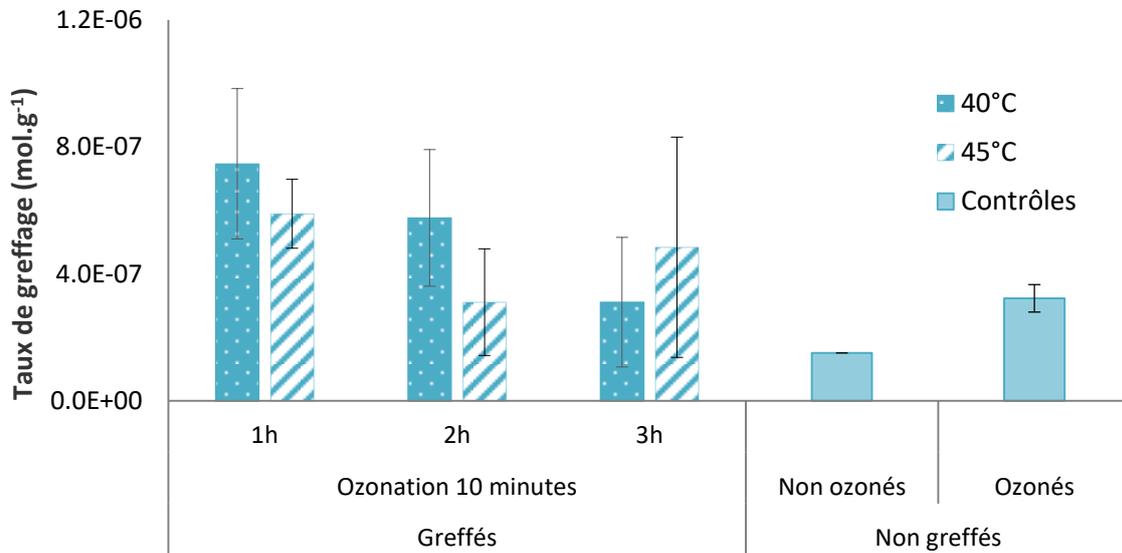


Figure 91 : Taux de greffage de pNaSS obtenus sur faisceaux de PCL – étude cinétique de polymérisation radicalaire amorcée par voie thermique

Des essais mécaniques – sur échantillons secs - ont permis de comparer les propriétés des faisceaux de PCL greffés de pNaSS par greffage (amorcé par voie thermique) pendant des temps de polymérisation variant de 1h à 3h à 45°C. Les résultats de ces essais reportés Tableau 24 ne montrent aucune différence significative concernant la rigidité de la PCL (E) et la contrainte à rupture (σ_{max}). En revanche, la déformation des faisceaux (ϵ) est moindre après 1h qu’après 3h de polymérisation du pNaSS, confirmant comme nous l’avons présenté dans le chapitre III, que le traitement « thermique » occasionné par l’incubation de la PCL à 45°C pendant la durée de la polymérisation du pNaSS agit comme un « recuit » sur les fibres de PCL et qu’un certain temps est nécessaire aux réarrangements moléculaires associés.

	E (MPa)	ϵ (%)	σ_{max} (MPa)
Faisceaux non greffés	1404 ± 110	13,21 ± 0,40	308 ± 14
Faisceaux greffés thermiquement 1h	1215 ± 64	16,58 ± 0,67	296 ± 6
Faisceaux greffés thermiquement 3h	1125 ± 49	18,80 ± 1,32	280 ± 14

Tableau 24 : Module d’Young (E), déformation (ϵ) et contrainte à rupture (σ_{max}) des faisceaux de PCL non greffés et greffés de pNaSS par greffage amorcée par voie thermique – influence du temps de polymérisation : 1h ou 3h à 45°C

V.1.3. Dimensionnement

Afin de remplacer le ligament croisé antérieur du rat, appelé ligament croisé crânial (LCCr) chez l’animal, nous avons préalablement réalisé une étude sur cadavre de rat avec le Pr V Viateau et E Maurice, vétérinaires à l’ENVA-Maisons-Alfort. Une rate de race Wistar – animal choisi pour les premiers essais d’implantation animale dans le cadre du projet LIGA2BIO - âgée de 37 semaines a été

disséquée afin d'établir les dimensions du ligament natif et de déterminer celles de la prothèse ligamentaire. Après digestion des tissus mous pendant une nuit dans la collagénase à 0,5% dans du DMEM, il a été établi que :

- le fémur était long de 27 mm ;
- le tibia de 32 mm ;
- la tête distale du fémur mesurait 7 mm de largeur pour 6 mm de hauteur ;
- l'insertion du LCA était d'un diamètre de 1,5 mm environ, pour une longueur intra articulaire de 5 mm (cf. Fig.92).

En tenant compte de l'angle d'insertion envisagé pour la pose de la prothèse ligamentaire, il a été estimé que le ligament synthétique devrait avoir une partie intra-osseuse d'environ 5mm respectivement du côté fémoral et du côté tibial. La longueur utile de l'implant à développer a ainsi été estimée à 15 mm.

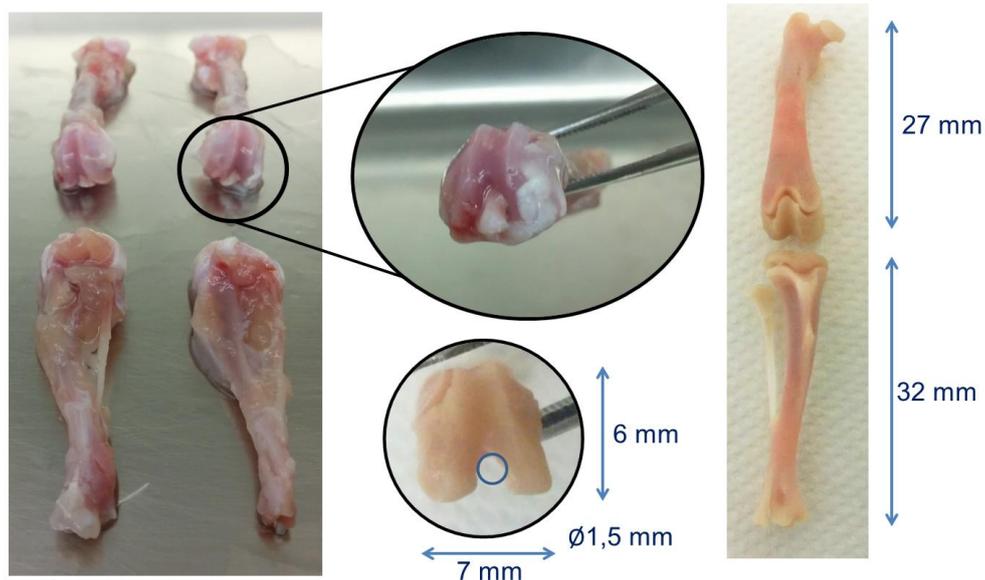


Figure 92 : étude dimensionnelle de l'articulation du genou d'un rat

Afin de déterminer le nombre de fils de PCL nécessaires à la tenue de la prothèse implantée dans l'articulation du rat, une revue de la littérature a été effectuée pour connaître les paramètres mécaniques du ligament naturel à reproduire pour la prothèse. Le tableau 25 résume l'ensemble des informations recueillies, à savoir la race, l'âge, le poids, le nombre, la force à la rupture, la rigidité et la section du LCCr natif chez le rat. Ces informations montrent que la force à rupture du LCCr est dépendante du poids de l'animal et probablement de son âge. Pour l'essai *in vivo*, nous avons choisi d'utiliser des femelles Wistar adultes, âgées de 37 semaines, d'un poids d'environ 350 g. La force que la prothèse devra pouvoir supporter sans rompre est donc d'environ 35 N en tenant compte des données reportées dans la littérature.

Auteurs de l'étude	Race	Agés (sem.)	Poids moyens (g)	Qté	Force à rupture (N)	Rigidité (N/mm)	Section (mm ²)
K.Nawata	Sprague-Dawley	4	137,8 ± 2,76	10	26,7 ± 8,6	41,3 ± 19,3	-
A. Petrigliano	Sprague-Dawley	11	300	6	35,45 ± 3,33	51,56 ± 9,7	-
W.A. Romani	Sprague-Dawley	12	484 ± 21,4	8	34,5	-	0,90
I. Yucel	Wistar Albino	20 à 28	220-275	10	21,32 ± 1,71	1.06	0,84

Tableau 25 : Revue de la littérature des caractéristiques mécaniques du LCCr natif chez le rat d'après [204], [244]–[246]

Des essais mécaniques ont été réalisés sur des faisceaux de PCL contenant 20, 40 ou 60 fils. Ces essais ont permis d'établir une relation linéaire entre le nombre de fils et la charge pouvant être appliquée aux faisceaux avant leur rupture (cf. Fig.93). Ainsi, l'équation suivante a été établie :

$$\text{Charge à rupture de l'implant} = 2,55 \times \text{Nombre de fils}$$

D'après cette équation le nombre de fils nécessaire pour supporter 35N avant rupture est de 14.

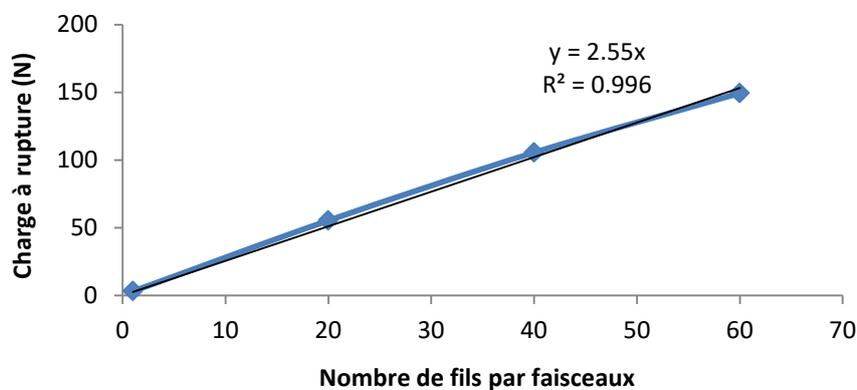


Figure 93 : Charge à rupture en fonction du nombre de fils de PCL par faisceaux

Enfin, l'étude cadavérique nous a permis d'établir que le diamètre maximal du ligament - qui correspond au diamètre de son insertion dans l'os - était de 1,5mm, soit une section de 1,77 mm². Pour un fil de PCL de 100 µm de diamètre, le nombre maximal de fils parallèlement disposés pouvant être insérés dans cet espace est donc de 186, ce qui est largement nécessaire en termes de nombre de fils pour supporter la charge maximale de 35 N (cf. Tableau 25). Par ailleurs, le LCA ayant un diamètre variable suivant la section d'articulation observée, il est intéressant de noter que la section de ce LCCr natif reportée dans la littérature était de 0,84 à 0,90 mm², soit l'équivalent de 88 et 95 fils de PCL de diamètre 100 µm disposés parallèlement, nombre toujours supérieur au nombre minimum nécessaire pour supporter la charge de 35N. En conclusion, pour être efficace et utilisable, le ligament synthétique devra contenir entre 14 et 95 fils parallèles de PCL.

V-Partie 2 : Étude de faisabilité d'implantation

V.2.1. Résumé

Comme nous avons pu le décrire dans ce chapitre, remplacer le ligament croisé antérieur d'un rat s'avère complexe notamment à cause de la très petite taille de cet animal et par conséquent de son

articulation. Afin d'évaluer la faisabilité de cette intervention chirurgicale, nous avons décidé de créer des prototypes de prothèse ligamentaire sous forme de faisceaux de 20 fils de PCL plus ou moins tressés. En effet, l'objectif était de reproduire à petite échelle le ligament LARS, composé d'une partie intra articulaire de fibres de poly(téréphtalate d'éthylène glycol) (PET) libres et parallèles, et d'une partie intra-osseuse tricotée, ici tressée à la main. Les deux parties étant délimitées par des nœuds, nous pouvions difficilement utiliser plus de 20 fils, car une fois les fils noués, l'épaisseur des nœuds était de 1,2 mm. De plus, au vu de la difficulté de précision dans l'établissement de cette zone intra articulaire, il a également été décidé de fabriquer des prototypes totalement tressés sans délimitation entre la partie intra-articulaire et la partie intra-osseuse.

L'évaluation de ces deux « designs » de prototypes d'implant pour le rat a été menée en termes de taux de greffage de pNaSS, de propriétés mécaniques, d'essais *in vitro* et d'un essai *in vivo*. Cette étude est présentée sous forme d'un article intitulé « étude de faisabilité de la reconstruction ligamentaire chez le rat à partir d'un ligament synthétique de PCL fonctionnalisé de pNaSS – essais *in vivo* » paru dans la revue scientifique IRBM en octobre 2018. Les résultats principaux ainsi que les conclusions de cette étude sont résumés ci-après.

Les deux types de prototypes ont été greffés de pNaSS avec des taux respectivement de $0,70 \pm 0,12 \mu\text{mol.g}^{-1}$ pour le prototype composé d'une partie intra articulaire et de $1,05 \pm 0,14 \mu\text{mol.g}^{-1}$ pour le prototype totalement tressé. Le taux de greffage était donc légèrement meilleur pour le prototype tressé.

Des essais de traction à rupture ont révélé que les prototypes composés de fibres libres présentaient des propriétés mécaniques inférieures, avec une force à rupture de $38,8 \pm 3,7 \text{ N}$ contre $43,3 \pm 1,0 \text{ N}$ pour les prototypes totalement tressés. De plus, l'allongement des prototypes totalement tressés était 1,5 fois plus important passant de $77,5 \pm 9,8\%$ à $115,6 \pm 4,6\%$. Il est intéressant de noter l'influence de la structure ligamentaire sur les résultats obtenus. En effet, d'après l'équation définie dans la partie I de ce chapitre, 20 fils de PCL parallèlement organisés doivent pouvoir supporter 51 N avant de rompre, or ici les valeurs obtenues étaient inférieures. De plus, lors de ces essais mécaniques, il a été observé que la rupture des prototypes intervenait toujours au-dessus ou en-dessous d'un nœud et non au milieu de la partie implantée du prototype. Les prototypes sont donc affaiblis par la présence de ces nœuds qui vont concentrer les contraintes et fragiliser l'implant.

Les deux types de prototypes ont été incubés pendant 1 mois en présence de cellules fibroblastiques – cellules primaires de ligament de brebis. Les observations MEB ont révélé que les cellules avaient proliféré entre les fibres des prototypes, mais que dans le cas des fibres libres, ces cellules étaient majoritairement séparées les unes des autres, tandis que dans le cas des fibres tressées, les cellules

étaient interconnectées et formaient un réseau cellulaire. Il y avait également plus de cellules sur les prototypes tressés. Cette augmentation était encore plus flagrante lorsque le prototype ligamentaire était greffé de pNaSS. En effet, dans les deux cas, la présence de pNaSS à la surface des fibres améliorait la répartition cellulaire le long et autour des fibres.

L'ensemble des résultats obtenus ont mis en évidence que le prototype totalement tressé semblait être un meilleur candidat avec un taux de greffage de pNaSS et une force à rupture plus élevés couplés à une meilleure réponse *in vitro*. De fait, ce prototype a été choisi pour l'essai de faisabilité chez le rat. Dès le lendemain de l'implantation, le rat utilisait normalement sa patte opérée et cela sans signe de boiterie. Après un mois, aucun signe d'inflammation n'a été noté et l'amplitude des mouvements de l'articulation était normale, avec une bonne flexion et une bonne extension, et cela sans tiroir antérieur, en comparaison au membre controlatéral non opéré. L'animal a été sacrifié et le prototype explanté. Ce dernier était difficile à retirer en raison de sa bonne stabilité et de son ancrage dans les tunnels osseux. L'observation MEB de l'explant a révélé que le prototype était recolonisé par du tissu et cela de manière plus importante dans la partie intra-osseuse que dans la partie intra articulaire, probablement grâce au contact direct avec des cellules ostéoblastiques.

En conclusion, malgré la petite taille de l'animal et le besoin de matériel très précis, **le prototype a été implanté avec succès**. Après un mois d'implantation, de **bons résultats cliniques** ont été observés. En effet, le **prototype tressé et greffé de pNaSS était toujours présent** après ce laps de temps, il a également permis d'**induire une colonisation cellulaire** tout en constituant un **support permettant la marche du rat**. Ainsi, cette étude nous a permis de valider la faisabilité d'implanter à court terme un ligament bioactif et biodégradable pour remplacer le ligament croisé antérieur chez le rat.

V.2.2. Article paru dans la revue scientifique « IRBM »

Feasibility study of the elaboration of a biodegradable and bioactive ligament made of poly(ϵ -caprolactone)-pNaSS grafted fibers for the reconstruction of anterior cruciate ligament: in vivo experiment

Amélie Leroux^{1*}, Emeline Maurice², Véronique Viateau², Véronique Migonney¹

¹Laboratory of Biomaterials and Polymers of Specialty, CSPBAT, UMR CNRS 7244, Institut Galilée, Université Paris 13, Sorbonne Paris Cité, Villetaneuse, France

²Ecole Nationale Vétérinaire d'Alfort, Maisons-Alfort, France

*Corresponding author: e-mail: amelie.leroux@univ-paris13.fr (AL)

Abstract

Background - The anterior cruciate ligament rupture is a common injury which mainly affects young and active population. Faced to this problem, the development of synthetic structures for ligament reconstruction is booming. The most recent researches focused on the development of biodegradable structures that could be functionalized to enhance host integration. This work describes the elaboration of different poly(ϵ -caprolactone) prototypes for the rat anterior cruciate ligament replacement in order to find the best design for further *in vivo* assays.

Methods – According to the literature, it was decided to elaborate two different poly(ϵ -caprolactone) prototypes: a braided one and a free-fibers one. A chemical grafting of a bioactive polymer – poly(sodium styrene sulfonate) - was performed on both prototypes and mechanical and biological testing were assessed. Based on these results, one rat was implanted with the best prototype.

Results – The mechanical and biological results demonstrated that the best prototype to implant was the poly(sodium styrene sulfonate)-grafted braided prototype. After one-month implantation, no inflammation was observable around the scar. The rat demonstrated good flexion and extension of the lower limb without any anterior drawer. The prototype was highly anchored to the bone. ESEM images of the explanted prototype showed the presence of cells and tissue ingrowth along and around the fibers.

Conclusion - This work demonstrates the feasibility to implant a bioactive and biodegradable synthetic ligament in the rat model without any inflammation and with a good tissue anchoring at a short-term time. This will lead to an extensive *in vivo* assay.

Keys words – synthetic ligament; ACL reconstruction; bioactive surface; biodegradable polymer

Introduction

Injuries of knee anterior cruciate ligament (ACL) frequently happen during high demand sports and mainly affects young and feminine population[39]. Surgical reconstruction is most often required to treat the instability of the knee associated with ACL rupture and until now, the gold standard remains autograft[15]. Nevertheless, side effects as morbidity of autologous tissues, weak anchorage and recurrent pains of the patients led to artificial ligament solutions. The development of synthetic ligament began in the early 1980's with the used of inappropriate materials which lead to synovitis, prosthesis rupture and bone tunnel enlargement[78]. After several clinical fails, the use of poly(ethylene terephthalate) (PET) material was broadly accepted and the current prosthesis on the market, as the LARS ligament, are still made of polyester[71]. Nevertheless, nowadays these

synthetic ligaments still encounter limitations such as the anchorage to the bone, the release of tear particles due to abrasion and a poor cell recolonization with limited tissue ingrowth[247]. Due to that, studies are conducted with the purpose of finding a material and design exhibiting similar mechanical properties than the native ACL and being well-integrated in the body avoiding adverse reactions thanks for instance to a surface treatment[76], [130], [248]. More recent researches focused on the development of biodegradable structures that can support mechanical stresses during the time that a neo-ligament is formed and recovers its first function of stabilizer. So that, the challenge is to find the best polymer to use. Poly(ϵ -caprolactone) (PCL) seems to be promising since it is FDA approved and widely used in different medical devices (MD) applications [249], [250], [206], [251]. Moreover, our team has shown that the functionalization of PCL films by poly(sodium styrene sulfonate) (pNaSS) grafting can improve the cell response[147]. The development of a new pNaSS-grafted PCL synthetic ligament seems to be relevant as an innovative biodegradable and bioactive ligament prosthesis. In this context, this article aims to compare two different structures of PCL prototypes for the rat ACL replacement in order to find the best design for further *in vivo* assays. To achieve this goal, two different prototypes - braided or composed of free-fibers - were elaborated. After grafting pNaSS on the braided and free fibers prototypes, they were mechanically tested and *in vitro* assays were conducted. These preliminary data allowed us to determine which structure was the best to be implanted in rat. After one month of *in vivo* implantation the compartment of this new biodegradable and bioactive prosthesis was analyzed.

Material and methods

Preparation of PCL prototypes

PCL fibers (diameter $110\pm 15\mu\text{m}$, length 75 ± 5 mm) from Luxilon Industries, Belgium are associated and hand tied in order to achieve 20 fibers PCL bundles. PCL bundles are then used to elaborate two kinds of ligament prototypes: (i) a “braided prototype” made of fully braided bundles, (ii) a “free-fibers prototype” which is partially braided at its two end portions around a central free fiber part (see Fig1).

Whatever the prototype, it is divided in two parts: (1) an implanted part (15 ± 2 mm long) which is inserted in the knee articulation of the rat (intra articular and osseous parts) and (2) an extra part (30 ± 5 mm long) which allows the veterinarian to optimally implant the ligament into the knee joint and straighten it for the best stabilization – this part is cut at the end of the implantation. Once the prototypes are made, they are ultrasound washed with different solvents (10% (w/v)) in order to remove the spin finish as following: hexane for 15 min, absolute ethanol for 5 min, water two times

for 5 min. Samples are then dried under vacuum and stored at 4°C until grafting process or experiments.

Grafting of poly(sodium styrene sulfonate) on PCL prototypes

PCL prototypes are functionalized with poly(sodium styrene sulfonate) pNaSS using a grafting “from” technique [123]. After the spin finish removal step, PCL samples are ozonized at 30°C in distilled water under stirring for 10 min. Ozone is generated using an ozone generator BMT 802 N (ACW) with a gas pressure of 0.5 bars and an oxygen flow rate of 0.6 L min⁻¹. Secondly, the ozonized PCL samples are transferred into a degassed aqueous NaSS solution (15 % (w/v)) under argon and maintained 1 hour at 45°C under stirring to allow the radical polymerization of the monomer. Then, samples are extensively washed with distilled water for 48 hours and vacuum-dried. The evidence of the pNaSS grafting is provided by toluidine blue colorimetric assay and the grafting rate is determined according to Ciobanu et al[123].

Mechanical testing

The two prototypes have undergone tensile loading until rupture by using a Bose Electroforce 3230 equipment (Bose). The tests were carried out three times for each prototype - effective length of 18.8±1.1 mm - the jaws of the machine were placed after the implanted part to test the future implant in its entirety. Stress strain curves are recorded and maximum force (F_{max}) in N, ultimate tensile stress (UTS) in MPa and elongation (ϵ) in % are determined.

Sterilization

Before biological experiments all the prototypes were packaged and sterilized as following: two washing of 3 hours in 1.5M aqueous sodium chloride solution; one washing of 10min in ultra-pure water; two washing of 3 hours in 0.15M aqueous sodium chloride solution; one washing of 10min in ultra-pure water; one washing of 3 hours in DPBS (Gibco); 20 minutes in 70% ethanol solution; following by 10 min ultra-pure water bath; then 15 min of UV irradiation were applied in both sides of the samples. All the washing was done under stirring. Prototypes were kept in sterile PBS solution at 4°C until experiments.

Biological experiments

Cells isolation

Anterior cruciate ligaments (ACL) from sheep are collected thanks to the collaboration with Pr V. Viateau at the ENVA, Maisons-Alfort, France (Ligart protocol). Tissues are cut into small pieces of 1 to 2 mm², washed three times in DPBS (Gibco) and incubated in a 0.1% (w/v) collagenase (Sigma-

Aldrich) solution for 6 hours at 37°C under 5% CO₂. The mixture solution is centrifuged (3 min at 1500 rpm): the supernatant is withdrawn and the clot is suspended in DMEM (Gibco) complemented with 10% Bovine Calf Serum (Sigma-Aldrich), 1% Penicillin-streptomycin (Gibco), 1% L-glutamine (Gibco); cells are cultured in flask until confluence and prior seeding on samples.

In vitro study

pNaSS-grafted and ungrafted “free-fibers” and “braided” prototypes are placed in a 6-wells plate treated for low attachment cell cultures. A primary fibroblasts suspension (P3) of 300000 cells in 50µL are seeded onto the middle of the implanted part of the different prototypes and incubated 30 minutes at 37°C under 5% CO₂, then 200µL of medium are added for 1h to limit the drying. Each well was then completed with 2mL of 10% serum supplemented DMEM and cultured for 1 month (33 days) at 37°C with a fresh medium replacement three times per week. After this period of time, the prototypes were fixed 1 hour in a 4% formaldehyde solution, intensively rinse with ultra-pure water, and observed in an environmental scanning electron microscope (ESEM). ESEM images were carried out using a Hitachi TM3000 SEM operating at 15 kV and equipped with a Peltier cooling device running at 4°C.

In vivo study

A 10-12-weeks-old female Sprague-Dawley rat of 360g was implanted with a pNaSS-grafted braided prototype. General anesthesia was done and the surgical procedure was performed on the lower left limb. After exposition of the ACL by arthrotomy, the ligament was excised. Then, the knee was oriented in a hyper-flexion position and the femur and the tibia were drilled at a diameter of 1.5 and 1.1mm respectively, the prototype was placed in the articulation through a 1.2mm diameter needle, replacing the native ACL. Screws of 6mm (femur) and 7mm (tibia) length were placed for the fixation of the prototype into the bone. The prototype surplus was cut flush to not exceed the joint. After one month implantation, the rat was sacrificed and the prototype was explanted going back through the osseous tunnel. The explant was fixed 1 hour in 4% formaldehyde solution and observed with ESEM-Peltier at 4°C.

Results

Elaboration of prototypes

The free fibers and the braided prototypes were observed microscopically in order to validate that the handmade elaboration did not alter the PCL fibers. As it can be seen in the Figure 94, the fibers do not look impacted by the assembly.

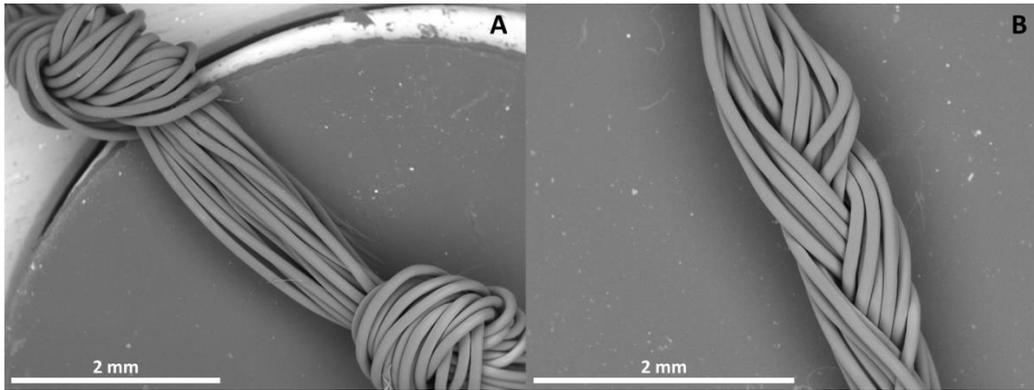


Figure 94 : SEM images of free fibers (A) and braided (B) prototypes

The presence of grafted pNaSS molecules on PCL prototypes was determined according to the toluidine blue assays process. The obtained average value of the grafting rate of the free fibers prototypes ($n=3$) equals $0.70 \pm 0.12 \mu\text{mol.g}^{-1}$ whereas the grafting rate of braided prototypes ($n=3$) reached $1.05 \pm 0.14 \mu\text{mol.g}^{-1}$ (see Fig.95).

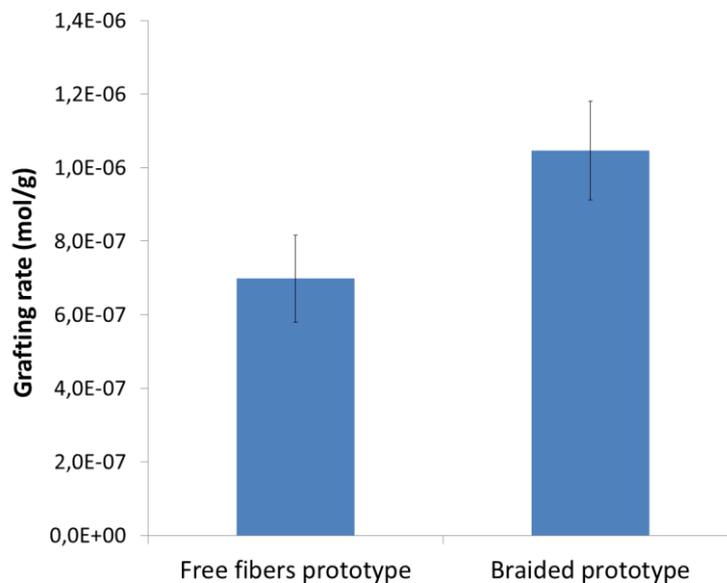


Figure 95 : Grafting rates of the two types of prototypes obtained with the toluidine blue colorimetric method

Mechanical testing

Because the prototypes are handmade elaborated, the presence of some knots was necessary in order to demarcate the braided areas from the free fibers areas, especially at the intra-articular part level for free-fibers prototypes and for the limit between implanted and the external parts for both prototypes. To avoid the compression of the knot in the jaws and so influence the test, it was decided to evaluate the mechanical properties of the prototypes by placing the jaws after the implanted area (see Fig.96).

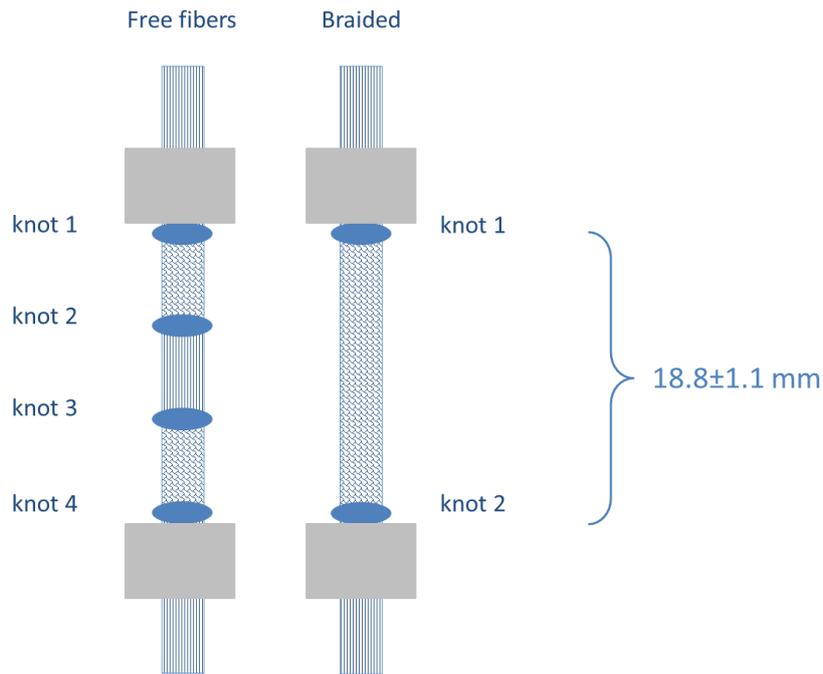


Figure 96 : schematic representation of the placement of the prototypes in the jaws (in gray) of the traction machine

The mechanical results and the location of the rupture are presented in the Table 26. The obtained results showed that the “free fibers” prototypes exhibit lower mechanical properties than braided prototypes with a maximal force of 38.8 ± 3.7 N against 43.3 ± 1.0 N and an UTS of 204.3 ± 19.4 MPa against 227.9 ± 5.4 MPa that can be endured. Moreover, the elongation of the braided prototypes is 1.5 time more important than the one of the free fibers prototypes going from $77.5 \pm 9.8\%$ to $115.6 \pm 4.6\%$. Finally, it is important to note that it was observed that the rupture always came above or below a knot and not in the middle of the implanted part of the prototype. The prototypes are therefore weakened by the presence of these knots.

Tableau 26 : Mechanical properties of the two PCL prototypes

	F_{\max} (N)	UTS (MPa)	ε (%)	Location of the rupture
Free fibers prototypes				
#1	40.95	215.45	88.22	above knot 1
#2	40.95	215.45	75.00	below knot 1
#3	34.57	181.88	69.15	below knot 1
Average	38.8 ± 3.7	204.3 ± 19.4	77.5 ± 9.8	
Braided prototypes				
#1	42.24	222.24	110.29	below knot 2
#2	43.38	228.45	118.74	above knot 2
#3	44.29	233.02	117.74	above knot 2
Average	43.3 ± 1.0	227.9 ± 5.4	115.6 ± 4.6	

Biological experiments

Cell culture *in vitro* assays

The observation of the cell cultures after 1 month revealed differences on the cells repartition when there are seeded onto the free fibers prototypes when compared to the braided prototypes (see Figure 97 and 98).

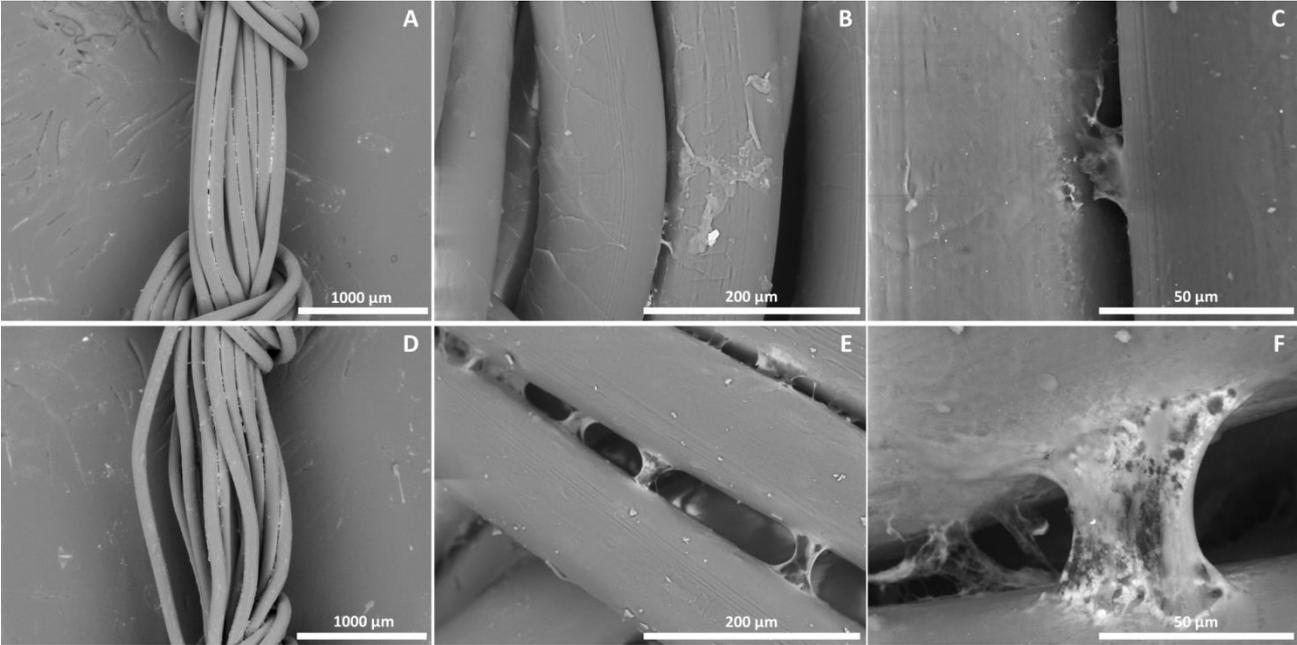


Figure 97 : ESEM images of ungrafted (A, B,C) and grafted (D,E,F) free fibers prototypes cultured with primary fibroblasts during 1 month.

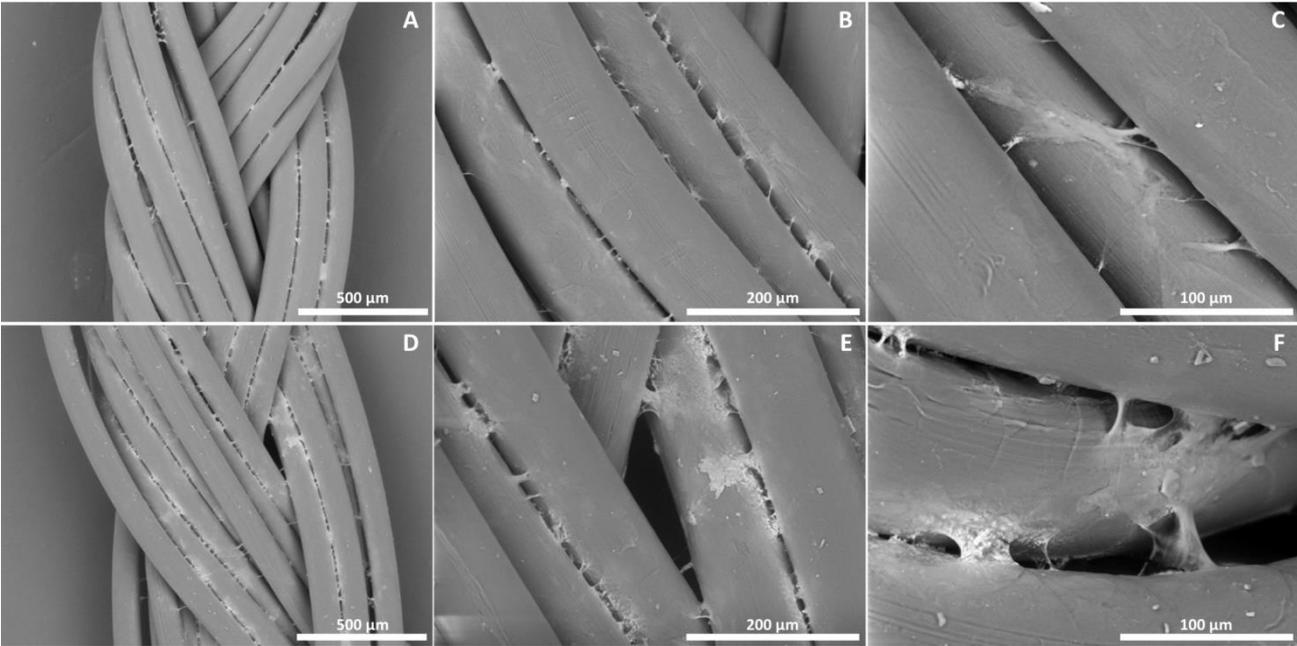


Figure 98 : ESEM images of ungrafted (A, B,C) and grafted (D,E,F) braided prototypes cultured with primary fibroblasts during 1 month.

With the free fibers prototypes, we can see that the cells mainly grow between the fibers and that there are quite separated one from each other (see Fig.97). The ungrafted free fibers prototype presents fewer cells than the pNaSS grafted one (see Fig.97.B and 97.E) and the cells are better spread with the pNaSS grafting (see Fig.97.C and 97.F).

The ESEM images suggest that there are more cells that have grown onto the braided prototypes when compared to the free fibers prototypes (see Fig.97.A and 98.A). Moreover, with the braided prototypes, the cells also grow between the fibers but they seem to be more inter-connected starting to form a cellular network. This fact is clearly enhanced by the presence of the pNaSS grafting (see Fig.98.C and 98.F). When we compare the ungrafted and the grafted braided prototypes, it can be observed that there are numerically more cells with the pNaSS is present on the fibers (see Fig.98.A and 98.D); in addition cells are better spread and they started to coat the fibers all around (see Fig.98.C and 98.F).

In vivo assay

Clinical evidences

The day after the implantation, the rat was clearly using its limb, no evidence of lameness was noted during the implantation period. After one month, the 360g-female Sprague-Dawley rat was sacrificed. The rat was weighted and an increase of 15g was noticed. The observation of the animal showed a slight swelling of the implanted paw with respect to the opposite limb, accompanied by a slight edema but without any sign of inflammation (see Fig.99). The range of motion of the joint was normal, with good flexion and good extension, and with no anterior drawer. The joint was exposed and the implanted pNaSS-grafted braided prototype was explanted. The prototype was difficult to withdraw because of its good stability and anchorage in the osseous tunnels.

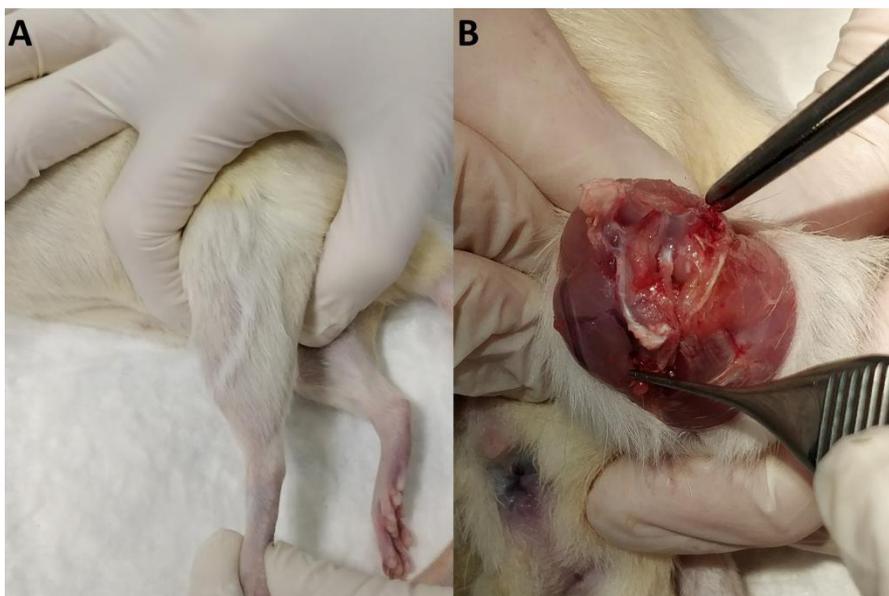


Figure 99 : implanted limb of the rat (A) and prototype implanted (B) after 1 month

Explant observations

After cells and tissue fixation, the braided prototype was observed with ESEM. After 1 month implantation, we can see that the prototype has been recolonized by tissue (see Fig. 100). The recolonization is more important in the osseous part compared to the intra-articular part (see Fig.100.A and 100.C), probably thanks to the close proximity of cells. In both intra articular and osseous parts, the fibers are well surrounded by tissue. The image of the cross section of the prototype (see Fig.100.B) shows the presence of tissue between the fibers confirming the good integration of the pNaSS-grafted braided prototype in the articulation.

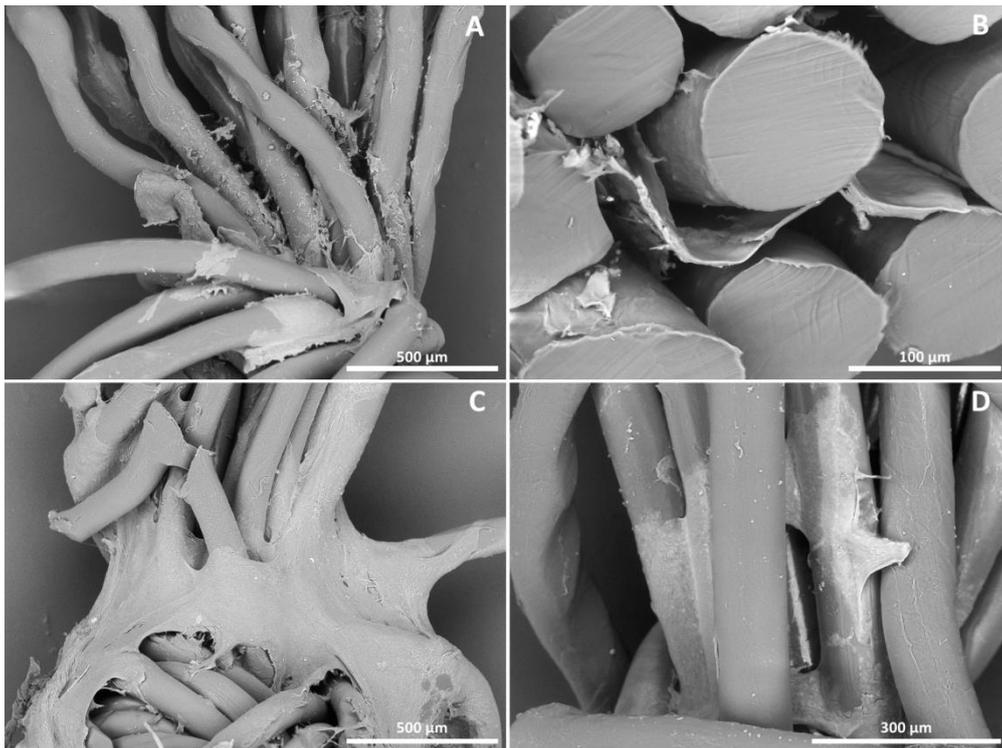


Figure 100 : ESEM images of the pNaSS-grafted braided prototype. A and B present the intra-articular part; C and D focus on the intra-osseous part.

Discussion

Based on the literature, two types of prototypes were designed in order to find the best structure for the reconstruction of the anterior cruciate ligament in the rat model: (1) a free fibers prototype clearly inspired by the LARS ligament[73] and (2) a braided prototype which is an option that several scientists try to explore[26], [252].

The covalent grafting of a bioactive polymer –poly(sodium styrene sulfonate) - has been developed by our team onto PCL films and its bioactive effect has already been demonstrated[147]. In this study, it is shown that the grafting process can be extent to fibers structure, with however a slightly better grafting rate onto the braided prototypes.

The mechanical results obtained for both prototypes clearly demonstrate the limit of handmade structure which required knots to stay united. In fact, these knots are going to concentrate stresses

and so weaken the prototypes. The more knots there are, the more fragile is the structure. Moreover, in the case of the reconstruction of ACL in Sprague-Dawley rat, the literature reports a failure load of the native ACL, for rats that weight between 300g and 485g, of 34.5-35.5 N depending of the weight but also of the age of the animal[204], [245]. In our case, it was mechanically safer to choose to implant the PCL braided prototype which can endure a maximal force of 43.3 ± 1.0 N before failure.

The *in vitro* study on both grafted and ungrafted free fibers and braided prototypes was done. The previously described bioactive feature can be found again in a prototype structure with a proliferation enhancement and a more homogenous repartition of cells thanks to the presence of pNaSS. The *in vitro* results demonstrated clearly that the pNaSS-grafted braided prototype is the best candidate for bioactive and biodegradable ligament prosthesis in rat.

Because this study was mainly conducted to evaluate the surgical feasibility to implant anterior cruciate ligament prosthesis in rat before starting an extensive *in vivo* study, only one rat was implanted. According to the previous results, it is obvious that our choice go to the pNaSS-grafted braided prototype. Despite the small size of the animal and the need of very precise material, the prototype was successfully implanted. After one month implantation, good clinical outcomes were noticed with among other no lameness, no inflammation and no anterior drawer. Finally, the observation of the explanted prototype demonstrates the potential of this implant which has been recolonized both at the intra-osseous and intra-articular level and around and along the fibers.

Conclusion

This study validates the feasibility to implant a bioactive and a biodegradable ligament to replace the anterior cruciate ligament in the rat model, at least at the short-term. Our future works are going to be concentrated to design a braided or knitted structure that does not imply the use of knots and that can be standardized. Once this new structure will be operational, the implantation of numerous rats in the context of an extensive *in vivo* study, which will compare the grafted and the ungrafted prosthesis, will be conducted.

Acknowledgments

The authors would like to thank Jade Chura for technical help in the mechanical part and Herbert Debreuck from Luxilon Industries NV for providing PCL fibers. This work was funded as part of the "Future Investment Project" by the French Public Investment Bank and the French state - PSPC application - Liga2bio project.

V-Partie 3 : essais *in vivo*

Les études préliminaires ayant été positivement concluantes, une étude *in vivo* sur 21 rats a été réalisée par Emeline Maurice et le Pr Véronique Viateau à l'école nationale vétérinaire de Maisons-Alfort (ENVA). Les rats implantés ont été obtenus auprès d'un fournisseur agréé (Janvier Labs, Saint Berthevin) et étaient des femelles Wistar adultes âgées de 37 semaines pesant environ 350g. Trois groupes de 7 rats ont été constitués de façon aléatoire et ont été soit opérés pour réaliser une autogreffe ligamentaire après résection du LCCr (groupe AG), soit implantés avec une prothèse ligamentaire en PCL non greffée (groupe PCL NG), soit implantés avec une prothèse ligamentaire en PCL greffée de pNaSS (groupe PCL G) (cf. Tableau 27).

Groupe (effectif)	Description	Intérêt
AG (n=7 rats)	Section du LCCr et mise en place d'une autogreffe (tendon fléchisseur profond des doigts)	Groupe témoin. Evaluation de la technique de référence.
PCL NG (n=7 rats)	Section du LCCr et mise en place du ligament synthétique non greffé	Evaluation du ligament synthétique.
PCL G (n=7 rats)	Section du LCCr et mise en place du ligament synthétique greffé	Evaluation de l'effet du greffage sur le ligament synthétique.

Tableau 27 : Description des différents groupes étudiés

L'étude de faisabilité préalablement réalisée, ainsi qu'un essai sur pièce cadavérique, ont permis de mettre au point la technique opératoire représentée en Figure 101.

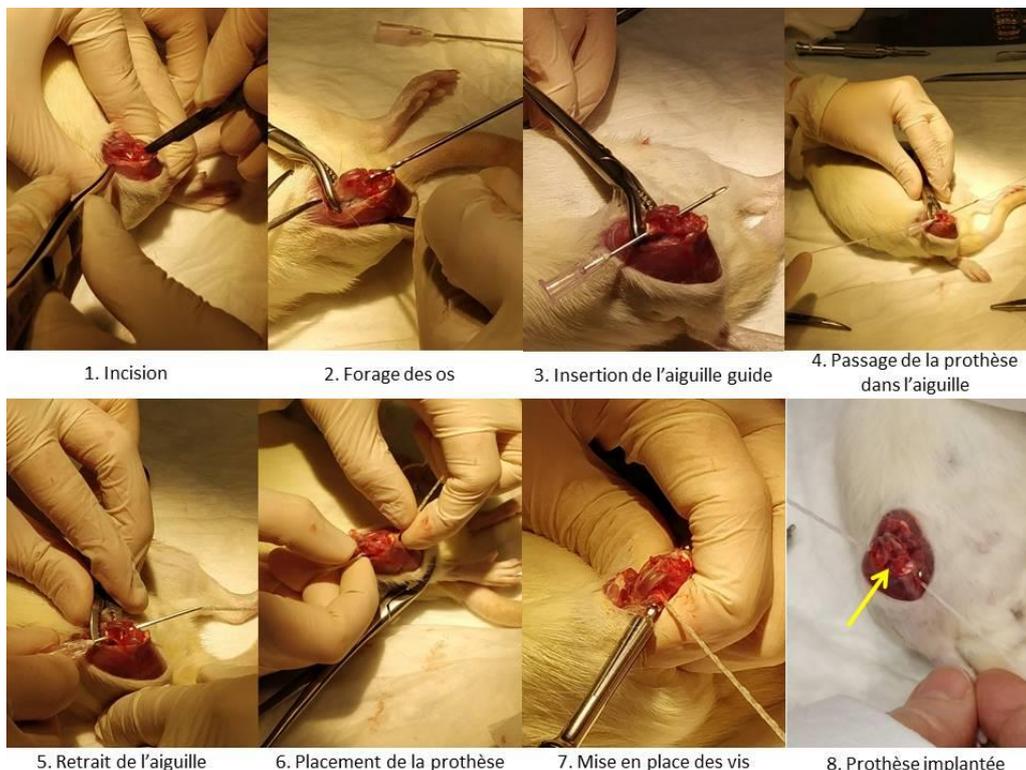


Figure 101 : Technique opératoire employée pour l'implantation des implants ligamentaires chez le rat

Afin de faciliter la pose de l'implant ligamentaire en le fragilisant le moins possible, une aiguille guide de 18 gauge (diamètre de 1,2 mm) a été utilisée. À partir de l'ensemble des données recueillies, la société Texinov MDB™ – partenaire du projet LIGA2BIO - spécialisée dans la réalisation de textile médical, a élaboré à une échelle industrielle, des implants ligamentaires pour les essais *in vivo* chez le rat (cf. Fig.102). La réalisation de ces implants a consisté au tricotage de 26 fils de PCL, ce nombre a été déterminé à partir des essais préliminaires, du diamètre limitant de l'aiguille guide et de la faisabilité technique à l'échelle industrielle. On notera que pour ces implants ligamentaires, les fils de PCL ne sont pas parallèles, ce qui augmente la section de la prothèse et de fait limite le nombre de fils.

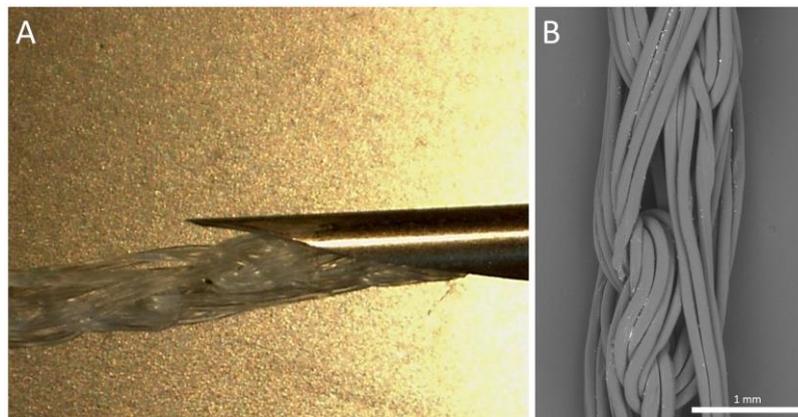


Figure 102 : Ligament prothétique pour le rat (A) photographie de l'implant entrant dans l'aiguille guide ; (B) observation par MEB de l'implant montrant sa structure tricotée

Ces ligaments synthétiques en PCL ont ensuite été greffés de pNaSS par greffage radicalaire amorcé par voie thermique (1h à 45°C) au CSPBAT-LPBS, puis implantés par l'équipe vétérinaire de l'ENVA à Maisons-Alfort. Après 3 mois d'implantation, l'évaluation des prothèses ligamentaires a été réalisée par Emeline Maurice et le Pr Véronique Viateau grâce :

- au **suivi clinique post-opératoire** des rats : état général, boiterie, laxité articulaire, amplitude de flexion/extension, inflammation de la plaie, gonflement articulaire ;
- à l'**imagerie IRM** : intégrité de la prothèse ;
- à l'**analyse tomодensitométrique** : formation d'arthrose, diamètre des tunnels osseux ;
- à l'**histologie** : avec l'analyse de la réponse inflammatoire (épaisseur de la membrane synoviale, fibrose du coussinet adipeux, lésions du cartilage articulaire) et de la recolonisation tissulaire (cellularité, vascularisation, organisation des fibres de collagène) ;
- à la **biologie moléculaire** : marqueurs de l'inflammation et de la recolonisation tissulaire (analyses réalisées par le laboratoire de Biologie du Développement de l'UPMC – équipe du Dr D. Duprez).

Pour l'étude de biologie moléculaire, uniquement la partie intra articulaire du ligament a été prélevée en conditions d'asepsie stricte, côté opéré et côté sain pour 2 rats par groupe. Pour

l'ensemble des autres analyses les membres postérieurs des rats (5 rats par groupe) ont été décharnés en prenant la précaution de maintenir la capsule articulaire intacte. Les deux grassetts (portion distale du fémur, proximale du tibia, articulation, capsule articulaire, rotule) ont été prélevés et conservés dans du formol à 10% jusqu'à analyse.

V.3.1. Suivi clinique post-opératoire

Dès le lendemain de l'intervention, l'ensemble des rats ont retrouvé une bonne récupération fonctionnelle avec un appui sur le membre opéré, ainsi qu'une activité et une alimentation normales et ce jusqu'au sacrifice. Concernant l'aspect des plaies, seuls deux rats du groupe PCL G ont présenté une inflammation locale de la plaie, qui s'est résolue en 3 à 4 jours. Six rats du groupe AG avaient un œdème en région distale du membre opéré, qui a diminué progressivement jusqu'à disparaître complètement à 15 jours post-opératoires. Toutes les plaies étaient cicatrisées après 15 jours chez tous les animaux. La courbe pondérale était similaire pour les 3 groupes, avec une légère diminution du poids entre l'opération et jusqu'à un mois (résultat également observé précédemment lors de l'implantation sur le rat « pilote ») puis une remontée progressive jusqu'à atteindre le poids de départ et une stabilisation après 2 mois d'implantation et ce jusqu'au sacrifice.

Après 3 mois d'implantation, l'observation des mouvements des rats dans leur cage a mis en évidence une absence de boiterie chez les rats du groupe AG ; 1 boiterie discrète chez un rat du groupe PCL NG et chez 2 rats du groupe PCL G (cf. Fig.103A). La laxité articulaire a été évaluée par le test du tiroir antérieur, les résultats ont montré une laxité chez 3 rats du groupe AG ; chez 5 rats du groupe PCL NG et chez 4 rats du groupe PCL G (cf. Fig.103B). Enfin, l'amplitude de mouvement de flexion/extension a été évaluée par rapport au membre controlatéral non opéré. Cette amplitude était diminuée après 3 mois d'implantation pour 2 rats du groupe AG ; 4 rats du groupe PCL NG et 1 rat du groupe PCL G (cf. Fig.103C). Il est important de souligner que l'amplitude de mobilisation était plus proche de la normale chez les rats du groupe PCL G.

Compte tenu du faible nombre d'animaux par groupe, les tests statistiques réalisés n'ont révélé aucune différence significative entre les groupes pour l'ensemble de ces observations.

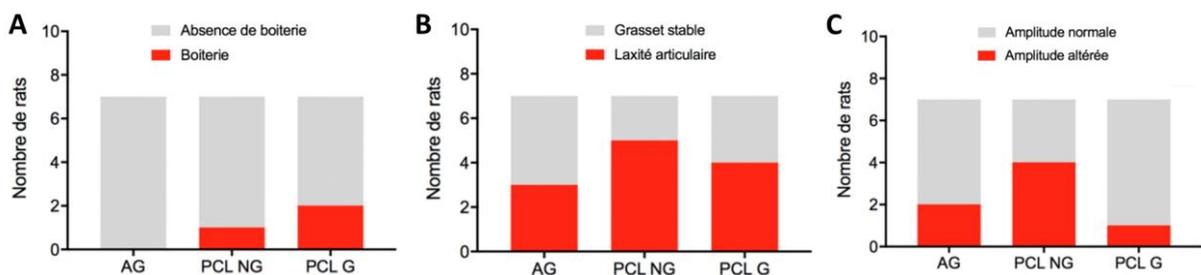


Figure 103 : observations cliniques après 3 mois d'implantation (A) de la boiterie de l'animal ; (B) de la laxité articulaire ; (C) de l'amplitude de mouvement

V.3.2. Résultats tomодensitométriques

La densité minérale osseuse et la microarchitecture trabéculaire de l'os sont fréquemment utilisés en clinique et en expérimentation animale pour évaluer la solidité osseuse [252]–[255]

. Le traitement chirurgical des ruptures du LCA est en effet associé à une ostéoporose péri-articulaire résultant d'un défaut d'utilisation du membre en post-opératoire et potentiellement de l'acte chirurgical en lui-même. La mesure de la densité minérale osseuse et l'étude de la microarchitecture osseuse ont été réalisées en considérant la rotule dans son intégralité comme région d'intérêt car il s'agit d'une composante intégrante de l'articulation, mise en jeu à chaque mouvement de celle-ci, sur laquelle aucune intervention chirurgicale délabrante n'a été effectuée.

Les résultats obtenus ont montré que le rapport de l'épaisseur trabéculaire de l'os de l'articulation opérée sur celui de l'os de l'articulation non opérée, tout comme le rapport de volume osseux sur le volume total, des rotules des membres opérés par rapport aux membres non opérés étaient similaires pour les 3 groupes et proche de 1, l'opération n'a donc pas conduit à une perte osseuse dimensionnelle après 3 mois d'implantation (cf. Fig.104A et 104B). Toutefois, le rapport de densité minérale osseuse entre membres opérés et membres sains a été trouvé inférieur à 1 sans différence entre les groupes (cf. Fig.104C). Ce rapport était compris entre 0,90 et 0,95, laissant supposer une légère perte de densité osseuse liée à l'opération et non au type de reconstruction employée.

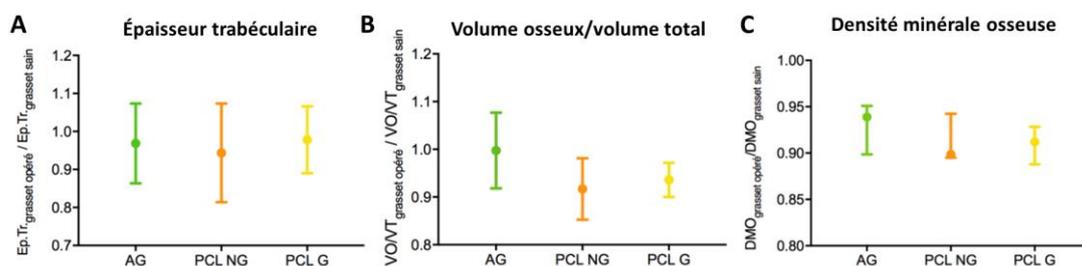


Figure 104 : résultats de tomодensitométrie de (A) l'épaisseur trabéculaire ; (B) le volume osseux/volume total ; (C) la densité minérale osseuse

Le diamètre des tunnels osseux a été évalué. Les valeurs témoins au moment de l'implantation étaient de 1931 μm pour le tunnel fémoral et de 1684 μm pour le diamètre tibial. Après 3 mois d'implantation, pour l'ensemble des groupes, on observe un léger élargissement des tunnels osseux, non significatif pour le tunnel fémoral mais plus important pour le tunnel tibial (cf. Fig.105A et 105B). Les diamètres des tunnels tibiaux mesurés pour les rats du groupe PCL G étaient plus proches de ceux du témoin sain que les 2 autres groupes, et de manière significative par rapport au groupe PCL NG.

Enfin, un score arthrosique a été établi sur la base de la présence ou non d'ostéophytes, de l'affaissement du plateau sous chondrale et de la présence ou non de kystes osseux. Les résultats

obtenus sont similaires entre les groupes mais une tendance à un score arthrosique moindre semble se dégager pour le groupe PCL G avec une valeur moyenne de $1,924 \pm 0,49$ contre $2,301 \pm 0,52$ pour le groupe AG et $2,28 \pm 0,57$ pour le groupe PCL NG (cf.Fig.105C). Le greffage de pNaSS et la présence des groupements sulfonate pourrait donc avoir un effet bénéfique sur la composante arthrosique.

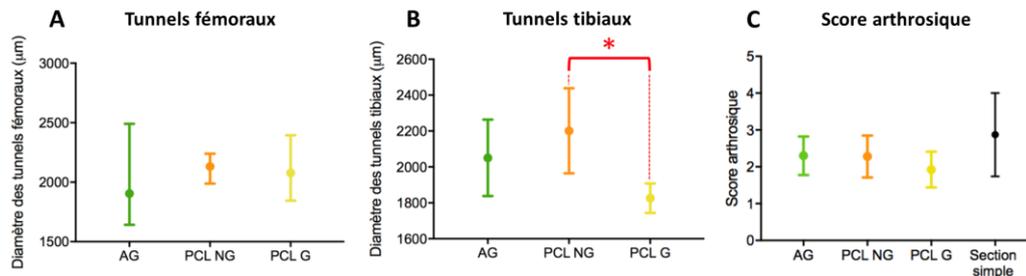


Figure 105 : résultats de tomodynamométrie du diamètres des tunnels fémoraux (A), des tunnels tibiaux (B) et score arthrosique (C)

V.3.3. Résultats IRM

Il a été observé par analyse IRM, que les fibres de PCL émettaient un signal fortement hypointense en séquence FISP et étaient facilement visualisables de manière individuelle, permettant une caractérisation complète et non destructive de l'intégralité de la prothèse (cf. Fig.106A et 106B). Il est important de noter qu'il était plus difficile de caractériser l'intégralité des autogreffes que celle des ligaments de PCL, et des ruptures partielles ont donc pu être négligées pour le groupe AG. L'analyse IRM de l'intégrité des prothèses ligamentaires après 3 mois d'implantation chez le rat a ainsi permis d'observer une répartition quasi-homogène du nombre de prothèses intègres entre les groupes (cf. Fig.106C) :

- Pour le groupe AG : 3 prothèses ont été jugées intègres, 1 totalement rompue et 1 partiellement rompue à plus de 50% ;
- Pour le groupe PCL NG : 2 prothèses ont été jugées intègres, 2 partiellement rompues, 1 à moins de 50% et 1 à plus de 50% ;
- Pour le groupe PCL G : 3 prothèses ont été jugées intègres et 2 partiellement rompues à plus de 50%.

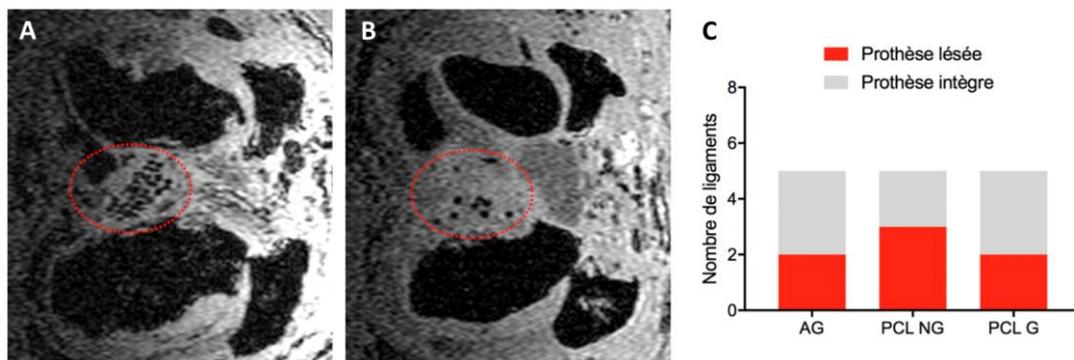


Figure 106 : Images IRM en séquence FISP et en coupes axiales de ligaments en PCL (A) intact (cercle rouge) et (B) rompu à plus de 50% (cercle rouge) ; (C) comparaison du nombre de ruptures de prothèse en fonction des groupes

V.3.4. Résultats histologiques

L'analyse des coupes histologiques a permis d'observer les éléments suivants dans la **partie intra-osseuse** de la zone d'implantation (cf. Fig.107) :

- Sur l'ensemble des coupes et quel que soit le groupe, après 3 mois d'implantation, il a été observé la néoformation d'os minéralisé en périphérie du tunnel osseux ;
- Cette minéralisation n'a pas lieu au contact de la prothèse et une résorption osseuse a même été observée en périphérie des tunnels osseux sur la majorité des coupes et cela pour l'ensemble des groupes, ce qui corrèle avec l'élargissement des diamètres des tunnels ;
- Entre les fibres du ligament synthétique, indépendamment du caractère greffé ou non, une colonisation de tissu fibreux a été observée ;
- Une interface fibreuse d'épaisseur variable entre la prothèse synthétique et la périphérie du tunnel osseux a été observée.

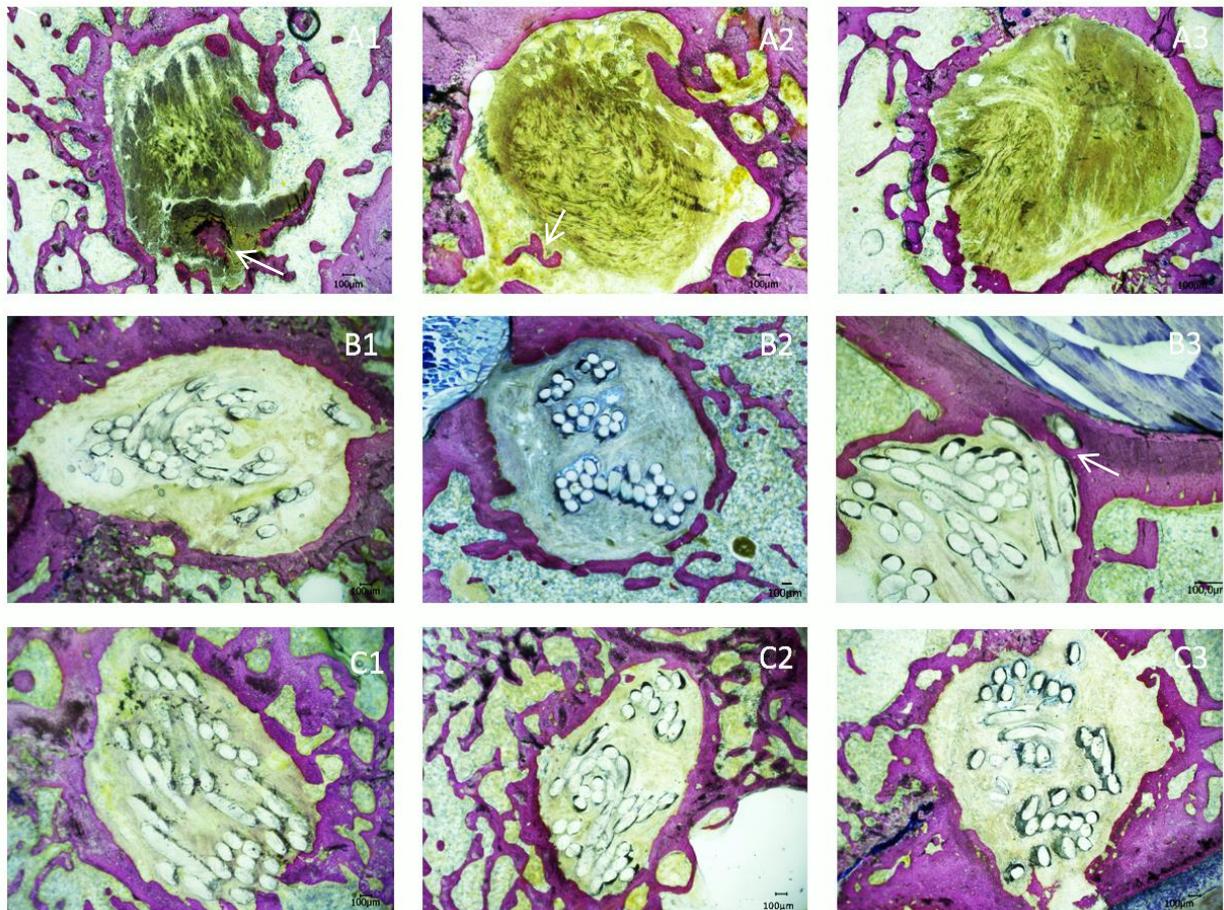


Figure 107 : Coupes histologiques en site intra-osseux sur 3 animaux différents par groupe

(A1, A2, A3) : Coupes transversales intra-osseuses pour le groupe AG. Noter la présence de minéralisation au sein de l'autogreffe sur les coupes A1 et A2 (flèches).

(B1, B2, B3) : Coupes transversales intra-osseuses pour le groupe PCL NG. Noter l'importante interposition de tissu fibreux sur la plupart des coupes. Sur quelques rares coupes, la proximité des fibres de PCL et de l'os néoformé sur la coupe B3, avec ostéointégration complète de l'une d'entre elle peut être néanmoins notée (flèche).

(C1, C2, C3) : Coupes transversales intra-osseuses pour le groupe PCL G. Noter la proximité des fibres de PCL greffées avec l'os néoformé sur les coupes C1 et C2 et dans une moindre mesure sur la coupe C3. L'interposition fibreuse, non quantifiable de manière reproductible semble sur la plupart des coupes inférieure à celle observée pour les PCL non greffées.

Concernant la recolonisation tissulaire en site **intra articulaire**, on note (cf. Fig.108) :

- Une colonisation des espaces situés entre les fibres du ligament synthétique par du tissu fibreux, qui semblait similaire quel que soit le niveau de coupe et le caractère greffé ou non.
- Une proximité du ligament natif aux fibres du ligament artificiel, notamment pour certaines coupes du groupe PCL G où les fibres de PCL sont en contact direct avec celui-ci.

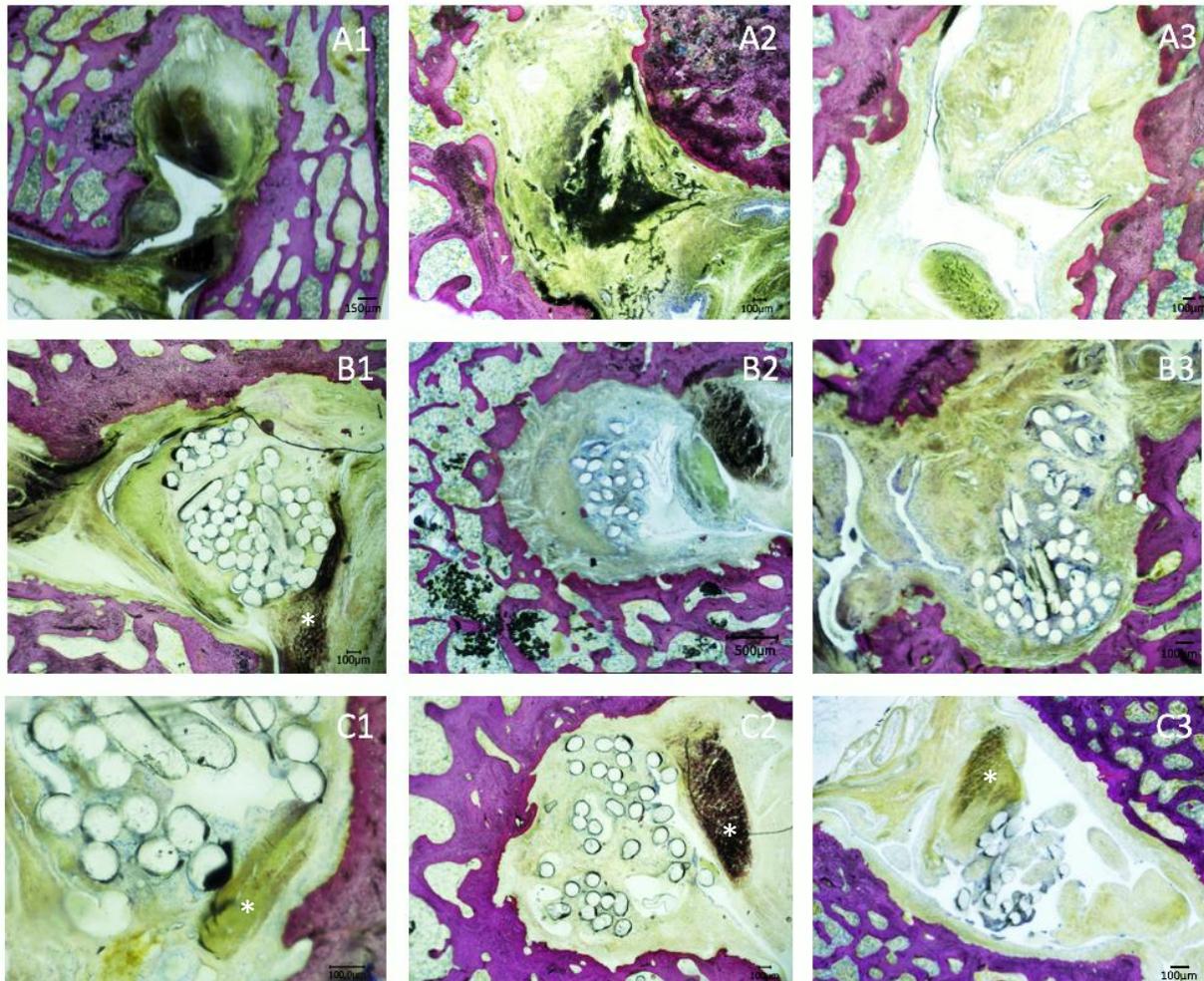


Figure 108 : Coupes histologiques en site intra articulaire sur 3 animaux différents par groupe
(A1, A2, A3) : Coupes transversales intra articulaires (sortie du tunnel tibial) représentatives pour le groupe AG
(B1, B2, B3) : Coupes transversales intra articulaires (sortie du tunnel tibial) représentatives pour le groupe PCL NG. Noter la colonisation par du tissu fibreux des espaces entre les fibres de PCL et la proximité de ces dernières avec le ligament croisé (étoile) sur la coupe B1.
(C1, C2, C3) : Coupes transversales intra articulaires (sortie du tunnel tibial) représentatives pour le groupe PCL G. Noter la colonisation par du tissu fibreux des espaces entre les fibres de PCL et la proximité de ces dernières avec le ligament croisé (étoile) sur les 3 coupes.

À partir de l'ensemble de ces observations histologiques, la cellularité, la vascularisation et l'organisation des fibres de collagènes ont été étudiées en partie intra-osseuse et intra articulaire. Il est à noter que l'analyse de la cellularité n'a été réalisée que de manière semi-quantitative, avec une impossibilité de distinguer précisément les différents types cellulaires et notamment de différencier les populations mononuclées et fibroblastiques.

Toutefois, il a été observé qu'en site intra-osseux, la cellularité des 3 groupes était significativement différente avec une augmentation du nombre de cellules entre le groupe AG et le groupe PCL NG (cf.

Fig.109). Bien qu'en moyenne plus élevée pour le groupe PCL G, la cellularité de ce groupe n'était pas significativement différente du groupe AG (cf. Fig.110A). Des résultats similaires ont observé en site intra articulaire, bien que non significatif (cf. Fig.110D).

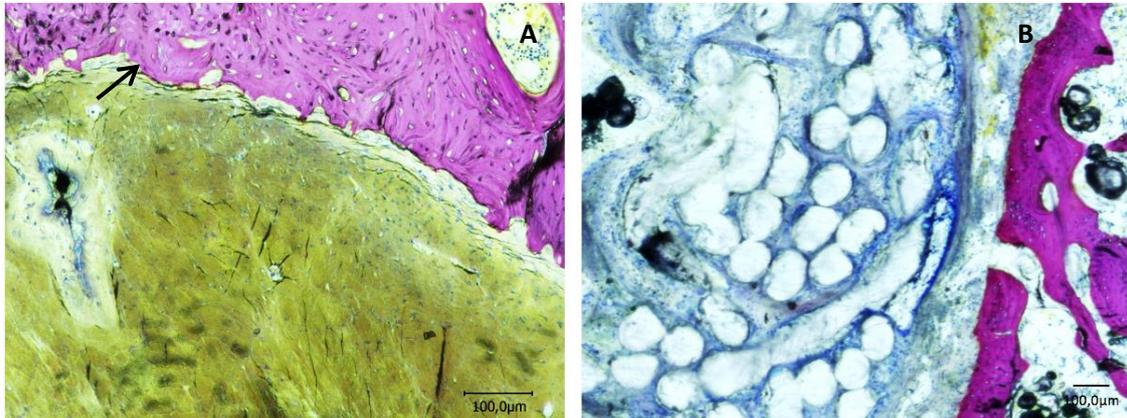


Figure 109 : Coupes histologiques intra-osseuses montrant la cellularité plus importante (noyaux colorés en bleu) pour le ligament synthétique (B) que pour l'autogreffe (A). Noter également la résorption osseuse au contact de l'autogreffe (flèche noire).

La vascularisation des tissus a été trouvée similaire entre les 3 groupes aussi bien dans la partie intra-osseuse que dans la partie intra articulaire (cf. Fig.110B et 110E). Enfin, l'organisation des fibres de collagène a été évaluée en fonction de leur fragmentation, de leur calibre et de leur parallélisme. En localisation intra articulaire, aucune différence n'a été notée entre les différents groupes (cf. Fig.110F). En site intra-osseux, bien qu'aucune différence statistique n'ait été relevée, les fibres ont une tendance à une meilleure organisation pour le groupe PCL G (cf. Fig.110C). Le greffage de pNaSS semble donc contribuer à une meilleure organisation des fibres de collagène en site intra-osseux.

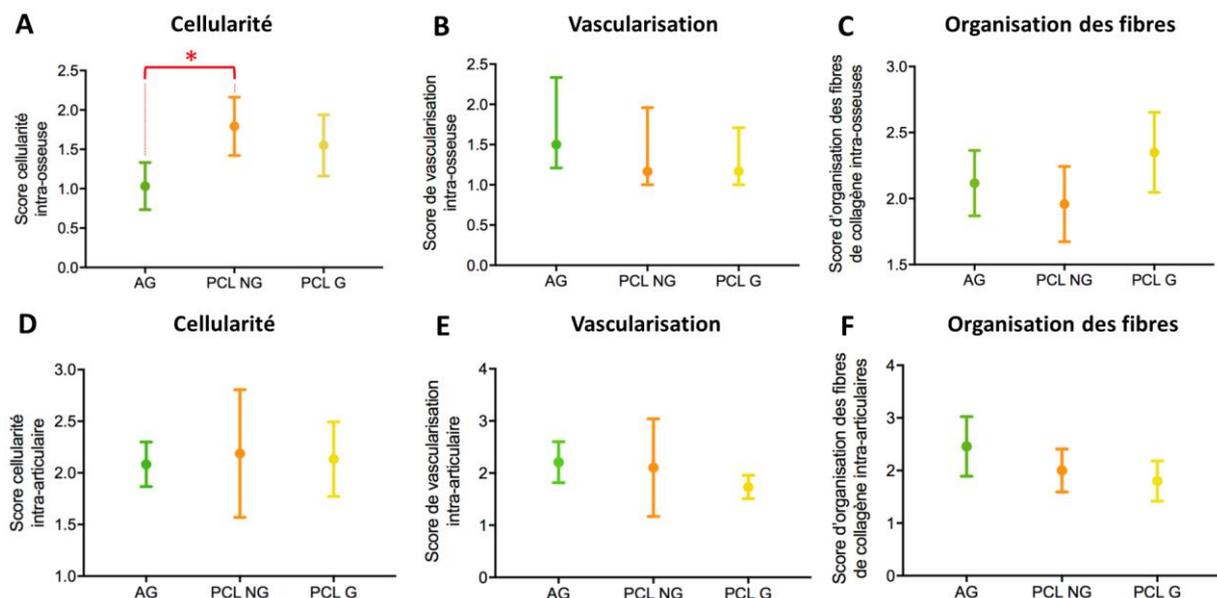


Figure 110 : évaluation de la cellularité (A et D), de la vascularisation (B et E) et de l'organisation des fibres de collagènes (C et F) d'après des coupes histologiques réalisées en zone intra-osseuse (A,B et C) et intra articulaire (D,E et F).

Enfin, la réponse inflammatoire locale a été observée au travers de l'épaisseur de la membrane synoviale et du nombre de cellules géantes.

Un épaissement des membranes synoviales a été observé sur l'ensemble des coupes des grassetts opérés par rapport aux grassetts sains, et ce, quel que soit le groupe. Cependant, l'épaisseur des membranes synoviales est significativement diminuée pour le groupe PCL G par rapport au groupe AG (cf. Fig.111A). Or, toute agression articulaire inflammatoire, mécanique ou infectieuse, va engendrer des modifications de la membrane synoviale (synovite), illustrées histologiquement par une hyperplasie cellulaire, une infiltration inflammatoire, une fibrose et une augmentation de la vascularisation, donc un épaissement global de la membrane synoviale. D'après ces résultats, le ligament en PCL greffée offre donc un bénéfice sur la survenue de synovite par rapport à l'autogreffe.

La présence de cellules géantes a été observée sur presque toutes les coupes au contact du renfort ligamentaire (autogreffe ou ligament synthétique), tous groupes confondus. Seules quelques rares coupes de grassetts du groupe AG en étaient dépourvues engendrant une différence significative de la cellularité en site intra-osseux pour le groupe AG par rapport aux groupes PCL (cf.Fig.111B). Bien qu'en moyenne, il y avait moins de cellules géantes en site intra articulaire pour le groupe AG, aucune différence statistique n'a été trouvée entre les groupes en site intra articulaire (cf.Fig.111C). De manière globale, cette augmentation de cellularité peut s'expliquer par la nature synthétique du matériau.

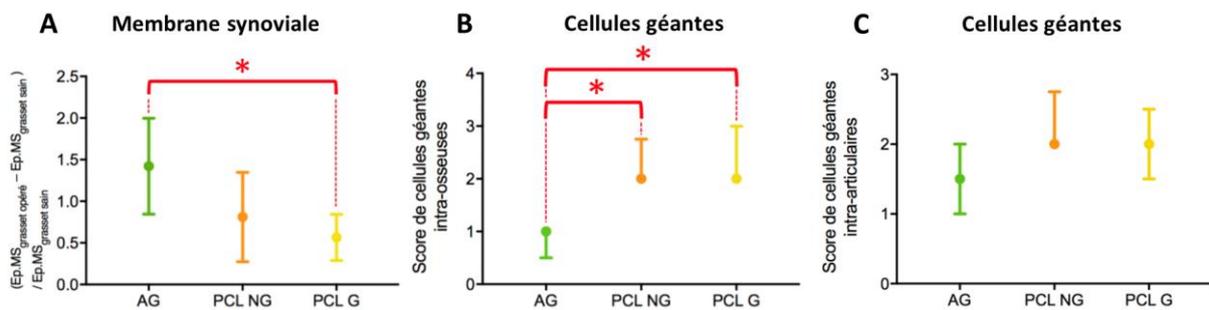


Figure 111 : étude de la réponse inflammatoire locale pour les 3 groupes étudiés avec l'épaisseur de la membrane synoviale (A) ; le score de cellules géantes en site intra-osseux (B) et le score de cellules géantes en site intra-articulaire (C)

L'ensemble de ces résultats histologiques nous permettent de conclure que le ligament en PCL greffée montre des résultats similaires à l'autogreffe en termes de biocompatibilité et de recolonisation tissulaire pour ce qui est de la vascularisation, de l'organisation des fibres de collagène et de la cellularité (surtout en site intra articulaire). De plus, aucune réaction inflammatoire locale ou systémique invalidante n'est à déplorer pour les animaux du groupe PCL G. Il a également été noté que les lésions cartilagineuses étaient moins importantes pour le groupe PCL G que pour les deux autres groupes. Le greffage permettrait également possiblement de préserver le cartilage.

V.3.5. Résultats de biologie moléculaire

Des analyses de biologie moléculaire ont été réalisées sur les cellules collectées et isolées au niveau intra articulaire de la reconstruction afin d'étudier leur bioactivité. Malheureusement, un nombre trop faible de cellules pour le groupe PCL NG ayant été récupéré, ces analyses n'ont pas pu être réalisées pour ce groupe.

Les gènes scleraxis (Scx) et tenomoduline (Tnmd) ont été étudiés en tant que marqueur spécifique de la lignée ligamentaire. Les résultats obtenus n'ont montré aucune différence dans l'expression de ces gènes entre les cellules du ligament sain et les cellules du groupe PCL G. Les deux gènes étaient légèrement diminués par rapport au témoin pour le groupe AG (cf. Fig.112A).

Les gènes du collagène de type I et de type III ont été étudiés en tant que marqueurs de la reconstruction tissulaire. Les résultats obtenus ont mis en évidence une surexpression de ces gènes pour le groupe AG et le groupe PCL G démontrant bien une activation des fibroblastes en vue d'une reconstruction tissulaire dans les deux cas (cf. Fig.112B).

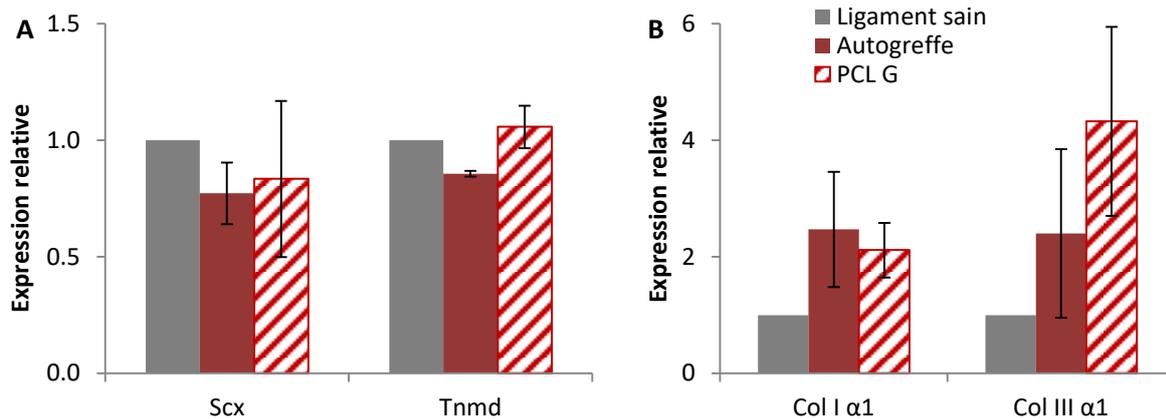


Figure 112 : Expressions géniques des marqueurs spécifiques de la lignée ligamentaire (A) ; et des marqueurs de reconstruction tissulaire (B).

Au-delà de la sécrétion collagénique en elle-même, de nombreuses molécules participent au remodelage tissulaire et notamment les métalloprotéases matricielles. Cette famille de protéases a pour rôle de dégrader les composants matriciels afin de renouveler la matrice extracellulaire. Dans notre cas précis, les collagénases MMP-1 et MMP-13 ont été étudiées car impliquées dans la dégradation du collagène de type I et de type III respectivement. Les MMPs sont également impliquées dans la modulation de la réponse inflammatoire : en effet, ces protéases vont stimuler l'inflammation par le clivage de la forme latente de l'interleukine 1 β (IL-1 β) qui se retrouve activée. Le gène de cette interleukine a ainsi été également étudié.

Pour le groupe AG, les résultats obtenus étaient légèrement plus faibles que ceux du groupe témoin en ce qui concerne les 3 gènes (MMP-1, MMP-3 et IL-1 β) (cf. Fig.113A). Pour le groupe PCL G, l'expression du gène MMP-1 était augmentée, avec cependant un très grand écart-type sur la valeur ;

l'expression de MMP-13 était similaire à celle du groupe témoin et le gène IL-1 β était légèrement sous-exprimé. En corrélation avec l'expression des gènes des collagènes précédemment observée, on peut en déduire que le remodelage tissulaire était bien en cours pour les deux groupes, sans augmentation particulière de la réponse inflammatoire.

Enfin, l'expression génique de la fibronectine (Fn), protéine de liaison cellules-matrice extracellulaire, a été étudiée. Les résultats ont montré une impressionnante augmentation de l'expression de la Fn sur les cellules du groupe PCL G (valeur de $30,8 \pm 11,4$) et ce après 3 mois d'implantation. Ce gène était également augmenté dans le cas du groupe AG mais pas de manière aussi significative (valeur de $5,2 \pm 2,7$) (cf.Fig.113B). Cette forte augmentation du gène Fn démontre un lien fort entre les cellules et la matrice, indispensable au remodelage tissulaire.

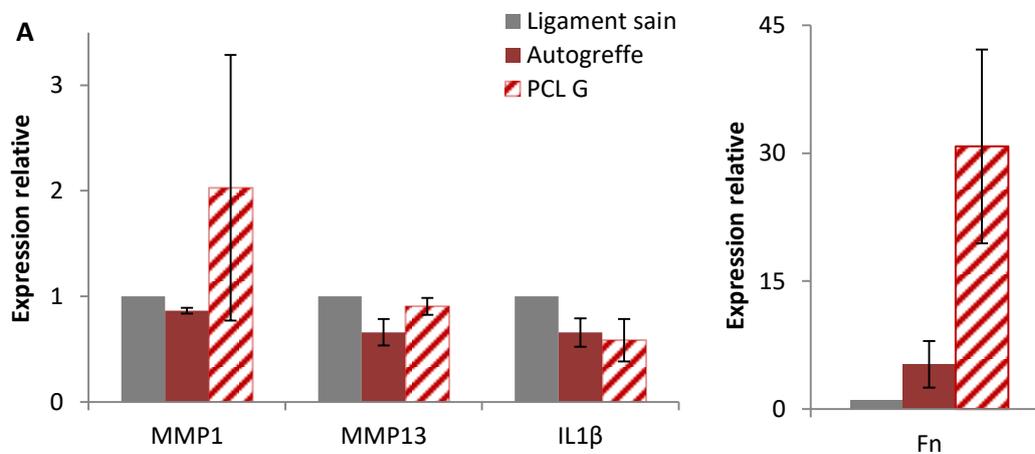


Figure 113 : Expressions géniques des métalloprotéases et IL-1 β (A) ; et du gène de la Fn (B).

En conclusion de cette étude *in vivo*, les résultats obtenus avec ce modèle original de renfort ligamentaire chez le rat étaient en adéquation avec ceux préalablement obtenus *in vitro* confirmant ainsi l'intérêt du greffage de la PCL par le pNaSS dans le cadre d'une réhabilitation ligamentaire. En effet, les résultats ont montré que **ce nouveau ligament synthétique de PCL greffé de pNaSS était au moins aussi performant que l'autogreffe sur le plan fonctionnel**. Par ailleurs, **des effets bénéfiques du greffage sur l'inflammation articulaire, l'arthrose post-opératoire ainsi que sur la recolonisation tissulaire** ont été observés. Afin de confirmer ces premiers résultats *in vivo*, et à cause d'un certain nombre de limites inhérentes à ce modèle, notamment la petite taille des animaux, ces résultats seront à confirmer dans un modèle de meilleure pertinence clinique, la brebis, avant une éventuelle application clinique.

Conclusion générale

Ces travaux de thèse s'articulent autour d'un objectif commun, le développement d'un implant ligamentaire bioactif et biodégradable. Pour ce faire, le choix d'un matériau biodégradable adapté, la polycaprolactone (PCL); l'étude de ses propriétés à la fois physico-chimiques, mécaniques et biologiques ; sa fonctionnalisation par un polymère bioactif, le pNaSS ; l'étude de l'impact de cette fonctionnalisation sur ces mêmes propriétés ; l'influence du procédé de greffage sur les mécanismes de dégradation ainsi que des premiers essais *in vivo* chez le rat ont été réalisés.

Au travers du premier chapitre qui porte sur l'état de l'art des prothèses ligamentaires, nous avons pu comprendre :

- (i) que le modèle de reconstruction du ligament croisé antérieur était le plus « challengeant » de par sa difficulté d'auto-cicatrisation liée à sa faible vascularisation ;
- (ii) que le « gold standard » actuel qui consiste en une autogreffe présente des inconvénients ;
- (iii) que la proposition d'un ligament synthétique n'est pas nouvelle mais que les solutions proposées posent des problèmes de biocompatibilité, de résistance mécanique et/ou de bio-intégration ;
- (iv) que la recherche actuelle se tourne désormais vers le développement de structure permettant de remplacer et de régénérer les tissus ligamentaires ce qui nécessite des connaissances interdisciplinaires en chimie, biologie, mécanique et ingénierie.

Compte tenu de cet état, les premiers travaux expérimentaux de recherche de cette thèse, rapportés dans le deuxième chapitre de ce manuscrit, comparent les caractéristiques chimiques et biologiques de deux types de PCL – un grade technique et un grade médical - présentées sous forme de films polymériques. La mise au point du greffage radicalaire du pNaSS sur ces surfaces 2D ayant déjà été développée au sein de l'équipe LBPS du laboratoire CSPBAT, les travaux réalisés ont porté sur l'analyse de la réponse cellulaire précoce sur ces deux types de PCL non greffés et greffés de pNaSS et sur l'étude biologique des mécanismes de fonctionnement de la bioactivité du pNaSS. Les résultats obtenus ont ainsi mis en avant :

- (i) la possibilité de réaliser le greffage de pNaSS à des taux comparables entre les deux types de PCL ;
- (ii) que le greffage radicalaire du pNaSS n'impacte pas les caractéristiques physico-chimiques des films de PCL, même si la PCL de grade médical semble plus sensible ;
- (iii) une absence de cytotoxicité des films de PCL greffés de pNaSS ;
- (iv) un meilleur contrôle de la réponse cellulaire sur la PCL de grade médical avec une absence de réponse inflammatoire ;

- (v) que le greffage de pNaSS à la surface de la PCL favorise la vitesse de croissance, la distribution, la densité, l'étalement cellulaire, la production de facteur de croissance et le maintien de l'expression génique des cellules primaires de brebis ;
- (vi) que la bioactivité du pNaSS est médiée par des interactions cellules/protéines/surface dans lesquelles, pour la PCL spécifiquement, le fibrinogène semble avoir un rôle majeur;
- (vii) que l'emploi simultané du greffage et de la thérapie génique était complexe, probablement à cause de l'activation de mécanismes cellulaires similaires qui créent une compétition entre les deux modes d'actions.

Ces résultats obtenus sur surfaces simples et facilement manipulables – films 2D - nous ont permis d'appréhender les mécanismes de fonctionnement du polymère bioactif greffé en confirmant ainsi une nouvelle fois que la bioactivité induite par le pNaSS est belle et bien liée au polymère en lui-même et non au type de surface sur lequel il est greffé.

Au vu des observations présentées précédemment, le choix final de l'utilisation d'une PCL de grade médical de masse molaire importante ($80 \text{ kg}\cdot\text{mol}^{-1}$) est apparu évidente. Cette matière a ainsi été transformée en fil par la société Luxilon, puis la caractérisation chimique, mécanique et biologique de faisceaux de fils a été conduite. Les résultats obtenus, exposés dans le troisième chapitre, peuvent être résumés comme suit :

- (i) le greffage radicalaire de pNaSS par voie thermique a été étendu de manière reproductible et « efficiente » sur les faisceaux de fils de PCL ;
- (ii) le taux de greffage de pNaSS sur faisceaux de PCL peut être augmenté par un greffage radicalaire amorcé par les rayonnements UV ;
- (iii) les propriétés physico-chimiques de la PCL ne sont pas impactées par le mode de greffage utilisé qu'il soit amorcé par voie thermique ou par voie UV ;
- (iv) les propriétés mécaniques des fils de PCL sont adaptées à une application d'implant ligamentaire et le greffage amorcé par voie thermique peut influencer ces propriétés, notamment en améliorant la déformation élastique des fils de PCL ;
- (v) le désensimage des fils de PCL est indispensable pour une réponse biologique favorable et le protocole de désensimage utilisé n'est pas cytotoxique ;
- (vi) la bioactivité du pNaSS, présentée dans la chapitre II, a été retrouvée sur les faisceaux de PCL notamment en termes d'étalement, de distribution cellulaire et cette fois-ci de prolifération avec un effet dose réponse du greffage sur cette amélioration de réponse biologique.

Le quatrième chapitre de ce manuscrit présente l'étude des mécanismes de dégradation hydrolytique des échantillons de PCL – films et faisceaux – en condition physiologique simulée, c'est-à-dire dans une solution saline de type « sérum physiologique » et à une température de 37°C. La

dégradation de la PCL en elle-même, l'évolution du greffage et l'influence de ce dernier sur le mécanisme de dégradation de la PCL ont été étudiés. Nous avons ainsi pu démontrer que :

- (i) l'hydrolyse naturelle de la PCL a lieu suivant un mode de dégradation dit « en masse » ;
- (ii) la cinétique de dégradation de la PCL est cohérente avec le temps de reconstruction d'un néo-ligament ;
- (iii) les propriétés mécaniques des faisceaux dégradés en condition statique sont encourageantes sur la tenue *in vivo* de la prothèse ;
- (iv) sur le long terme, le greffage de pNaSS accélère la dégradation de la PCL tout en protégeant toutefois la surface d'une perte de masse durant les six premiers mois ;
- (v) le pNaSS greffé est toujours présent à la surface des matériaux après plus de deux ans de dégradation naturelle ;
- (vi) les surfaces de PCL greffées de pNaSS se dégradent naturellement via un mode de dégradation en masse avec une autocatalyse interne ;
- (vii) lorsque soumise aux rayonnements du spectre solaire, en solution saline et à 37°C, la PCL subit une dégradation par érosion de la surface, qui est ralentie en présence de pNaSS greffé qui protège de nouveau la surface d'une perte de masse.

L'ensemble des résultats *in vitro* menés sur des structures relativement simplifiées de films et de faisceaux de PCL greffés de pNaSS ayant été très favorable, un implant ligamentaire synthétique bioactif et biodégradable pour le petit animal, ici le rat, a été développé. Des essais préliminaires de stérilisation et de dimensionnement, des essais de faisabilité d'implantation avec les vétérinaires, ainsi qu'une étude *in vivo* chez un peu plus de 20 rats ont ainsi permis d'observer que :

- (i) la stérilisation à l'oxyde d'éthylène est préférable à la stérilisation β puisqu'elle n'impacte ni les propriétés mécaniques - hormis une légère augmentation de la déformation, qui n'est pas défavorable dans notre cas - ni les propriétés physico-chimiques de la PCL ;
- (ii) les fils de PCL qu'ils soient secs ou humides ont des propriétés mécaniques identiques ;
- (iii) d'un point de vue mécanique, la réduction du temps de polymérisation (1h au lieu de 3h) en greffage par voie thermique ne modifie que la déformation élastique des fils ;
- (iv) la reconstruction ligamentaire du LCA chez le rat est chirurgicalement possible : le prototype de PCL greffé de pNaSS était toujours présent après un mois d'implantation, ce dernier a permis d'induire une colonisation cellulaire, et a constitué un support à la marche du rat ;
- (v) les résultats *in vivo*, en adéquation avec ceux préalablement obtenus *in vitro*, ont montré que le ligament synthétique de PCL greffé de pNaSS, en tant que modèle de renfort

ligamentaire, était aussi performant que l'autogreffe sur le plan fonctionnel après 3 mois d'implantation ;

- (vi) le greffage de pNaSS permet de diminuer l'inflammation articulaire et l'arthrose post-opératoire tout en favorisant la recolonisation tissulaire.

Ainsi, l'ensemble de ces travaux de thèse ont permis de mener à l'élaboration d'un implant ligamentaire bioactif et biodégradable chez le petit animal, tout en étudiant les mécanismes physico-chimiques, mécaniques et biologiques du greffage radicalaire de pNaSS à la surface de la PCL. Les résultats obtenus en termes de mécanisme de dégradation, de tenue mécanique, de bioactivité et de biointégration se sont révélés très prometteurs et encourageants pour la suite du projet Liga2bio.

Toutefois, certains obstacles doivent encore être franchis afin de réaliser la prothèse ligamentaire de 4^{ème} génération chez l'homme, à commencer par le « scale-up » à l'échelle industrielle du procédé de greffage radicalaire du pNaSS. À l'échelle laboratoire, d'autres essais, tels que des essais mécanique de fatigue, des essais en bioréacteur afin d'observer la reconstruction ligamentaire, ou encore des essais de caractérisation de l'impact des produits de dégradation sur l'articulation, permettraient d'approfondir nos connaissances. Enfin, bien que nous ayons maintenant une meilleure compréhension de la partie intra articulaire qui composera notre future prothèse, tout reste à faire sur la partie intra-osseuse. Pour finir, afin de confirmer les premiers résultats *in vivo* obtenus chez le rat, et à cause d'un certain nombre de limites inhérentes au petit animal, ces résultats seront à confirmer dans un modèle de meilleure pertinence clinique, dans un modèle « grand animal », à savoir la brebis, avant une éventuelle application clinique.

References

- [1] M. Marieswaran, I. Jain, B. Garg, V. Sharma, and D. Kalyanasundaram, "A Review on Biomechanics of Anterior Cruciate Ligament and Materials for Reconstruction," *Applied Bionics and Biomechanics*, vol. 2018, pp. 1–14, 2018.
- [2] M. Benjamin' and J. R. Ralphs', "The Cell and Developmental Biology Tendons and Ligaments," p. 46.
- [3] V. P. Eroschenko, *DiFiore's Atlas of Histology with Functional Correlations*. Lippincott Williams & Wilkins, 2008.
- [4] M. M. Murray, E. M. Magarian, S. L. Harrison, A. N. Mastrangelo, D. Zurakowski, and B. C. Fleming, "The Effect of Skeletal Maturity on Functional Healing of the Anterior Cruciate Ligament:," *The Journal of Bone and Joint Surgery-American Volume*, vol. 92, no. 11, pp. 2039–2049, Sep. 2010.
- [5] D. M. Doroski, K. S. Brink, and J. S. Temenoff, "Techniques for biological characterization of tissue-engineered tendon and ligament," *Biomaterials*, vol. 28, no. 2, pp. 187–202, Jan. 2007.
- [6] P. Camelliti, T. Borg, and P. Kohl, "Structural and functional characterisation of cardiac fibroblasts," *Cardiovascular Research*, vol. 65, no. 1, pp. 40–51, Jan. 2005.
- [7] K. Robi, N. Jakob, K. Matevz, and V. Matjaz, "The Physiology of Sports Injuries and Repair Processes," in *Current Issues in Sports and Exercise Medicine*, M. Hamlin, Ed. InTech, 2013.
- [8] J. K. Mouw, G. Ou, and V. M. Weaver, "Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction," *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 12, pp. 771–785, Dec. 2014.
- [9] L. Debelle, "The structures of elastins and their function," *Biochimie*, vol. 81, no. 10, pp. 981–994, Oct. 1999.
- [10] A. Leroy, "Ingénierie tissulaire du ligament: association de copolymères dégradables et de cellules souches mésenchymateuses," Université Montpellier II - Sciences et Techniques du Languedoc, 2013.
- [11] M. Kazemi, Y. Dabiri, and L. P. Li, "Recent Advances in Computational Mechanics of the Human Knee Joint," *Computational and Mathematical Methods in Medicine*, vol. 2013, pp. 1–27, 2013.
- [12] S. Claes, E. Vereecke, M. Maes, J. Victor, P. Verdonk, and J. Bellemans, "Anatomy of the anterolateral ligament of the knee," *J Anat*, vol. 223, no. 4, pp. 321–328, Oct. 2013.
- [13] F. H. Netter, *Atlas of Human Anatomy, Professional Edition E-Book: including NetterReference.com Access with Full Downloadable Image Bank*. Elsevier Health Sciences, 2014.
- [14] N. A. Mall, A. S. Lee, B. J. Cole, and N. N. Verma, "The Functional and Surgical Anatomy of the Anterior Cruciate Ligament," *Operative Techniques in Sports Medicine*, vol. 21, no. 1, pp. 2–9, Mar. 2013.
- [15] T. Jamil, U. Ansari, M. Najabat Ali, and M. Mir, "A Review on Biomechanical and Treatment Aspects Associated with Anterior Cruciate Ligament," *IRBM*, vol. 38, no. 1, pp. 13–25, Feb. 2017.
- [16] J. C. Reid, B. Yonke, and M. Tompkins, "The angle of inclination of the native ACL in the coronal and sagittal planes," *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 25, no. 4, pp. 1101–1105, Apr. 2017.
- [17] R. van Zyl, A.-N. van Schoor, P. du Toit, and E. Louw, "Clinical anatomy of the anterior cruciate ligament and pre-operative prediction of ligament length," *SA Orthopaedic Journal*, vol. 15, no. 4, 2016.
- [18] D. Amiel, C. Frank, F. Harwood, J. Fronek, and W. Akeson, "Tendons and ligaments: A morphological and biochemical comparison," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 1, no. 3, pp. 257–265, 1983.
- [19] T. Zantop, W. Petersen, and F. H. Fu, "Anatomy of the anterior cruciate ligament," *Operative Techniques in Orthopaedics*, vol. 15, no. 1, pp. 20–28, Jan. 2005.
- [20] E. K. Bicer, S. Lustig, E. Servien, T. A. S. Selmi, and P. Neyret, "Current knowledge in the anatomy of the human anterior cruciate ligament," *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 18, no. 8, pp. 1075–1084, Aug. 2010.
- [21] R. Gaillard, B. Shabani, R. Ballis, P. Neyret, and S. Lustig, "Anatomy, Physiology, and Biomechanics of the Native Knee," in *Total Knee Arthroplasty*, Springer, Cham, 2015, pp. 1–25.
- [22] J. A. Dodds and S. P. Arnoczky, "Anatomy of the anterior cruciate ligament: A blueprint for repair and reconstruction," *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 10, no. 2, pp. 132–139, Apr. 1994.
- [23] A. C. Vieira, R. M. Guedes, and A. T. Marques, "Development of ligament tissue biodegradable devices: A review," *Journal of Biomechanics*, vol. 42, no. 15, pp. 2421–2430, Nov. 2009.
- [24] P. Fratzl, K. Misof, I. Zizak, G. Rapp, H. Amenitsch, and S. Bernstorff, "Fibrillar Structure and Mechanical Properties of Collagen," *Journal of Structural Biology*, vol. 122, no. 1–2, pp. 119–122, 1998.
- [25] K. W. Barfod, "Achilles tendon rupture; assessment of nonoperative treatment," *Dan Med J*, vol. 61, no. 4, p. B4837, Apr. 2014.
- [26] J. W. Freeman, M. D. Woods, and C. T. Laurencin, "Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid–twist scaffold design," *Journal of Biomechanics*, vol. 40, no. 9, pp. 2029–2036, Jan. 2007.

- [27] P.-J. Arnoux, D. Subit, C. Masson, P. Chabrand, and C. Brunet, "Knee ligaments mechanics: From experiments to FE simulations," *Revue Européenne des Éléments Finis*, vol. 14, no. 4–5, pp. 577–600, Jan. 2005.
- [28] F. Noyes and E. Grood, "The strength of the anterior cruciate ligament in humans and Rhesus monkeys," *The Journal of Bone & Joint Surgery*, vol. 58, no. 8, pp. 1074–1082, Dec. 1976.
- [29] F. R. Noyes, D. L. Butler, E. S. Grood, R. F. Zernicke, and M. S. Hefzy, "Biomechanical analysis of human ligament grafts used in knee-ligament repairs and reconstructions," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 66, no. 3, pp. 344–352, Mar. 1984.
- [30] S. L.-Y. Woo, J. M. Hollis, D. J. Adams, R. M. Lyon, and S. Takai, "Tensile properties of the human femur-anterior cruciate ligament-tibia complex: the effects of specimen age and orientation," *Am J Sports Med*, vol. 19, no. 3, pp. 217–225, May 1991.
- [31] J. A. W. van Dommelen *et al.*, "Pedestrian Injuries: Viscoelastic Properties of Human Knee Ligaments at High Loading Rates," *Traffic Injury Prevention*, vol. 6, no. 3, pp. 278–287, Sep. 2005.
- [32] E. H. Chen and J. Black, "Materials design analysis of the prosthetic anterior cruciate ligament," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 14, no. 5, pp. 567–586, Sep. 1980.
- [33] A. D. Georgoulis, S. Ristanis, C. Moraiti, A. Mitsou, M. Bernard, and N. Stergiou, "Three-dimensional kinematics of the tibiofemoral joint in ACL-deficient and reconstructed patients shows increased tibial rotation," *Operative Techniques in Orthopaedics*, vol. 15, no. 1, pp. 49–56, Jan. 2005.
- [34] A. M. Kiapour and M. M. Murray, "Basic science of anterior cruciate ligament injury and repair," *Bone & Joint Research*, vol. 3, no. 2, pp. 20–31, Feb. 2014.
- [35] C. J. KAHN, "Ingénierie tissulaire des Ligaments - Conception d'un bioréacteur et étude des propriétés mécaniques," Institut National Polytechnique de Lorraine, Nancy, 2009.
- [36] N. Wetters, A. E. Weber, T. H. Wuerz, D. L. Schub, and B. R. Mandelbaum, "Mechanism of Injury and Risk Factors for Anterior Cruciate Ligament Injury," *Operative Techniques in Sports Medicine*, vol. 24, no. 1, pp. 2–6, Mar. 2016.
- [37] A. D. Georgoulis *et al.*, "ACL injury and reconstruction: Clinical related in vivo biomechanics," *Orthopaedics & Traumatology: Surgery & Research*, vol. 96, no. 8, pp. S119–S128, Dec. 2010.
- [38] T. E. Hewett, S. L. Di Stasi, and G. D. Myer, "Current Concepts for Injury Prevention in Athletes After Anterior Cruciate Ligament Reconstruction," *Am J Sports Med*, vol. 41, no. 1, pp. 216–224, Jan. 2013.
- [39] D. E. Gwinn, J. H. Wilckens, E. R. McDevitt, G. Ross, and T.-C. Kao, "The Relative Incidence of Anterior Cruciate Ligament Injury in Men and Women at the United States Naval Academy," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 28, no. 1, pp. 98–102, Jan. 2000.
- [40] M. Waldén, M. Hägglund, J. Werner, and J. Ekstrand, "The epidemiology of anterior cruciate ligament injury in football (soccer): a review of the literature from a gender-related perspective," *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 19, no. 1, pp. 3–10, Jan. 2011.
- [41] L. T. Buller, M. J. Best, M. G. Baraga, and L. D. Kaplan, "Trends in Anterior Cruciate Ligament Reconstruction in the United States," *Orthop J Sports Med*, vol. 3, no. 1, Dec. 2014.
- [42] C. B. Frank, D. A. Hart, and N. G. Shrive, "Molecular biology and biomechanics of normal and healing ligaments--a review," *Osteoarthr. Cartil.*, vol. 7, no. 1, pp. 130–140, Jan. 1999.
- [43] M. M. Murray and B. C. Fleming, "Biology of anterior cruciate ligament injury and repair: Kappa delta ann doner vaughn award paper 2013: BIOLOGY OF ANTERIOR CRUCIATE LIGAMENT INJURY AND REPAIR," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 31, no. 10, pp. 1501–1506, Oct. 2013.
- [44] R. L. Cruess and J. Dumont, "Fracture healing," *Can J Surg*, vol. 18, no. 5, pp. 403–413, Sep. 1975.
- [45] G. Y. F. Ng, "Ligament injury and repair - current concepts," *Hong Kong Physiotherapy Journal*, vol. 20, p. 8, 2002.
- [46] C. S. Chamberlain *et al.*, "The influence of macrophage depletion on ligament healing," *Connective Tissue Research*, vol. 52, no. 3, pp. 203–211, Jun. 2011.
- [47] M. E. Wiig, D. Amiel, M. Ivarsson, C. N. Nagineni, C. D. Wallace, and K.-E. Arfors, "Type I procollagen gene expression in normal and early healing of the medial collateral and anterior cruciate ligaments in rabbits: An in situ hybridization study," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 9, no. 3, pp. 374–382, May 1991.
- [48] C. S. Chamberlain, E. Crowley, and R. Vanderby, "The spatio-temporal dynamics of ligament healing," *Wound Repair and Regeneration*, vol. 17, no. 2, pp. 206–215, Mar. 2009.
- [49] S. L.-Y. Woo, S. D. Abramowitch, R. Kilger, and R. Liang, "Biomechanics of knee ligaments: injury, healing, and repair," *Journal of Biomechanics*, vol. 39, no. 1, pp. 1–20, Jan. 2006.
- [50] D. S. Logerstedt, L. Snyder-Mackler, R. C. Ritter, M. J. Axe, and J. J. Godges, "Knee Stability and Movement Coordination Impairments: Knee Ligament Sprain," *J Orthop Sports Phys Ther*, vol. 40, no. 4, pp. A1–A37, Apr. 2010.

- [51] P. N. Grimshaw and P. Bowker, "Quantitative assessment of anterior cruciate ligament deficiency: Applied load versus applied displacement," *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part H: Journal of Engineering in Medicine*, vol. 211, no. 6, pp. 441–449, Jun. 1997.
- [52] H. Makhmalbaf, A. Moradi, S. Ganji, and F. Omid-Kashani, "Accuracy of Lachman and Anterior Drawer Tests for Anterior Cruciate Ligament Injuries," *Arch Bone Jt Surg*, vol. 1, no. 2, pp. 94–97, Dec. 2013.
- [53] N. K. Paschos and S. M. Howell, "Anterior cruciate ligament reconstruction: principles of treatment," *EFORT Open Rev*, vol. 1, no. 11, pp. 398–408, Nov. 2016.
- [54] M. J. Gibbons and A. R. Bartolozzi, "Anterior Cruciate Ligament Reconstruction using allograft: a review of the important issues," *Operative Techniques in Orthopaedics*, vol. 2, no. 2, pp. 76–85, Apr. 1992.
- [55] T. M. Wenson and F. H. Fu, "Graft selection for anterior cruciate ligament reconstruction," *Operative Techniques in Orthopaedics*, vol. 5, no. 3, pp. 261–265, Jul. 1995.
- [56] R. A. Rubinstein and K. D. Shelbourne, "Graft selection, placement, fixation, and tensioning for anterior cruciate ligament reconstruction," *Operative Techniques in Sports Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 10–15, Jan. 1993.
- [57] T. E. Klootwyk and K. D. Shelbourne, "The future of Anterior Cruciate Ligament surgery," *Operative Techniques in Sports Medicine*, vol. 1, no. 1, pp. 79–83, Jan. 1993.
- [58] M. Wagner, M. J. Kääh, J. Schallock, N. P. Haas, and A. Weiler, "Hamstring tendon versus patellar tendon anterior cruciate ligament reconstruction using biodegradable interference fit fixation: a prospective matched-group analysis," *Am J Sports Med*, vol. 33, no. 9, pp. 1327–1336, Sep. 2005.
- [59] L. Salmon, V. Russell, T. Musgrove, L. Pinczewski, and K. Refshauge, "Incidence and risk factors for graft rupture and contralateral rupture after anterior cruciate ligament reconstruction," *Arthroscopy*, vol. 21, no. 8, pp. 948–957, Aug. 2005.
- [60] S. L. Keays, J. E. Bullock-Saxton, A. C. Keays, P. A. Newcombe, and M. I. Bullock, "A 6-year follow-up of the effect of graft site on strength, stability, range of motion, function, and joint degeneration after anterior cruciate ligament reconstruction: patellar tendon versus semitendinosus and Gracilis tendon graft," *Am J Sports Med*, vol. 35, no. 5, pp. 729–739, May 2007.
- [61] L. A. Pinczewski, J. Lyman, L. J. Salmon, V. J. Russell, J. Roe, and J. Linklater, "A 10-year comparison of anterior cruciate ligament reconstructions with hamstring tendon and patellar tendon autograft: a controlled, prospective trial," *Am J Sports Med*, vol. 35, no. 4, pp. 564–574, Apr. 2007.
- [62] E. Laboute *et al.*, "Analysis of return to competition and repeat rupture for 298 anterior cruciate ligament reconstructions with patellar or hamstring tendon autograft in sportspeople," *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, vol. 53, no. 10, pp. 598–614, Dec. 2010.
- [63] M. De Smedt, "Anterior cruciate ligament prosthesis - Analysis of a failure," *Acta Orthop Belg*, vol. 64, no. 4, pp. 422–433, Dec. 1998.
- [64] W. R. Walsh, *Repair and Regeneration of Ligaments, Tendons, and Joint Capsule*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [65] G. Vunjak-Novakovic, G. Altman, R. Horan, and D. L. Kaplan, "Tissue Engineering of Ligaments," *Annual Review of Biomedical Engineering*, vol. 6, no. 1, pp. 131–156, Aug. 2004.
- [66] B. B. Seedhom, "Reconstruction of the anterior cruciate ligament," *Proc Inst Mech Eng H*, vol. 206, no. 1, pp. 15–27, 1992.
- [67] C. Smith, A. Ajuied, F. Wong, M. Norris, D. Back, and A. Davies, "The Use of the Ligament Augmentation and Reconstruction System (LARS) for Posterior Cruciate Reconstruction," *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 30, no. 1, pp. 111–120, Jan. 2014.
- [68] Z. Machotka, I. Scarborough, W. Duncan, S. Kumar, and L. Perraton, "Anterior cruciate ligament repair with LARS (ligament advanced reinforcement system): a systematic review," *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol*, vol. 2, p. 29, Dec. 2010.
- [69] R. Mascarenhas and P. B. MacDonald, "Anterior cruciate ligament reconstruction: a look at prosthetics - past, present and possible future," *McGill J Med*, vol. 11, no. 1, pp. 29–37, Jan. 2008.
- [70] J. S. Bach, M. Cherkaoui, L. Corté, S. Cantournet, and D. N. Ku, "Design Considerations for a Prosthetic Anterior Cruciate Ligament," *Journal of Medical Devices*, vol. 6, no. 4, p. 045004, Nov. 2012.
- [71] M.-F. Guidoin, Y. Marois, J. Bejui, N. Poddevin, M. W. King, and R. Guidoin, "Analysis of retrieved polymer fiber based replacements for the ACL," *Biomaterials*, vol. 21, no. 23, pp. 2461–2474, Dec. 2000.
- [72] C.-L. Wang, C.-K. Hsiao, A.-T. Hsu, C.-Z. Dung, and C.-H. Chang, "Biocompatibility and mechanical property of LARS artificial ligament with tissue ingrowth," *Journal of Mechanics in Medicine and Biology*, vol. 12, no. 01, p. 1250012, Mar. 2012.
- [73] G. Dericks, "Ligament advanced reinforcementsystem anterior cruciate ligament reconstruction," *Operative Techniques in Sports Medicine*, vol. 3, no. 3, pp. 187–205, Jul. 1995.

- [74] S. M. Howell and M. A. Taylor, "Failure of reconstruction of the anterior cruciate ligament due to impingement by the intercondylar roof," *J Bone Joint Surg Am*, vol. 75, no. 7, pp. 1044–1055, Jul. 1993.
- [75] P. McCulloch, "ACL Tear - Knee & Sports," *Orthobullets*. [Online]. Available: <https://www.orthobullets.com/knee-and-sports/3008/acl-tear>. [Accessed: 10-Aug-2018].
- [76] C. T. Laurencin and J. W. Freeman, "Ligament tissue engineering: An evolutionary materials science approach," *Biomaterials*, vol. 26, no. 36, pp. 7530–7536, Dec. 2005.
- [77] H. Matsumoto and K. Fujikawa, "Leeds-Keio artificial ligament: a new concept for the anterior cruciate ligament reconstruction of the knee," *Keio J Med*, vol. 50, no. 3, pp. 161–166, Sep. 2001.
- [78] P. A. Indelicato, M. S. Pascale, and M. O. Huegel, "Early experience with the GORE-TEX polytetrafluoroethylene anterior cruciate ligament prosthesis," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 17, no. 1, pp. 55–62, Jan. 1989.
- [79] Y. Marois *et al.*, "Histopathological and immunological investigations of synthetic fibres and structures used in three prosthetic anterior cruciate ligaments: in vivo study in the rat," *Biomaterials*, vol. 14, no. 4, pp. 255–262, 1993.
- [80] S. Bernardino, "ACL prosthesis: any promise for the future?," *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy*, vol. 18, no. 6, pp. 797–804, Jun. 2010.
- [81] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Elsevier, 2004.
- [82] D. G. Castner and B. D. Ratner, "Biomedical surface science: Foundations to frontiers," *Surface Science*, vol. 500, no. 1–3, pp. 28–60, Mar. 2002.
- [83] H. Jakhu, G. Gill, and A. Singh, "Role of integrins in wound repair and its periodontal implications," *J Oral Biol Craniofac Res*, vol. 8, no. 2, pp. 122–125, 2018.
- [84] M. Tulla *et al.*, "Selective Binding of Collagen Subtypes by Integrin $\alpha_1 I$, $\alpha_2 I$, and $\alpha_{10} I$ Domains," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 276, no. 51, pp. 48206–48212, Dec. 2001.
- [85] C. Zeltz, J. Orgel, and D. Gullberg, "Molecular composition and function of integrin-based collagen glues—Introducing COLINBRIs," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, vol. 1840, no. 8, pp. 2533–2548, Aug. 2014.
- [86] O. Lang, "Cell adhesion," Dept. Genetics, Cell & Immunobiology, Semmelweis University, 2014.
- [87] B. G. Keselowsky, D. M. Collard, and A. J. García, "Surface chemistry modulates fibronectin conformation and directs integrin binding and specificity to control cell adhesion: Surface Chemistry Alters Integrin Binding," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 66A, no. 2, pp. 247–259, Aug. 2003.
- [88] H. M. Kowalczyńska *et al.*, "Adsorption characteristics of human plasma fibronectin in relationship to cell adhesion," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 61, no. 2, pp. 260–269, Aug. 2002.
- [89] H. M. Kowalczyńska and M. Nowak-Wyrzykowska, "Modulation of adhesion, spreading and cytoskeleton organization of 3T3 fibroblasts by sulfonic groups present on polymer surfaces," *Cell Biology International*, vol. 27, no. 2, pp. 101–114, Feb. 2003.
- [90] Z. Ge, F. Yang, J. C. H. Goh, S. Ramakrishna, and E. H. Lee, "Biomaterials and scaffolds for ligament tissue engineering," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 77A, no. 3, pp. 639–652, Jun. 2006.
- [91] V. Volkov, A. V. Ferreira, and A. Cavaco-Paulo, "On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing Toward Silk-Inspired Materials: A Review: On the Routines of Wild-Type Silk Fibroin Processing...," *Macromolecular Materials and Engineering*, vol. 300, no. 12, pp. 1199–1216, Dec. 2015.
- [92] N. Sevivas *et al.*, "Biomaterials for Tendon Regeneration," in *Muscle and Tendon Injuries*, G. L. Canata, P. d'Hooghe, and K. J. Hunt, Eds. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2017, pp. 131–143.
- [93] G. H. Altman *et al.*, "Silk matrix for tissue engineered anterior cruciate ligaments," *Biomaterials*, vol. 23, no. 20, pp. 4131–4141, Oct. 2002.
- [94] G. S. Perrone, B. L. Proffen, A. M. Kiapour, J. T. Sieker, B. C. Fleming, and M. M. Murray, "Bench-to bedside: Bridge-enhanced anterior cruciate ligament repair," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 35, no. 12, pp. 2606–2612, Dec. 2017.
- [95] B. L. Proffen *et al.*, "Electron Beam Sterilization Does Not Have a Detrimental Effect on the Ability of Extracellular Matrix Scaffolds to Support In Vivo Ligament Healing," *J Orthop Res*, vol. 33, no. 7, pp. 1015–1023, Jul. 2015.
- [96] B. L. Proffen, G. S. Perrone, G. Roberts, and M. M. Murray, "Bridge-Enhanced ACL Repair: A Review of the Science and the Pathway Through FDA Investigational Device Approval," *Annals of Biomedical Engineering*, vol. 43, no. 3, pp. 805–818, Mar. 2015.
- [97] M. M. Murray *et al.*, "The Bridge-Enhanced Anterior Cruciate Ligament Repair (BEAR) Procedure: An Early Feasibility Cohort Study," *Orthopaedic Journal of Sports Medicine*, vol. 4, no. 11, p. 232596711667217, Nov. 2016.

- [98] S. Farah, D. G. Anderson, and R. Langer, "Physical and mechanical properties of PLA, and their functions in widespread applications — A comprehensive review," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 107, pp. 367–392, Dec. 2016.
- [99] O. Laitinen *et al.*, "Mechanical properties of biodegradable poly-L-lactide ligament augmentation device in experimental anterior cruciate ligament reconstruction," *Archives of Orthopaedic and Trauma Surgery*, vol. 112, no. 6, pp. 270–274, Nov. 1993.
- [100] M. A. Woodruff and D. W. Huttmacher, "The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century," *Progress in Polymer Science*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, Oct. 2010.
- [101] X. C. Zhang, *Science and Principles of Biodegradable and Bioresorbable Medical Polymers: Materials and Properties*. Woodhead Publishing, 2016.
- [102] F. Detrez, R. Seguela, and G. Coulon, "Etude des mécanismes de déformation d'un polymère semi-cristallin : le poly(-caprolactone)," presented at the 18ème congrès français de mécanique, Grenoble, Aug-2007.
- [103] S. Dumitriu, *Polymeric Biomaterials, Revised and Expanded*. CRC Press, 2001.
- [104] M. T. Nelson *et al.*, "Recrystallization improves the mechanical properties of sintered electrospun polycaprolactone," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 30, pp. 150–158, Feb. 2014.
- [105] C. X. F. Lam, M. M. Savalani, S.-H. Teoh, and D. W. Huttmacher, "Dynamics of *in vitro* polymer degradation of polycaprolactone-based scaffolds: accelerated versus simulated physiological conditions," *Biomedical Materials*, vol. 3, no. 3, p. 034108, Sep. 2008.
- [106] Sandra Sánchez-González, Nazely Diban, and Ane Urtiaga, "Hydrolytic Degradation and Mechanical Stability of Poly(ϵ -Caprolactone)/Reduced Graphene Oxide Membranes as Scaffolds for In Vitro Neural Tissue Regeneration," *Membranes*, vol. 8, no. 1, p. 12, Mar. 2018.
- [107] S. C. Woodward, P. S. Brewer, F. Moatamed, A. Schindler, and C. G. Pitt, "The intracellular degradation of poly(ϵ -caprolactone)," *Journal of Biomedical Materials Research*, vol. 19, no. 4, pp. 437–444, Apr. 1985.
- [108] H. Sun, L. Mei, C. Song, X. Cui, and P. Wang, "The *in vivo* degradation, absorption and excretion of PCL-based implant," *Biomaterials*, vol. 27, no. 9, pp. 1735–1740, Mar. 2006.
- [109] V. M. Pathak and Navneet, "Review on the current status of polymer degradation: a microbial approach," *Bioresources and Bioprocessing*, vol. 4, no. 1, Dec. 2017.
- [110] T. Sekiguchi *et al.*, "Biodegradation of aliphatic polyesters soaked in deep seawaters and isolation of poly(ϵ -caprolactone)-degrading bacteria," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 96, no. 7, pp. 1397–1403, Jul. 2011.
- [111] C. P. Laurent, C. Vaquette, X. Liu, J.-F. Schmitt, and R. Rahouadj, "Suitability of a PLCL fibrous scaffold for soft tissue engineering applications: A combined biological and mechanical characterisation," *Journal of Biomaterials Applications*, vol. 32, no. 9, pp. 1276–1288, Apr. 2018.
- [112] G. Shen, Y. Xu, Q. Dong, H. Zhou, and C. Yu, "Arthroscopic Posterior Cruciate Ligament Reconstruction Using LARS Artificial Ligament: A Retrospective Study," *Journal of Surgical Research*, vol. 173, no. 1, pp. 75–82, Mar. 2012.
- [113] T. Nau and A. Teuschl, "Regeneration of the anterior cruciate ligament: Current strategies in tissue engineering," *World J Orthop*, vol. 6, no. 1, pp. 127–136, Jan. 2015.
- [114] X. Liu *et al.*, "Mesenchymal stem cell interacted with PLCL braided scaffold coated with poly-L-lysine/hyaluronic acid for ligament tissue engineering: MESENCHYMAL STEM CELL INTERACTED WITH PLCL BRAIDED SCAFFOLD," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 106, no. 12, pp. 3042–3052, Dec. 2018.
- [115] Z.-C. Hao, S.-Z. Wang, X.-J. Zhang, and J. Lu, "Stem cell therapy: a promising biological strategy for tendon-bone healing after anterior cruciate ligament reconstruction," *Cell Proliferation*, vol. 49, no. 2, pp. 154–162, Apr. 2016.
- [116] S. Font Tellado, E. R. Balmayor, and M. Van Griensven, "Strategies to engineer tendon/ligament-to-bone interface: Biomaterials, cells and growth factors," *Advanced Drug Delivery Reviews*, vol. 94, pp. 126–140, Nov. 2015.
- [117] H. Li, C. Chen, Y. Ge, and S. Chen, "Spray-painted human fibronectin coating as an effective strategy to enhance graft ligamentization of a polyethylene terephthalate artificial ligament," *Biotechnology Letters*, vol. 36, no. 5, pp. 1079–1088, May 2014.
- [118] H. H. Lu *et al.*, "Anterior cruciate ligament regeneration using braided biodegradable scaffolds: *in vitro* optimization studies," *Biomaterials*, vol. 26, no. 23, pp. 4805–4816, Aug. 2005.

- [119] H. Li *et al.*, "The use of layer by layer self-assembled coatings of hyaluronic acid and cationized gelatin to improve the biocompatibility of poly(ethylene terephthalate) artificial ligaments for reconstruction of the anterior cruciate ligament," *Acta Biomater*, vol. 8, no. 11, pp. 4007–4019, Nov. 2012.
- [120] J. Chen *et al.*, "Human bone marrow stromal cell and ligament fibroblast responses on RGD-modified silk fibers," *J Biomed Mater Res A*, vol. 67, no. 2, pp. 559–570, Nov. 2003.
- [121] M. Jozefowicz and J. Jozefonvicz, "Randomness and biospecificity: random copolymers are capable of biospecific molecular recognition in living systems," *Biomaterials*, vol. 18, no. 24, pp. 1633–1644, Dec. 1997.
- [122] L. Stanislawski, H. Serne, M. Stanislawski, and M. Jozefowicz, "Conformational changes of fibronectin induced by polystyrene derivatives with a heparin-like function," *J. Biomed. Mater. Res.*, vol. 27, no. 5, pp. 619–626, May 1993.
- [123] M. Ciobanu, A. Siove, V. Gueguen, L. J. Gamble, D. G. Castner, and V. Migonney, "Radical graft polymerization of styrene sulfonate on poly (ethylene terephthalate) films for ACL applications: 'grafting from' and chemical characterization," *Biomacromolecules*, vol. 7, no. 3, pp. 755–760, 2006.
- [124] J. Zhou, M. Ciobanu, G. Pavon-Djavid, V. Gueguen, and V. Migonney, "Morphology and adhesion of human fibroblast cells cultured on bioactive polymer grafted ligament prosthesis," in *2007 29th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society*, Lyon, France, 2007, pp. 5115–5118.
- [125] G. Pavon-Djavid, L. J. Gamble, M. Ciobanu, V. Gueguen, D. G. Castner, and V. Migonney, "Bioactive Poly(ethylene terephthalate) Fibers and Fabrics: Grafting, Chemical Characterization, and Biological Assessment," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 11, pp. 3317–3325, Nov. 2007.
- [126] S. Lessim, V. Migonney, P. Thoreux, D. Lutomski, and S. Changotade, "PolyNaSS bioactivation of LARS artificial ligament promotes human ligament fibroblast colonisation in vitro," *Bio-Medical Materials and Engineering*, no. 4, pp. 289–297, 2013.
- [127] M. Ciobanu, "Revêtements polymères bioactifs de fibres en PET pour prothèses ligamentaires : greffage 'depuis' la surface et évaluation des propriétés biologiques," Université Paris 13, Villetaneuse, 2005.
- [128] V. Viateau *et al.*, "Ligart : ligament synthétique « bioactif » et « biointégrable » permettant la réhabilitation rapide du patient : greffage chimique, évaluations biologiques in vivo, expérimentation animale, étude préclinique," *IRBM*, vol. 32, no. 2, pp. 118–122, Apr. 2011.
- [129] J. Zhou, M. Manassero, V. Migonney, and V. Viateau, "Évaluation clinique et biologique d'un ligament synthétique bioactif chez la brebis," *IRBM*, vol. 30, no. 4, pp. 153–155, Sep. 2009.
- [130] C. Vaquette *et al.*, "The effect of polystyrene sodium sulfonate grafting on polyethylene terephthalate artificial ligaments on in vitro mineralisation and in vivo bone tissue integration," *Biomaterials*, vol. 34, no. 29, pp. 7048–7063, Sep. 2013.
- [131] T. Marui *et al.*, "Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts," *Journal of Orthopaedic Research*, vol. 15, no. 1, pp. 18–23, Jan. 1997.
- [132] S.-L. Hsu, R. Liang, and S. L. Woo, "Functional tissue engineering of ligament healing," *Sports Med Arthrosc Rehabil Ther Technol*, vol. 2, p. 12, May 2010.
- [133] J. E. Moreau, J. Chen, R. L. Horan, D. L. Kaplan, and G. H. Altman, "Sequential growth factor application in bone marrow stromal cell ligament engineering," *Tissue Eng.*, vol. 11, no. 11–12, pp. 1887–1897, Dec. 2005.
- [134] J. E. Moreau *et al.*, "Growth factor induced fibroblast differentiation from human bone marrow stromal cells in vitro," *J. Orthop. Res.*, vol. 23, no. 1, pp. 164–174, Jan. 2005.
- [135] J. Menetrey *et al.*, "Direct-, fibroblast- and myoblast-mediated gene transfer to the anterior cruciate ligament," *Tissue Eng.*, vol. 5, no. 5, pp. 435–442, Oct. 1999.
- [136] S. N. Parikh, "Gene Therapy: Principles and Clinical Applications in Orthopedics," *Gene Therapy*, vol. 27, no. 3, p. 11, 2004.
- [137] J. K. Venkatesan, C. Falentin-Daudré, A. Leroux, V. Migonney, and M. Cucchiari, "Controlled release of gene therapy constructs from solid scaffolds for therapeutic applications in orthopedics," *Discov Med*, vol. 25, no. 138, pp. 195–203, 2018.
- [138] H. Madry, D. Kohn, and M. Cucchiari, "Direct FGF-2 Gene Transfer via Recombinant Adeno-Associated Virus Vectors Stimulates Cell Proliferation, Collagen Production, and the Repair of Experimental Lesions in the Human ACL," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 41, no. 1, pp. 194–202, Jan. 2013.
- [139] C. H. Evans and J. Huard, "Gene therapy approaches to regenerating the musculoskeletal system," *Nat Rev Rheumatol*, vol. 11, no. 4, pp. 234–242, Apr. 2015.

- [140] D. S. Mastrokalos, J. Springer, R. Siebold, and H. H. Paessler, "Donor Site Morbidity and Return to the Preinjury Activity Level after Anterior Cruciate Ligament Reconstruction Using Ipsilateral and Contralateral Patellar Tendon Autograft: A Retrospective, Nonrandomized Study," *The American Journal of Sports Medicine*, vol. 33, no. 1, pp. 85–93, Jan. 2005.
- [141] J. A. Cooper, J. S. Sahota, W. J. Gorum, J. Carter, S. B. Doty, and C. T. Laurencin, "Biomimetic tissue-engineered anterior cruciate ligament replacement," *Proceedings of the National Academy of Sciences*, vol. 104, no. 9, pp. 3049–3054, Feb. 2007.
- [142] F. El Khadali, G. H elary, G. Pavon-Djavid, and V. Migonney, "Modulating Fibroblast Cell Proliferation with Functionalized Poly(methyl methacrylate) Based Copolymers: Chemical Composition and Monomer Distribution Effect," *Biomacromolecules*, vol. 3, no. 1, pp. 51–56, Jan. 2002.
- [143] H. Cui and P. J. Sinko, "The role of crystallinity on differential attachment/proliferation of osteoblasts and fibroblasts on poly (caprolactone-co-glycolide) polymeric surfaces," *Frontiers of Materials Science*, vol. 6, no. 1, pp. 47–59, Mar. 2012.
- [144] Z.-L. Yang, S. Zhou, L. Lu, X. Wang, J. Wang, and N. Huang, "Construction and hemocompatibility study of highly bioactive heparin-functionalized surface," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 100A, no. 11, pp. 3124–3133, Nov. 2012.
- [145] H. Kweon, "A novel degradable polycaprolactone networks for tissue engineering," *Biomaterials*, vol. 24, no. 5, pp. 801–808, Feb. 2003.
- [146] L. Goebel, P. Orth, M. Cucchiari, D. Pape, and H. Madry, "Macroscopic cartilage repair scoring of defect fill, integration and total points correlate with corresponding items in histological scoring systems – a study in adult sheep," *Osteoarthritis and Cartilage*, vol. 25, no. 4, pp. 581–588, Apr. 2017.
- [147] G. Rohman, S. Huot, M. Vilas-Boas, G. Radu-Bostan, D. G. Castner, and V. Migonney, "The grafting of a thin layer of poly(sodium styrene sulfonate) onto poly(ϵ -caprolactone) surface can enhance fibroblast behavior," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 26, no. 7, Jul. 2015.
- [148] T. K. Dash and V. B. Konkimalla, "Poly- ϵ -caprolactone based formulations for drug delivery and tissue engineering: A review," *Journal of Controlled Release*, vol. 158, no. 1, pp. 15–33, Feb. 2012.
- [149] F. Mostafavi and N. G. Ebrahimi, "Physical characterization and rheological behavior of polyurethane/poly(ϵ -caprolactone) blends, prepared by solution blending using dimethylacetamide," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 125, no. 5, pp. 4091–4099, Sep. 2012.
- [150] C. G. Madsen, A. Skov, S. Baldursdottir, T. Rades, L. Jorgensen, and N. J. Medlicott, "Simple measurements for prediction of drug release from polymer matrices – Solubility parameters and intrinsic viscosity," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 92, pp. 1–7, May 2015.
- [151] A. G. A. Coombes, S. C. Rizzi, M. Williamson, J. E. Barralet, S. Downes, and W. A. Wallace, "Precipitation casting of polycaprolactone for applications in tissue engineering and drug delivery," *Biomaterials*, vol. 25, no. 2, pp. 315–325, Jan. 2004.
- [152] A. Leroux, C. Egles, and V. Migonney, "Impact of chemical and physical treatments on the mechanical properties of poly(ϵ -caprolactone) fibers bundles for the anterior cruciate ligament reconstruction," *PLOS ONE*, vol. 13, no. 10, p. e0205722, Oct. 2018.
- [153] D. D. Deligianni, N. Katsala, S. Ladas, D. Sotiropoulou, J. Amedee, and Y. F. Missirlis, "Effect of surface roughness of the titanium alloy Ti–6Al–4V on human bone marrow cell response and on protein adsorption," *Biomaterials*, vol. 22, no. 11, pp. 1241–1251, Jun. 2001.
- [154] K. M. Hotchkiss, G. B. Reddy, S. L. Hyzy, Z. Schwartz, B. D. Boyan, and R. Olivares-Navarrete, "Titanium surface characteristics, including topography and wettability, alter macrophage activation," *Acta Biomaterialia*, vol. 31, pp. 425–434, Feb. 2016.
- [155] S. Spriano *et al.*, "How do wettability, zeta potential and hydroxylation degree affect the biological response of biomaterials?," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 74, pp. 542–555, May 2017.
- [156] E. Rosellini, C. Cristallini, G. D. Guerra, and N. Barbani, "Surface chemical immobilization of bioactive peptides on synthetic polymers for cardiac tissue engineering," *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, vol. 26, no. 9, pp. 515–533, Jun. 2015.
- [157] P. Shokrollahi, H. Mirzadeh, O. A. Scherman, and W. T. S. Huck, "Biological and mechanical properties of novel composites based on supramolecular polycaprolactone and functionalized hydroxyapatite," *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, vol. 95A, no. 1, pp. 209–221, Oct. 2010.
- [158] J. Crispim, H. A. M. Fernandes, S. C. Fu, Y. W. Lee, P. Jonkheijm, and D. B. F. Saris, "TGF- β 1 activation in human hamstring cells through growth factor binding peptides on polycaprolactone surfaces," *Acta Biomaterialia*, vol. 53, pp. 165–178, Apr. 2017.

- [159] J. D. Andrade *et al.*, "Proteins at interfaces: Principles, multivariate aspects, protein resistant surfaces, and direct imaging and manipulation of adsorbed proteins," *Clinical Materials*, vol. 11, no. 1, pp. 67–84, Jan. 1992.
- [160] H. Felgueiras and V. Migonney, "Presence of sulfonate groups on Ti6Al4V surfaces enhances osteoblastic attachment strength at the interface," *IRBM*, vol. 34, no. 6, pp. 371–375, Dec. 2013.
- [161] H. P. Felgueiras and V. Migonney, "Cell Spreading and Morphology Variations as a Result of Protein Adsorption and Bioactive Coating on Ti6Al4V Surfaces," *IRBM*, vol. 37, no. 3, pp. 165–171, Jun. 2016.
- [162] H. P. Felgueiras, M. D. M. Evans, and V. Migonney, "Contribution of fibronectin and vitronectin to the adhesion and morphology of MC3T3-E1 osteoblastic cells to poly(NaSS) grafted Ti6Al4V," *Acta Biomaterialia*, vol. 28, pp. 225–233, Dec. 2015.
- [163] H. P. Felgueiras, S. D. Sommerfeld, N. S. Murthy, J. Kohn, and V. Migonney, "Poly(NaSS) Functionalization Modulates the Conformation of Fibronectin and Collagen Type I To Enhance Osteoblastic Cell Attachment onto Ti6Al4V," *Langmuir*, vol. 30, no. 31, pp. 9477–9483, Aug. 2014.
- [164] I. Nedeva *et al.*, "Synthetic polyamines promote rapid lamellipodial growth by regulating actin dynamics," *Nature Communications*, vol. 4, no. 1, Dec. 2013.
- [165] D. Soulet, B. Gagnon, S. Rivest, M. Audette, and R. Poulin, "A Fluorescent Probe of Polyamine Transport Accumulates into Intracellular Acidic Vesicles via a Two-step Mechanism," *Journal of Biological Chemistry*, vol. 279, no. 47, pp. 49355–49366, Nov. 2004.
- [166] A. Mifková *et al.*, "Synthetic Polyamine BPA-C8 Inhibits TGF- β 1-Mediated Conversion of Human Dermal Fibroblast to Myofibroblasts and Establishment of Galectin-1-Rich Extracellular Matrix in Vitro," *ChemBioChem*, vol. 15, no. 10, pp. 1465–1470, Jul. 2014.
- [167] G. Berry and A. Asokan, "Cellular transduction mechanisms of adeno-associated viral vectors," *Curr Opin Virol*, vol. 21, pp. 54–60, Dec. 2016.
- [168] C. C. Kaeding, B. Léger-St-Jean, and R. A. Magnussen, "Epidemiology and Diagnosis of Anterior Cruciate Ligament Injuries," *Clinics in Sports Medicine*, vol. 36, no. 1, pp. 1–8, Jan. 2017.
- [169] W. M. Stuart, M. A. Patrick, H. J. Betts, A. Murray, and J. A. Pope, "Rehabilitation following Dacron Graft Reconstruction of the Anterior Cruciate Ligament of the Knee," *Physiotherapy*, vol. 74, no. 10, pp. 528–530, Oct. 1988.
- [170] W. Klein and K.-U. Jensen, "Synovitis and artificial ligaments," *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 8, no. 1, pp. 116–124, 1992.
- [171] L. Thomson, J. Houlton, M. Allen, and N. Rushton, "Replacement of the anterior cruciate ligament with a coated carbon fibre prosthesis: a biomechanical study in goats," *The Knee*, vol. 1, no. 3, pp. 139–145, Sep. 1994.
- [172] A. Kalaci *et al.*, "The Biocompatibility of Nitinol in Knee Joint Spaces and Femoral Tunnels: An Experimental Study in Rats," *Journal of Hard Tissue Biology*, vol. 23, no. 3, pp. 317–322, 2014.
- [173] M. A. S. Mowbray, A. R. M. McLeod, M. Barry, W. D. Cooke, and T. K. O'Brien, "Early failure in an artificial anterior cruciate ligament scaffold," *The Knee*, vol. 4, no. 1, pp. 35–40, Mar. 1997.
- [174] S. Iannace, G. Sabatini, L. Ambrosio, and L. Nicolais, "Mechanical behaviour of composite artificial tendons and ligaments," *Biomaterials*, vol. 16, no. 9, pp. 675–680, Jan. 1995.
- [175] H. Seitz, S. Marlovits, I. Schwendenwein, E. Müller, and V. Vécsei, "Biocompatibility of polyethylene terephthalate (Trevira® hochfest) augmentation device in repair of the anterior cruciate ligament," *Biomaterials*, vol. 19, no. 1, pp. 189–196, Jan. 1998.
- [176] V. Viateau, M. Manassero, F. Anagnostou, S. Guérard, D. Mitton, and V. Migonney, "Biological and Biomechanical Evaluation of the Ligament Advanced Reinforcement System (LARS AC) in a Sheep Model of Anterior Cruciate Ligament Replacement: A 3-Month and 12-Month Study," *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 29, no. 6, pp. 1079–1088, Jun. 2013.
- [177] S. J. Kew *et al.*, "Regeneration and repair of tendon and ligament tissue using collagen fibre biomaterials," *Acta Biomaterialia*, vol. 7, no. 9, pp. 3237–3247, Sep. 2011.
- [178] J. W. Freeman, M. D. Woods, and C. T. Laurencin, "Tissue engineering of the anterior cruciate ligament using a braid–twist scaffold design," *Journal of Biomechanics*, vol. 40, no. 9, pp. 2029–2036, Jan. 2007.
- [179] A. Rawal, A. Sibal, H. Saraswat, and S. Quddus Khan, "Tensile behaviour of structurally gradient braided prostheses for anterior cruciate ligaments," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 54, pp. 305–315, Feb. 2016.
- [180] H. M. Pauly *et al.*, "Mechanical properties and cellular response of novel electrospun nanofibers for ligament tissue engineering: Effects of orientation and geometry," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 61, pp. 258–270, Aug. 2016.

- [181] F. Mollica, M. Ventre, F. Sarracino, L. Ambrosio, and L. Nicolais, "Mechanical properties and modelling of a hydrophilic composite used as a biomaterial," *Composites Science and Technology*, vol. 66, no. 1, pp. 92–101, Jan. 2006.
- [182] H. Li *et al.*, "The use of layer by layer self-assembled coatings of hyaluronic acid and cationized gelatin to improve the biocompatibility of poly(ethylene terephthalate) artificial ligaments for reconstruction of the anterior cruciate ligament," *Acta Biomaterialia*, vol. 8, no. 11, pp. 4007–4019, Nov. 2012.
- [183] S. Deepthi, K. Jeevitha, M. Nivedhitha Sundaram, K. P. Chennazhi, and R. Jayakumar, "Chitosan–hyaluronic acid hydrogel coated poly(caprolactone) multiscale bilayer scaffold for ligament regeneration," *Chemical Engineering Journal*, vol. 260, pp. 478–485, Jan. 2015.
- [184] B. D. Ratner, A. S. Hoffman, F. J. Schoen, and J. E. Lemons, *Biomaterials Science: An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, 2004.
- [185] J. Belleney, G. H elary, and V. Migonney, "Terpolymerization of methyl methacrylate, poly(ethylene glycol) methyl ether methacrylate or poly(ethylene glycol) ethyl ether methacrylate with methacrylic acid and sodium styrene sulfonate: determination of the reactivity ratios," *European Polymer Journal*, vol. 38, no. 3, pp. 439–444, Mar. 2002.
- [186] H. Felgueiras and V. Migonney, "Sulfonate groups grafted on Ti6Al4V favor MC3T3-E1 cell performance in serum free medium conditions," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 39, pp. 196–202, Jun. 2014.
- [187] G. Pavon-Djavid, L. J. Gamble, M. Ciobanu, V. Gueguen, D. G. Castner, and V. Migonney, "Bioactive Poly(ethylene terephthalate) Fibers and Fabrics: Grafting, Chemical Characterization, and Biological Assessment," *Biomacromolecules*, vol. 8, no. 11, pp. 3317–3325, Nov. 2007.
- [188] B. Brulez, J.-P. Laboureau, V. Migonney, M. Ciobanu, G. Pavon-Djavid, and A. Siove, "Biomimetic Prosthetic Ligament and Production Method Thereof," WO2004067051 (A1), Aug-2004.
- [189] C. Vaquette *et al.*, "The effect of polystyrene sodium sulfonate grafting on polyethylene terephthalate artificial ligaments on in vitro mineralisation and in vivo bone tissue integration," *Biomaterials*, vol. 34, no. 29, pp. 7048–7063, Sep. 2013.
- [190] V. Viateau *et al.*, "Ligat : ligament synth etique « bioactif » et « bioint egrable » permettant la r ehabilitation rapide du patient : greffage chimique,  valuations biologiques in vivo, exp erimentation animale,  tude pr eclinique," *IRBM*, vol. 32, no. 2, pp. 118–122, Apr. 2011.
- [191] M. A. Woodruff and D. W. Hutmacher, "The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century," *Progress in Polymer Science*, vol. 35, no. 10, pp. 1217–1256, Oct. 2010.
- [192] C. G. Pitt, F. I. Chasalow, Y. M. Hibionada, D. M. Klimas, and A. Schindler, "Aliphatic polyesters. I. The degradation of poly (ϵ -caprolactone) in vivo," *Journal of Applied Polymer Science*, vol. 26, no. 11, pp. 3779–3787, 1981.
- [193] A. H oglund, M. Hakkarainen, and A. Albertsson, "Degradation Profile of Poly(ϵ -caprolactone)—the Influence of Macroscopic and Macromolecular Biomaterial Design," *Journal of Macromolecular Science, Part A*, vol. 44, no. 9, pp. 1041–1046, Jun. 2007.
- [194] N. Noroozi, J. A. Thomson, N. Noroozi, L. L. Schafer, and S. G. Hatzikiriakos, "Viscoelastic behaviour and flow instabilities of biodegradable poly (ϵ -caprolactone) polyesters," *Rheologica Acta*, vol. 51, no. 2, pp. 179–192, Feb. 2012.
- [195] N. Djaker, S. Brustlein, G. Rohman, S. Huot, M. L. de la Chapelle, and V. Migonney, "Characterization of a synthetic bioactive polymer by nonlinear optical microscopy," *Biomedical Optics Express*, vol. 5, no. 1, p. 149, Jan. 2014.
- [196] G. Rohman, S. Huot, M. Vilas-Boas, G. Radu-Bostan, D. G. Castner, and V. Migonney, "The grafting of a thin layer of poly(sodium styrene sulfonate) onto poly(ϵ -caprolactone) surface can enhance fibroblast behavior," *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, vol. 26, no. 7, Jul. 2015.
- [197] Y.-P. Huang and T.-K. Chen, "Effect of surface treatment on pet spinning and the yarn property," *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, vol. 295, no. 1, pp. 75–80, Mar. 2007.
- [198] O. Haddad, L. Gumez, J. R. Hawse, M. Subramaniam, T. C. Spelsberg, and S. F. Bensamoun, "TIEG1-null tenocytes display age-dependent differences in their gene expression, adhesion, spreading and proliferation properties," *Experimental Cell Research*, vol. 317, no. 12, pp. 1726–1735, Jul. 2011.
- [199] J. van Van Dommelen, D. M. Parks, M. C. Boyce, W. A. M. Brekelmans, and F. P. T. Baaijens, "Micromechanical modeling of the elasto-viscoplastic behavior of semi-crystalline polymers," *Journal of the Mechanics and Physics of Solids*, vol. 51, no. 3, pp. 519–541, 2003.
- [200] M. Uchida and N. Tada, "Micro-, meso- to macroscopic modeling of deformation behavior of semi-crystalline polymer," *International Journal of Plasticity*, vol. 49, pp. 164–184, Oct. 2013.
- [201] K. A. Taylor *et al.*, "In vivo measurement of ACL length and relative strain during walking," *J Biomech*, vol. 46, no. 3, pp. 478–483, Feb. 2013.

- [202] P. Abdel-Sayed, M. N. Moghadam, R. Salomir, D. Tchernin, and D. P. Pioletti, "Intrinsic viscoelasticity increases temperature in knee cartilage under physiological loading," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 30, pp. 123–130, Feb. 2014.
- [203] P. Abdel-Sayed, S. E. Darwiche, U. Kettenberger, and D. P. Pioletti, "The role of energy dissipation of polymeric scaffolds in the mechanobiological modulation of chondrogenic expression," *Biomaterials*, vol. 35, no. 6, pp. 1890–1897, Feb. 2014.
- [204] F. A. Petrigliano, G. A. Arom, A. N. Nazemi, M. G. Yerasosian, B. M. Wu, and D. R. McAllister, "In Vivo Evaluation of Electrospun Polycaprolactone Graft for Anterior Cruciate Ligament Engineering," *Tissue Engineering Part A*, vol. 21, no. 7–8, pp. 1228–1236, Apr. 2015.
- [205] C. P. Laurent, D. Durville, D. Mainard, J.-F. Ganghoffer, and R. Rahouadj, "A multilayer braided scaffold for Anterior Cruciate Ligament: Mechanical modeling at the fiber scale," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 12, pp. 184–196, Aug. 2012.
- [206] A. C. Gurlek, B. Sevinc, E. Bayrak, and C. Erisken, "Synthesis and characterization of polycaprolactone for anterior cruciate ligament regeneration," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 71, pp. 820–826, Feb. 2017.
- [207] Z. X. Meng, W. Zheng, L. Li, and Y. F. Zheng, "Fabrication and characterization of three-dimensional nanofiber membrane of PCL–MWCNTs by electrospinning," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 30, no. 7, pp. 1014–1021, Aug. 2010.
- [208] X. Jing, H.-Y. Mi, T. M. Cordie, M. R. Salick, X.-F. Peng, and L.-S. Turng, "Fabrication of shish-kebab structured poly(ϵ -caprolactone) electrospun nanofibers that mimic collagen fibrils: Effect of solvents and matrigel functionalization," *Polymer*, vol. 55, no. 21, pp. 5396–5406, Oct. 2014.
- [209] S. Abbaspoor, S. Agbolaghi, and F. Abbasi, "Chemical and physical effects of processing environment on simultaneous single crystallization of biodegradable poly(ϵ -caprolactone) and poly(L-lactide) brushes and poly(ethylene glycol) substrate," *European Polymer Journal*, vol. 103, pp. 293–303, Jun. 2018.
- [210] C. X. Lam, S. H. Teoh, and D. W. Hutmacher, "Comparison of the degradation of polycaprolactone and polycaprolactone–(β -tricalcium phosphate) scaffolds in alkaline medium," *Polymer International*, vol. 56, no. 6, pp. 718–728, Jun. 2007.
- [211] L. A. Bosworth and S. Downes, "Physicochemical characterisation of degrading polycaprolactone scaffolds," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 95, no. 12, pp. 2269–2276, Dec. 2010.
- [212] O. Hartman *et al.*, "Biofunctionalization of electrospun PCL-based scaffolds with perlecan domain IV peptide to create a 3-D pharmacokinetic cancer model," *Biomaterials*, vol. 31, no. 21, pp. 5700–5718, Jul. 2010.
- [213] J. M. Miszuk *et al.*, "Functionalization of PCL-3D electrospun nanofibrous scaffolds for improved BMP2-induced bone formation," *Applied Materials Today*, vol. 10, pp. 194–202, Mar. 2018.
- [214] J. S. Stevens, A. C. de Luca, S. Downes, G. Terenghi, and S. L. M. Schroeder, "Immobilisation of cell-binding peptides on poly- ϵ -caprolactone (PCL) films: A comparative XPS study of two chemical surface functionalisation methods," *Surface and Interface Analysis*, vol. 46, no. 10–11, pp. 673–678, 2014.
- [215] G. Amokrane, C. Falentin-Daudré, S. Ramtani, and V. Migonney, "A Simple Method to Functionalize PCL Surface by Grafting Bioactive Polymers Using UV Irradiation," *IRBM*, vol. 39, no. 4, pp. 268–278, Aug. 2018.
- [216] L. A. Can-Herrera, A. Ávila-Ortega, S. de la Rosa-García, A. I. Oliva, J. V. Cauch-Rodríguez, and J. M. Cervantes-Uc, "Surface modification of electrospun polycaprolactone microfibers by air plasma treatment: Effect of plasma power and treatment time," *European Polymer Journal*, vol. 84, pp. 502–513, Nov. 2016.
- [217] M. Asadian *et al.*, "Plasma Functionalization of Polycaprolactone Nanofibers Changes Protein Interactions with Cells, Resulting in Increased Cell Viability," *ACS Appl. Mater. Interfaces*, vol. 10, no. 49, pp. 41962–41977, Dec. 2018.
- [218] C. Latz, G. Pavon-Djavid, G. Héлары, M. D. Evans, and V. Migonney, "Alternative Intracellular Signaling Mechanism Involved in the Inhibitory Biological Response of Functionalized PMMA-Based Polymers," *Biomacromolecules*, vol. 4, no. 3, pp. 766–771, May 2003.
- [219] P. Yammine, G. Pavon-Djavid, G. Helary, and V. Migonney, "Surface Modification of Silicone Intraocular Implants To Inhibit Cell Proliferation," *Biomacromolecules*, vol. 6, no. 5, pp. 2630–2637, Sep. 2005.
- [220] F. Anagnostou, A. Debet, G. Pavon-Djavid, Z. Goudaby, G. Héлары, and V. Migonney, "Osteoblast functions on functionalized PMMA-based polymers exhibiting Staphylococcus aureus adhesion inhibition," *Biomaterials*, vol. 27, no. 21, pp. 3912–3919, Jul. 2006.
- [221] S. Huot, G. Rohman, M. Riffault, A. Pinzano, L. Grossin, and V. Migonney, "Increasing the bioactivity of elastomeric poly(ϵ -caprolactone) scaffolds for use in tissue engineering," *Bio-Medical Materials and Engineering*, no. 4, pp. 281–288, 2013.

- [222] N. Djaker, S. Brustlein, G. Rohman, S. Huot, M. L. de la Chapelle, and V. Migonney, "Characterization of a synthetic bioactive polymer by nonlinear optical microscopy," *Biomedical Optics Express*, vol. 5, no. 1, p. 149, Jan. 2014.
- [223] A. Leroux, E. Maurice, V. Viateau, and V. Migonney, "Feasibility Study of the Elaboration of a Biodegradable and Bioactive Ligament Made of Poly(ϵ -caprolactone)-pNaSS Grafted Fibers for the Reconstruction of Anterior Cruciate Ligament: In Vivo Experiment," *IRBM*, Oct. 2018.
- [224] T. Ivanova, N. Grozev, I. Panaiotov, and J. E. Proust, "Role of the molecular weight and the composition on the hydrolysis kinetics of monolayers of poly(α -hydroxy acid)s," *Colloid Polym Sci*, vol. 277, no. 8, pp. 709–718, Aug. 1999.
- [225] H.-J. Sung, C. Meredith, C. Johnson, and Z. S. Galis, "The effect of scaffold degradation rate on three-dimensional cell growth and angiogenesis," *Biomaterials*, vol. 25, no. 26, pp. 5735–5742, Nov. 2004.
- [226] A. C. Vieira, J. C. Vieira, J. M. Ferra, F. D. Magalhães, R. M. Guedes, and A. T. Marques, "Mechanical study of PLA-PCL fibers during in vitro degradation," *J Mech Behav Biomed Mater*, vol. 4, no. 3, pp. 451–460, Apr. 2011.
- [227] I. Castilla-Cortázar, J. Más-Estellés, J. M. Meseguer-Dueñas, J. L. Escobar Ivirico, B. Marí, and A. Vidaurre, "Hydrolytic and enzymatic degradation of a poly(ϵ -caprolactone) network," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 97, no. 8, pp. 1241–1248, Aug. 2012.
- [228] D. C. França, E. B. Bezerra, D. D. de S. Morais, E. M. Araújo, and R. M. R. Wellen, "Hydrolytic and Thermal Degradation of PCL and PCL/Bentonite Compounds," *Materials Research*, vol. 19, no. 3, pp. 618–627, Apr. 2016.
- [229] G. P. Sailema-Palate, A. Vidaurre, A. J. Campillo-Fernández, and I. Castilla-Cortázar, "A comparative study on Poly(ϵ -caprolactone) film degradation at extreme pH values," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 130, pp. 118–125, Aug. 2016.
- [230] D. C. França, D. D. Morais, E. B. Bezerra, E. M. Araújo, and R. M. R. Wellen, "Photodegradation Mechanisms on Poly(ϵ -caprolactone) (PCL)," *Materials Research*, vol. 21, no. 5, Jul. 2018.
- [231] H. Samami and J. Pan, "A constitutive law for degrading bioresorbable polymers," *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, vol. 59, pp. 430–445, Jun. 2016.
- [232] K. Sevim and J. Pan, "A model for hydrolytic degradation and erosion of biodegradable polymers," *Acta Biomater*, vol. 66, pp. 192–199, 15 2018.
- [233] Q. Zhang, Y. Jiang, Y. Zhang, Z. Ye, W. Tan, and M. Lang, "Effect of porosity on long-term degradation of poly(ϵ -caprolactone) scaffolds and their cellular response," *Polymer Degradation and Stability*, vol. 98, no. 1, pp. 209–218, Jan. 2013.
- [234] G. Liao, S. Jiang, X. Xu, and Y. Ke, "Electrospun aligned PLLA/PCL/HA composite fibrous membranes and their in vitro degradation behaviors," *Materials Letters*, vol. 82, pp. 159–162, Sep. 2012.
- [235] P. S. P. Poh, D. W. Hutmacher, B. M. Holzapfel, A. K. Solanki, and M. A. Woodruff, "Data for accelerated degradation of calcium phosphate surface-coated polycaprolactone and polycaprolactone/bioactive glass composite scaffolds," *Data Brief*, vol. 7, pp. 923–926, Jan. 2016.
- [236] Y. Shi, J. Liu, L. Yu, L. Z. Zhong, and H. B. Jiang, " β -TCP scaffold coated with PCL as biodegradable materials for dental applications," *Ceramics International*, vol. 44, no. 13, pp. 15086–15091, Sep. 2018.
- [237] M. Marrese, V. Cirillo, V. Guarino, and L. Ambrosio, "Short-Term Degradation of Bi-Component Electrospun Fibers: Qualitative and Quantitative Evaluations via AFM Analysis," *J Funct Biomater*, vol. 9, no. 2, Mar. 2018.
- [238] M. A. Basile *et al.*, "Functionalized PCL/HA nanocomposites as microporous membranes for bone regeneration," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 48, pp. 457–468, Mar. 2015.
- [239] L. Ghasemi-Mobarakeh, M. P. Prabhakaran, M. Morshed, M. H. Nasr-Esfahani, and S. Ramakrishna, "Bio-functionalized PCL nanofibrous scaffolds for nerve tissue engineering," *Materials Science and Engineering: C*, vol. 30, no. 8, pp. 1129–1136, Oct. 2010.
- [240] K. J. Livak and T. D. Schmittgen, "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ Method," *Methods*, vol. 25, no. 4, pp. 402–408, Dec. 2001.
- [241] B. Nie, J. Stutzman, and A. Xie, "A Vibrational Spectral Maker for Probing the Hydrogen-Bonding Status of Protonated Asp and Glu Residues," *Biophysical Journal*, vol. 88, no. 4, pp. 2833–2847, Apr. 2005.
- [242] E. Rosqvist *et al.*, "Human dermal fibroblast proliferation controlled by surface roughness of two-component nanostructured latex polymer coatings," *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, vol. 174, pp. 136–144, Feb. 2019.
- [243] C. J. Sullivan and C. F. Cooper, "Polyester weatherability: couplong frontier molecular orbital calculations of oxidative stability with accelerated testing," *J. Coat. Technol.*, vol. 67, no. 847, Aug. 1995.

- [244] K. Nawata, "Tensile properties of rat anterior cruciate ligament in collagen induced arthritis," *Annals of the Rheumatic Diseases*, vol. 60, no. 4, pp. 395–398, Apr. 2001.
- [245] W. A. Romani, S. M. Belkoff, and J. H. Elisseeff, "Testosterone may increase rat anterior cruciate ligament strength," *The Knee*, vol. 23, no. 6, pp. 1069–1073, Dec. 2016.
- [246] I. Yucel, E. Karaca, K. Ozturan, Ü. Yildirim, S. Duman, and E. Degirmenci, "Biomechanical and histological effects of intra-articular hyaluronic acid on anterior cruciate ligament in rats," *Clinical Biomechanics*, vol. 24, no. 7, pp. 571–576, Aug. 2009.
- [247] A. Ventura, C. Terzaghi, C. Legnani, E. Borgo, and W. Albiglietti, "Synthetic grafts for anterior cruciate ligament rupture: 19-year outcome study," *The Knee*, vol. 17, no. 2, pp. 108–113, Mar. 2010.
- [248] V. Viateau, M. Manassero, F. Anagnostou, S. Guérard, D. Mitton, and V. Migonney, "Biological and Biomechanical Evaluation of the Ligament Advanced Reinforcement System (LARS AC) in a Sheep Model of Anterior Cruciate Ligament Replacement: A 3-Month and 12-Month Study," *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, vol. 29, no. 6, pp. 1079–1088, Jun. 2013.
- [249] P. Zhao, F. Han, P. Zhang, Y. Sun, C. Lin, and J. Chen, "Hydroxyapatite-doped polycaprolactone nanofiber membrane improves tendon–bone interface healing for anterior cruciate ligament reconstruction," *International Journal of Nanomedicine*, p. 7333, Dec. 2015.
- [250] G. Yang, H. Lin, B. B. Rothrauff, S. Yu, and R. S. Tuan, "Multilayered polycaprolactone/gelatin fiber-hydrogel composite for tendon tissue engineering," *Acta Biomaterialia*, vol. 35, pp. 68–76, Apr. 2016.
- [251] G. Wu, X. Deng, J. Song, and F. Chen, "Enhanced biological properties of biomimetic apatite fabricated polycaprolactone/chitosan nanofibrous bio-composite for tendon and ligament regeneration," *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, vol. 178, pp. 27–32, Jan. 2018.
- [252] S. Sahoo, J. G. Cho-Hong, and T. Siew-Lok, "Development of hybrid polymer scaffolds for potential applications in ligament and tendon tissue engineering," *Biomedical Materials*, vol. 2, no. 3, pp. 169–173, Sep. 2007.
- [253] A. Bayar, S. Sarikaya, S. Keser, S. Ozdolap, I. Tuncay, and A. Ege, "Regional bone density changes in anterior cruciate ligament deficient knees: a DEXA study," *Knee*, vol. 15, no. 5, pp. 373–377, Oct. 2008.
- [254] N. Vilayphiou, "Evaluation de la microarchitecture trabéculaire et des propriétés mécaniques osseuses in vivo chez l'humain par scanner périphérique à haute résolution : application clinique à l'ostéoporose. Médecine humaine et pathologie.," Thèse de doctorat, Claude Bernard, Lyon I, 2010.
- [255] A. Di Martino *et al.*, "Increased bone mineral density in the non-resurfaced patella after total knee arthroplasty: A clinical and densitometric study," *The Surgeon*, vol. 10, no. 1, pp. 20–24, Feb. 2012.

Implant ligamentaire bioactif et biodégradable : élaboration, fonctionnalisation et étude des mécanismes

La rupture du ligament croisé antérieur du genou est une affection fréquente qui survient majoritairement chez des sujets jeunes et sportifs. Une fois rompu, en raison de sa localisation intra articulaire et de la pauvreté de sa vascularisation, ce ligament ne cicatrise pas spontanément. Le traitement chirurgical de référence, l'autogreffe, présente de nombreux inconvénients et les travaux de recherche se tournent vers le développement d'implants ligamentaires synthétiques. Dans ce contexte, l'objectif de la thèse était d'étudier la possibilité d'élaborer un nouveau ligament bioactif et biodégradable en polycaprolactone (PCL) greffé de poly(styrène sulfonate de sodium) (pNaSS). Les résultats présentés dans ce manuscrit décrivent toutes les étapes du choix initial de la PCL brute à sa caractérisation, sa fonctionnalisation, ses propriétés mécaniques après élaboration, au mécanisme de dégradation et à son impact biologique *in vitro* et *in vivo*. À l'interface des disciplines de l'ingénierie, de la chimie, de la mécanique et de la biologie, nous avons montré que : le greffage de pNaSS accélère la dégradation de la PCL tout en protégeant la surface durant les six premiers mois ; que les propriétés mécaniques de la PCL sont adaptées à une application ligamentaire ; que le greffage de pNaSS favorise *in vitro* la vitesse de croissance, la distribution, la densité et l'étalement cellulaires, la production de facteur de croissance et le maintien de l'expression génique ; et enfin que le greffage de pNaSS permet *in vivo* de diminuer l'inflammation articulaire et l'arthrose post-opératoire tout en favorisant la recolonisation tissulaire.

Mots-clés : Polymère, fonctionnalisation, implant, ligament

Bioactive and biodegradable implant for ligament reconstruction: design, functionalization and mechanism study

The rupture of the anterior cruciate ligament of the knee is a common affection which mainly occurs in young and active population. Because of its joint location and its poor vascularization, this ligament does not heal spontaneously. The "gold-standard", consisting of using autograft, has many disadvantages and the research focuses on the development of synthetic ligament implants. In this context, this thesis studies and evidences the possibility of a new ligament with bioactive and biodegradable features, made of polycaprolactone (PCL) grafted with poly(sodium styrene sulfonate) (pNaSS). The results presented in this manuscript evaluate the initial choice of raw PCL, its characterization, its functionalization, its mechanical properties after processing, its degradation mechanism and its *in vitro* and *in vivo* biological impact. At the interface of engineering, chemistry, mechanics and biology fields, we demonstrated that: the pNaSS grafting accelerates the PCL degradation while protecting the surface during the first six months; the mechanical properties of PCL are adapted to the ligament application; *in vitro* the pNaSS grafting promotes cell growth, cell distribution, cell density, cell spread, growth factor production, and maintenance of gene expression; and finally that *in vivo* the pNaSS grafting allows to reduce joint inflammation and postoperative osteoarthritis while promoting tissue recolonization.

Keywords: polymer, functionalization, implant, ligament