



HAL
open science

Hydrogels denses collagène/acide hyaluronique par biofabrication pour le développement d'un nouveau modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus

Stéphanie De Oliveira

► **To cite this version:**

Stéphanie De Oliveira. Hydrogels denses collagène/acide hyaluronique par biofabrication pour le développement d'un nouveau modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus. Ingénierie biomédicale. Sorbonne Université, 2023. Français. NNT : 2023SORUS307 . tel-04297764

HAL Id: tel-04297764

<https://theses.hal.science/tel-04297764>

Submitted on 21 Nov 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.

Sorbonne Université

Ecole doctorale n°397 : Physique et Chimie des Matériaux

Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris

**Hydrogels denses collagène/acide hyaluronique par
biofabrication pour le développement d'un nouveau modèle *in
vitro* d'Annulus Fibrosus**

Présentée et soutenue publiquement par

Stéphanie DE OLIVEIRA

le 06 Octobre 2023

Thèse de doctorat en ingénierie tissulaire
dirigée par Christophe HELARY

Devant le jury composé de :

Alexandra MONTEBAULT	Professeure, Université de Lyon 1, France	Rapporteuse
Didier LE CERF	Professeur, Université de Rouen, France	Rapporteur
David EGLIN	Professeur, Ecole des Mines de Saint Etienne France	Examinateur
Nadège PANTOUSTIER	Maître de conférences, Ecole Supérieure de Physique et de Chimie Industrielle, France	Examinatrice
Emmanuel BELAMIE	Professeur, Ecole Pratique des Hautes Etudes France	Président du jury
Christophe HELARY	Ingénieur de recherche, Sorbonne Université, France	Directeur de thèse

Remerciements

En premier lieu, j'aimerais remercier Christian Bonhomme et François Ribot pour m'avoir permis d'effectuer ma thèse au sein du LCMCP. Sans l'Agence Nationale de la Recherche et l'Ecole Doctorale de Physique et Chimie des Matériaux, cette aventure aurait été impossible alors merci d'avoir débloqué un si beau projet.

J'aimerais également remercier les membres de mon jury qui ont accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci à mes deux rapporteurs, Alexandra Montembault et Didier Le Cerf, qui, après quelques heures/journées/semaines, sont parvenues au bout de ce manuscrit. J'espère que vous aurez apprécié ma prose durant ces quelques pages résumant ces trois dernières années. Merci également à mes examinateurs : Nadège Pantoustier, Emmanuel Belamie et David Eglin. Je n'aurais pas pu espérer une équipe plus complète que celle-ci.

Je remercie tout particulièrement Christophe Hélyary de m'avoir permis d'entrer dans cette belle aventure en me donnant ma chance, de m'avoir conseillé et supervisé pendant ces trois dernières années.

Bien entendu, ce projet faisant partie d'un projet international, j'aimerais remercier tous les membres du consortium INDEED. Merci Mattéo D'este, Gregor Miklosic et Sébastien Grastilleur pour votre présence et vos conseils avisés lors de nos « Technical meeting ». Merci à Jérôme Guicheux et Catherine Levisage, pour qui les cellules (et les fondues suisses bien sûr) n'ont aucun secret ! Enfin, merci à Stephen Ferguson pour sa présence et surtout, bon courage pour assembler notre disque.

Des résultats ne se faisant pas seuls, j'aimerais remercier toutes les personnes ayant contribué à ceux-ci et en particulier Julien Dumont pour les observations au confocale et Joëlle Véziers pour les observations au Cryo-MEB.

Plus spécialement, je voudrais remercier Tamara Rojas pour son travail et sa motivation lors de son stage de M2 à mes côtés. Comme on se l'était dit, on a formé une belle équipe et c'est ce qui nous a permis d'avoir de si beaux résultats en cette fin de thèse. Merci.

Hélène, Nora, Diana, Corinne et Simon merci à vous 5 ! Merci pour votre disponibilité, votre bienveillance et votre soutien pendant cette belle (et difficile) aventure qu'est la thèse.

Je remercie tous les membres du LCMCP et plus particulièrement l'équipe Matbio sans qui, rien n'aurait été possible. Soyez indulgents, mes mots ne seront sûrement pas à la hauteur de ce que vous m'avez apporté pendant ces 3 ans.

Gervaise, notre group leader, ta sagesse, tes conseils avisés mais surtout nos moments partagés autour de peaux d'oranges ou encore de bananes m'ont permis d'arriver jusqu'ici alors merci.

Thibaud, merci pour ta bonne humeur et tes conseils avisés qui nous ont permis d'apparaître ensemble en tête d'article.

Francisco, les souvenirs sont nombreux et rarement ils ont commencé par un sourire... Merci de m'avoir accompagné que ce soit en DSC, en rhéologie ou même en général. Tes connaissances me semblent infinies et ton aide, inestimable. Parce que les plus belles réussites passent toujours par des moments plus difficiles, merci à toi.

Léa, Sylvie et Bernard, je vous remercie pour votre présence et votre bienveillance.

Isabelle, Alshaba, Minaine, Océane, Marie, Katsuya, Camille, Daline, Korin, Enguerran, Corentin, Blaise et Florian : on a formé une équipe de non perm fantastique. Merci pour tous ces moments de team building partagés même quand l'organisation n'était pas parfaite.

Quelques mentions spéciales sont à donner au bureau 412 alias La Jungle. Isabelle, Alshaba, Katsuya, Camille, Alexandre, Amel, Anthony et Naomi : le bureau 412 alias La Jungle était vraiment le meilleur. Merci pour ces moments de rire, de soutien, de bubble tea, de conseils, de goûter, ... Bref merci de votre présence.

Marie, je te remercie pour toute l'expertise que tu as pu m'apporter en plus de nos repas et multiples discussions partagés.

Océane, ma partenaire en Team Building, merci à toi pour ta bonne humeur et tous les moments partagés ensemble. On aura construit les plus beaux team building de Matbio.

Minaine, tu m'as permis de terminer cette thèse en beauté. Je ne pourrais jamais assez te remercier d'avoir été une collègue et une amie présente et à l'écoute. Que cette amitié perdure dans le temps.

Je ne serais jamais arrivée là où j'en suis sans mes proches.

Sophie, Pepita, Wiwi, vous avez été le soleil à travers les nuages de cette aventure. Merci pour votre patience mais surtout pour vos rires et votre soutien sans faille depuis maintenant 8 ans.

Maman, papa, on dit que tout vient de quelque part. Aujourd'hui, ce livre est le fruit (de 1/3) de ce que vous avez construit. Rendez-vous au tome 2 pour une aventure encore plus belle.

Sandrine & Valentin, merci d'avoir ajouté du merveilleux à cette thèse de la 1^{ère} à la 3^{ème} année.

Sandrine & Chloé, que dire de plus que « tes meilleures amies dans la vie sont tes sœurs ». Encore une ligne d'arrivée qu'on passe ensemble. Je vous remercie d'avoir su être présentes, me motiver et surtout me changer les idées quand j'en avais besoin.

Olivier, tu es ma force au quotidien. Il y a 8 ans, tu me disais qu'on était « une équipe de choc » et bien je te dis 8 ans après : « on ne change pas une équipe qui gagne ». Merci d'avoir toujours été présent, à l'écoute et de bons conseils et surtout d'avoir changé si souvent mes larmes en sourire. Quelques étapes de passées et d'autres sont à venir, on brillera ensemble.

Enfin, j'aimerais dédier ce travail à mes grands-parents qui ont été mon exemple de force et de courage sans faille jusqu'au bout de cette thèse. Papi, un jour, je t'ai dit que je voulais être médecin. Tu m'as encouragé et répondu que je serai un bon docteur. Je ne pensais pas à ce genre de docteur mais tu avais raison. Ce jour est arrivé... Merci.

Table des matières

Remerciements	3
Table des matières	7
Liste des abréviations	13
Introduction générale	15
Etat de l'art sur le disque intervertébral et les biomatériaux utilisés pour sa modélisation	19
Chapitre 1 : Le disque intervertébral sain	20
I. Structure	20
1. <i>La colonne vertébrale et le disque</i>	20
2. <i>Le Nucleus Pulposus</i>	21
3. <i>L'Annulus Fibrosus</i>	24
4. <i>Les plateaux cartilagineux</i>	26
II. Environnement cellulaire	27
1. <i>La matrice extra-cellulaire du disque intervertébral</i>	27
2. <i>Les cellules du Nucleus Pulposus</i>	28
3. <i>Les cellules de l'Annulus Fibrosus</i>	29
III. Biomécanique et vieillissement	30
1. <i>La biomécanique du disque intervertébral</i>	30
2. <i>Vieillessement mécanique</i>	32
Chapitre 2 : La dégénérescence du disque intervertébral	34
I. Facteurs de dégénérescence	34
II. Mécanisme de dégénérescence	35
III. Des traitements existants insuffisants	37
1. <i>Les traitements non chirurgicaux</i>	37
2. <i>Les traitements chirurgicaux</i>	37
3. <i>Les thérapies cellulaires</i>	38
Chapitre 3 : Les modèles de disque intervertébral	40
I. Les modèles <i>in vitro</i> du Nucleus Pulposus	40
1. <i>Les modèles à base de polymères synthétiques</i>	41

2.	<i>Les modèles à base de polymères naturels</i>	44
II.	Les modèles <i>in vitro</i> d'Annulus Fibrosus	49
1.	<i>Les modèles à base de polymères synthétiques</i>	49
2.	<i>Les modèles à base de polymères naturels</i>	53
III.	Modèles de disque intervertébral	57
1.	<i>Simulation informatique de la mécanique d'un modèle de disque intervertébral</i>	57
2.	<i>Les modèles in vitro de disques intervertébraux</i>	59
Chapitre 4 : Les biopolymères en ingénierie tissulaire		66
I.	Le collagène	66
1.	<i>Intérêt du collagène en ingénierie tissulaire</i>	66
2.	<i>Composition et structure</i>	67
3.	<i>Gélification du collagène in vitro</i>	69
4.	<i>Cellularisation d'hydrogels de collagène</i>	71
II.	L'acide hyaluronique	72
1.	<i>Intérêt de l'acide hyaluronique en ingénierie tissulaire</i>	72
2.	<i>Structure de l'acide hyaluronique</i>	73
3.	<i>La fonctionnalisation nécessaire à la gélification de l'acide hyaluronique</i>	74
4.	<i>Cellularisation d'hydrogels d'acide hyaluronique</i>	81
III.	Les hydrogels de collagène et d'acide hyaluronique	82
1.	<i>Interactions physico-chimiques</i>	82
2.	<i>Biomatériaux collagène / acide hyaluronique</i>	85
Chapitre 5 : L'impression 3D au service de l'ingénierie tissulaire		94
I.	Généralités sur les différentes techniques d'impression 3D	94
II.	L'impression 3D par extrusion	97
1.	<i>Bioimpression vs impression 3D</i>	97
2.	<i>Les différents types d'encres</i>	98
III.	L'impression 3D du collagène	100
IV.	L'impression 3D de l'acide hyaluronique	104
V.	L'impression 3D de composites collagène/acide hyaluronique	107
Objectifs de thèse		111
Matériel & Méthodes		113
I.	Le collagène de Type I	114
1.	<i>Extraction et purification du collagène</i>	114
2.	<i>Electrophorèse du collagène</i>	116

3.	<i>Dosage d'hydroxyproline</i>	117
4.	<i>Fibrillogénèse et gélification du collagène</i>	118
5.	<i>Préparation des solutions stocks de collagène par dialyse</i>	120
6.	<i>Concentration du collagène par évaporation</i>	120
II.	<i>L'acide hyaluronique fonctionnalisé à la Tyramine (THA)</i>	120
1.	<i>Fonctionnalisation de l'acide hyaluronique</i>	120
2.	<i>Réticulations chimiques de l'acide hyaluronique</i>	122
III.	<i>Fabrication d'hydrogels collagène/THA</i>	124
1.	<i>Préparation des hydrogels en phase diluée</i>	124
2.	<i>Formulation de l'encre dense collagène/THA pour l'impression 3D</i>	125
IV.	<i>Impression 3D par extrusion</i>	125
V.	<i>Imprégnation post-impression 3D des hydrogels de collagène avec du THA</i>	127
VI.	<i>La culture cellulaire</i>	128
1.	<i>Décongélation et mise en culture</i>	128
2.	<i>Culture 2D et 3D sur les hydrogels imprimés en 3D</i>	130
VII.	<i>Caractérisations physicochimiques des matériaux</i>	131
1.	<i>Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR)</i>	131
2.	<i>Ultrastructure observée par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et Cryo-MEB</i>	133
3.	<i>Evaluation de l'anisotropie du collagène par Microscopie Optique à Lumière Polarisée (MOLP)</i>	135
4.	<i>Détection de la présence d'acide hyaluronique par coloration histologique</i>	136
5.	<i>Caractérisation de la stabilité thermique du collagène par Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC)</i>	137
6.	<i>Mesures rhéologiques</i>	139
7.	<i>Analyses statistiques</i>	143
VIII.	<i>Evaluation de la bioactivité du modèle d'Annulus Fibrosus imprimé</i>	144
1.	<i>Mesure de l'activité métabolique par le test Alamar Blue</i>	144
2.	<i>Mesure de la viabilité cellulaire via le test Live/Dead</i>	146
3.	<i>Morphologie et migration cellulaire ciblées par marquage à la phalloïdine Alexa 488 et au DAPI</i>	147
4.	<i>Analyses statistiques</i>	148

Etude physicochimique de compatibilité entre collagène et acide hyaluronique (THA) _____ **149**

Chapitre 1 : Les interactions entre collagène et THA en solution _____ 151

I. Effet du pH sur les interactions entre collagène et THA en solution _____	151
II. Effet de la force ionique sur la formation des complexes polyioniques _____	153
Chapitre 2 : La fibrillogénèse du collagène à partir des mélanges collagène/THA _____	157
I. Impact de la formation de complexes polyioniques sur la structure fibrillaire du collagène _____	157
II. Etude des interactions entre collagène et acide hyaluronique après gélification du collagène _____	161
1. <i>Nature des interactions impliquées dans le phénomène de complexation</i> _____	161
2. <i>Méthode de différenciation des hydrogels avec ou sans CPI</i> _____	163
Chapitre 3 : Gélification de l'acide hyaluronique par réticulation chimique _____	167
I. Réticulation enzymatique à la Peroxydase de Raifort (HRP) _____	167
1. <i>Optimisation des paramètres de réticulation enzymatique du THA</i> _____	167
2. <i>Transposition aux hydrogels collagène/THA</i> _____	168
3. <i>Pré-réticulation du THA suivie de la fibrillogénèse du collagène</i> _____	171
4. <i>Renforcement des hydrogels par imprégnation du THA</i> _____	174
II. Photoréticulation de l'acide hyaluronique dans les hydrogels collagène/THA _____	176
1. <i>Photoréticulation à la riboflavine</i> _____	176
2. <i>Photoréticulation à l'éosine Y et à la lumière verte</i> _____	181
3. <i>Réticulation enzymatique vs photoréticulation</i> _____	185
Conclusion de l'étude physicochimique _____	190

Développement d'un modèle d'Annulus Fibrosus cellularisé par impression

3D _____	193
Chapitre 1 : Impression 3D de matrices collagène/acide hyaluronique _____	195
I. Formulation des encres _____	195
1. <i>L'encre de collagène</i> _____	195
2. <i>L'encre collagène/THA</i> _____	196
II. Paramètres d'impression des encres _____	199
1. <i>L'encre de collagène</i> _____	199
2. <i>L'encre collagène/THA</i> _____	205
III. Fabrication des matrices anisotropes collagène/THA _____	209
1. <i>Etude préliminaire de cytotoxicité du procédé sur des fibroblastes</i> _____	209
2. <i>Protocole d'imprégnation</i> _____	213
3. <i>Protocole standard</i> _____	218
Chapitre 2 : Cellularisation des matrices lamellaires anisotropes _____	222

I. Dépôt de cellules à la surface de la lamelle d'hydrogel _____	222
1. <i>Optimisation des paramètres de dépôt</i> _____	222
2. <i>Génération de lamelles d'hydrogels cellularisées</i> _____	224
II. Développement d'un modèle d'Annulus Fibrosus _____	232
1. <i>Fabrication des « sandwichs » cellularisés</i> _____	232
2. <i>Etude comparative de la bioactivité liée aux protocoles standard et d'imprégnation</i> ____	235
3. <i>Amélioration de la bioactivité et de la biocompatibilité du protocole d'imprégnation</i> __	241
Conclusion sur le développement d'un modèle d'Annulus Fibrosus par impression 3D _____	245
Conclusions & perspectives _____	247
Production scientifique _____	253
Références _____	282
Résumé _____	300
Abstract _____	302

Liste des abréviations

NP : Nucleus Pulposus

AF : Annulus Fibrosus

DIV : Disque intervertébral

MEC : Matrice extra-cellulaire

GAG : Glycosaminoglycane

CPI : Complexes Polyioniques

HA : Acide hyaluronique

THA : Acide hyaluronique fonctionnalisé avec une Tyramine

PEG : Polyéthylène glycol

GelMA : Gélatine méthacrylate

HAMA : Acide hyaluronique méthacrylate

ASC : Cellules souches adipeuses

PBS : Tampon phosphate salin

HRP : Peroxydase de Raifort

MSC : Cellules souches mésenchymateuses

PCL : Polycaprolactone

BM-MSc : Cellules souches mésenchymateuses de la moëlle osseuse

PLLA : Acide poly-L-lactique

H&E : Hématoxyline & éosine

MOLP : Microscopie Optique à Lumière Polarisée

MEB : Microscopie Electronique à Balayage

DSC : Calorimétrie à Balayage Différentiel

GHS : Génération de Seconde Harmonique

MET : Microscope Electronique à Transmission

Cryo-MEB : Microscopie Electronique à Balayage Cryogénique

Introduction générale

Les maux de dos ou lombalgies sont aujourd'hui considérés comme une maladie invalidante par l'Organisation Mondiale pour la Santé ("Musculoskeletal health," n.d.). La lombalgie touche plus de 570 millions de personnes dans le monde et représente 33 % des affections ostéo-articulaires et musculaires. Cette pathologie se caractérise par des douleurs intenses au niveau des vertèbres dans la zone lombaire de la colonne vertébrale ("Définition, causes et symptômes de la lombalgie," n.d.). La dégénérescence du disque intervertébral représente 50 % des cas de lombalgie chronique (Adams and Roughley, 2006). Il s'agit d'un mécanisme irréversible qui survient avec l'âge et l'usure des disques intervertébraux (DIV). Face à une population de plus en plus vieillissante, cela en fait donc un problème socio-économique important. Par exemple, aux USA, le coût annuel estimé pour cette pathologie était de 253 milliards de dollars en 2012 (Yelin et al., 2016). Dans certains pays, cela touche jusqu'à 1 % du PIB national ("Lombalgie. Statistique - Risques - INRS," n.d.). En tout, 2/3 des coûts sont liés aux arrêts de travail et aux congés maladie ce qui provoque une baisse de productivité économique.

Les disques intervertébraux sont composés de trois parties : le Nucleus Pulposus au centre, l'Annulus Fibrosus autour et les plateaux cartilagineux situés de part et d'autre. Lorsqu'il dégénère, le Nucleus Pulposus fuit à travers l'Annulus Fibrosus pour exercer une pression sur les nerfs provoquant les douleurs intenses. Nous sommes alors dans le cas d'une hernie discale. La dégénérescence du disque intervertébral est irréversible et fait l'objet de trois types de traitements. Au début de la pathologie, des traitements non chirurgicaux de type kinésithérapie ou injection de corticoïdes, qui ont pour but de soulager la douleur, peuvent être prescrits. Ces traitements ne traitent pas la cause de la maladie et sont inefficaces à long terme. Les traitements chirurgicaux sont envisagés quand la douleur est trop intense, par exemple via une discectomie qui consiste à l'ablation de la partie herniée du disque. La fusion des vertèbres est également très répandue. Cependant, tout comme les traitements non-chirurgicaux, ils ne font que supprimer les symptômes sans arrêter la dégénérescence. De nouveaux traitements de thérapie cellulaire sont en cours de développement. Pour certains d'entre eux, une étude clinique est en cours mais ces traitements ne permettent pas de régénérer la hauteur du disque et des fuites cellulaires sont souvent observées. Si aucun des trois types de traitements aujourd'hui appliqués n'est efficace, c'est avant tout car la maladie est méconnue. Les mécanismes de dégénérescence ne sont pas totalement élucidés et beaucoup de zones d'ombres persistent.

Afin de mieux comprendre la maladie, des modèles peuvent être utilisés. Parmi les modèles utilisés, on distingue les modèles *in vitro* et les modèles *in vivo*. Les modèles *in vivo* utilisés étant des animaux quadrupèdes, les forces exercées sur les disques intervertébraux ne sont pas les

mêmes que pour les bipèdes ce qui en fait des modèles inappropriés pour l'étude de cette pathologie. Parmi les modèles *in vitro* développés, aucun ne permet de mimer à la fois l'environnement biochimique, l'architecture complexe, et les propriétés mécaniques du disque. C'est pourquoi il est nécessaire de développer de nouveaux modèles *in vitro* pouvant satisfaire ces trois critères.

De cette volonté de développer un nouveau modèle *in vitro* de disque intervertébral, s'est créé un consortium international autour d'un projet de recherche collaborative international financé par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR-PRCI, Projet INDEED). Ce consortium se compose de 4 équipes de recherche localisées en France et en Suisse : AO Research Institute Davos (ARI), l'Institut pour la biomécanique à l'Ecole Polytechnique de Zürich (ETH), le Laboratoire « Regenerative Medicine and Skeleton » (RMeS) à Nantes et le Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris (LCMCP). Le projet s'articule autour de quatre principaux objectifs dont chacun est menée par l'un des laboratoires. ARI a pour objectif de développer un matériau à base d'acide hyaluronique et de collagène afin de modéliser le Nucleus Pulposus. Le Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée de Paris se concentre sur le développement d'un matériau composé des mêmes biopolymères, pour modéliser l'Annulus Fibrosus. Le laboratoire RMeS qui possède une expertise en culture cellulaire, se focalise sur l'évaluation de la bioactivité et de la biocompatibilité des deux matériaux avec des cellules de NP ou d'AF. Enfin, le laboratoire de biomécanique à l'ETH Zürich a pour objectif final d'assembler les deux matériaux afin de produire un modèle de disque intervertébral complet.

C'est dans le cadre de cette collaboration internationale que s'inscrit ma thèse. Durant celle-ci, j'ai eu pour objectif principal de développer un modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus à base de collagène et d'acide hyaluronique possédant la majorité de ses caractéristiques physiques et biochimiques. Mon manuscrit de thèse se compose de quatre parties.

La première partie de ce manuscrit présente l'état de l'art qui a servi de cadre à mon projet. Après avoir décrit la structure et le fonctionnement d'un disque intervertébral sain, un état des lieux de sa dégénérescence et des traitements mis en place est proposé. Les modèles développés à ce jour sont également présentés afin d'évaluer les manques à combler dans le domaine. L'un des prérequis de ce travail de thèse est de modéliser l'environnement biochimique de l'Annulus Fibrosus. Notre modèle s'appuie donc sur l'utilisation du collagène pour modéliser la partie fibreuse du tissu et de l'acide hyaluronique pour apporter l'hydratation nécessaire. C'est pourquoi, un chapitre est consacré à ces deux biopolymères et à leurs interactions. Pour compléter l'état de l'art, l'impression 3D fait l'objet d'un dernier chapitre pour présenter la technique principale qui est utilisée pour élaborer ce modèle 3D d'Annulus Fibrosus.

La seconde partie permettra de recenser les outils méthodologiques utilisés pendant mon doctorat. Parmi ces méthodologies seront présentés la préparation des biopolymères, l'impression 3D et la cellularisation des hydrogels mais aussi tous les outils de caractérisation qui ont été utilisés.

La troisième partie de cette thèse présentera une étude physicochimique qui a pour objectif de mieux comprendre les interactions entre l'acide hyaluronique et le collagène. En effet, lorsqu'ils sont mélangés, l'acide hyaluronique et le collagène forment des complexes polyioniques (CPI). Ce phénomène de complexation mène à la formation de solutions hétérogènes qui précipitent. Or, pour élaborer un matériau par impression 3D, il est primordial de développer une encre qui soit homogène, imprimable avec des propriétés définies. Afin d'obtenir une telle encre, des stratégies ont été mises en place pour étudier la formation de CPI en phase diluée et de trouver des conditions physico chimiques douces permettant de les inhiber. On entend par « douces », des conditions compatibles avec la survie cellulaire.

Enfin, la dernière partie de ce manuscrit porte sur la fabrication du modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus. Dans un premier temps, des encres sont formulées en accord avec les résultats de la partie physicochimique puis mises en forme par impression 3D pour produire des lamelles mimant celles de l'AF. Dans un second temps, les hydrogels imprimés sous forme de lamelles ont été cellularisés avec des fibroblastes pour évaluer leur bioactivité. Cette cellularisation a lieu en deux temps puisqu'elle a d'abord été effectuée au-dessus d'une unique lamelle puis en confinement entre deux lamelles. Si notre matériau satisfait les trois critères cités plus haut, il pourra être validé comme nouveau modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus.

Etat de l'art sur le disque intervertébral et les biomatériaux utilisés pour sa modélisation

Résumé

Ce chapitre passera en revue l'état de l'art permettant de poser un cadre à notre projet. Dans un premier temps, la structure, la biomécanique ainsi que l'environnement biologique du disque intervertébral seront étudiés. Par la suite, une partie sera consacrée à sa dégénérescence ainsi qu'aux traitements les plus courants. Un état des lieux des modèles existants ainsi que de ceux en cours de développement sera ensuite effectué. Finalement, après étude des deux biopolymères sélectionnés pour ce projet qui sont l'acide hyaluronique et le collagène, nous finirons avec la présentation de l'impression 3D et des matériaux déjà élaborés.

Chapitre 1 : Le disque intervertébral sain

I. Structure

1. La colonne vertébrale et le disque

La colonne vertébrale permet le soutien et la mobilité de la partie supérieure du corps (Moll and Wright, 1971). Il s'agit d'un assemblage de vertèbres séparées par des amortisseurs appelés disques intervertébraux (Figure 1(A)). Les disques intervertébraux ou DIV sont présents au nombre de 25 mesurant en moyenne 4 cm en largeur et 7 à 10 mm en épaisseur (Raj, 2008). Ils permettent de faire la jonction entre les vertèbres et sont organisés par zones (Humzah and Soames, 1988). Six d'entre eux sont en zone cervicale, 12 en zone thoracique, 6 en zone lombaire et enfin 1 entre le sacrum et le coccyx. Leur rôle est de créer un espace déformable entre les corps vertébraux pour donner de la flexibilité à la colonne tout en amortissant les chocs (Humzah and Soames, 1988).

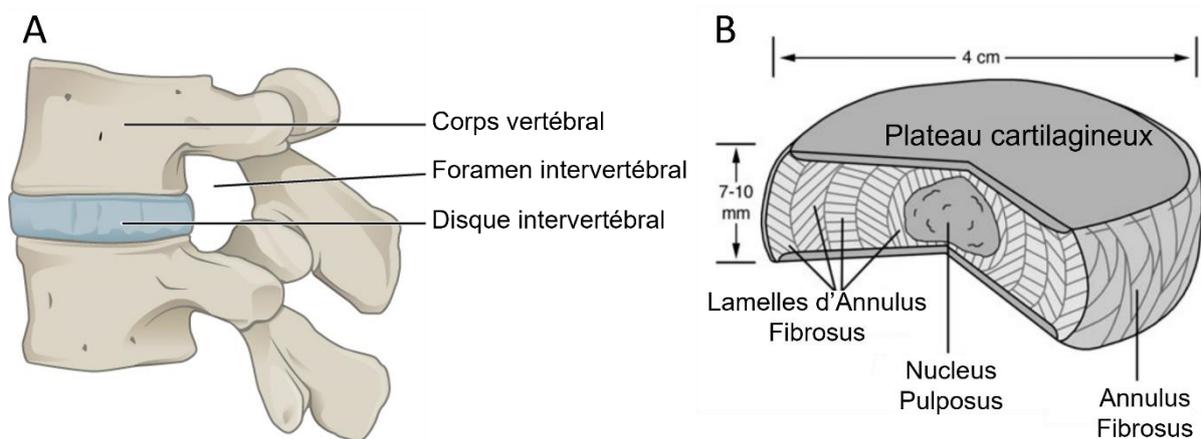


Figure 1 : (A) Schéma d'un disque intervertébral situé entre deux vertèbres de la colonne vertébrale (College, 2013) et (B) Schéma transversal d'un disque intervertébral composé de plateaux cartilagineux, d'un Nucleus Pulposus et d'un Annulus Fibrosus (Raj, 2008).

Les disques intervertébraux sont composés de trois parties (Figure 1(B)). De part et d'autre d'un disque intervertébral se trouvent les plateaux cartilagineux assurant la liaison avec les vertèbres. Au centre du disque se trouve le Nucleus Pulposus (NP) qui est un tissu mou hautement hydraté. Il s'agit d'un amortisseur hydraulique permettant la redistribution des forces vers l'extérieur (Van Den Hooff, 1964). Le NP est confiné par des lamelles concentriques fibreuses anisotropes qui forment l'Annulus Fibrosus (AF). NP et AF sont différents à bien des égards mais leur limite n'est pas définie. La zone de transition entre ces deux tissus est sous forme d'un gradient de l'intérieur vers l'extérieur. La densité fibrillaire, la distance extrafibrillaire ainsi

que la composition du NP se modifie progressivement pour aboutir à la structure de l'AF (Taylor et al., 1981).

La structure et la composition du disque sont amenées à changer selon son stade d'évolution. Par exemple, une vascularisation importante a été observée pendant le développement embryonnaire du disque mais une fois mature, cette vascularisation disparaît pour laisser place à une structure avasculaire (Crock and Goldwasser, 1984; Fournier et al., 2020; Hassler, 1969). C'est donc par des mécanismes de diffusion que s'effectuent les apports nutritionnels et d'oxygène du disque mature. La source de cette diffusion se fait à la périphérie du disque par des vaisseaux adjacents présents dans les vertèbres adjacentes. A proximité des disques intervertébraux, se trouve la racine nerveuse spinale et les nerfs sinuvertébraux pouvant provoquer de fortes douleurs s'ils sont comprimés.

2. Le Nucleus Pulposus

Le Nucleus Pulposus est un tissu mou situé au centre du disque intervertébral agissant comme un amortisseur hydraulique. Il est hautement hydraté ce qui lui confère un caractère fortement hydrophile. Sa forme a été étudiée par discographie par Adams et al. en 1986 comme étant rectangulaire chez l'enfant. Chez l'adulte, c'est-à-dire sous sa forme mature, il devient ovale et biloculaire c'est-à-dire qu'il est composé de deux chambres (Humzah and Soames, 1988). Il est constitué de glycosaminoglycanes appelés GAGs, de fibrilles de collagène, de sels minéraux, de fibres d'élastine, d'eau et de cellules. Avec l'âge, le NP tend à devenir amorphe et décoloré puis fibrotique dû à sa baisse d'hydratation. Ce phénomène est communément appelé dégénérescence du disque intervertébral. Chez le jeune adulte, sa composition en eau peut être comprise entre 80 et 88% alors qu'en fin de vie il ne dispose plus que de 70% d'eau dû à sa dégénérescence inévitable.

Les fibrilles de collagène dans le NP sont majoritairement de type II (50%) mais des fibrilles de collagène de type I (20%) sont également présentes. Les 30% restants sont d'autres types de collagène de types VI, IX, X et XI. Ensembles, les fibrilles de collagène représentent 20% de la masse sèche du disque (Eyre, 1979). Celles-ci n'ont pas d'orientation particulière et leur diamètre est compris entre 100 et 150 nm chez l'adulte (Happey et al., 1964). Dans les zones hautes et basses du NP, l'arrangement des fibres de collagène semble plus régulier correspondant à l'endroit où le NP est attaché par des fibres élastiques aux plateaux cartilagineux et à l'Annulus Fibrosus via la zone de transition. Cette zone n'est à ce jour pas très bien définie mais fait l'objet de nombreuses investigations (Tavakoli and Tipper, 2022; Wade et al., 2012). Tavakoli et al l'ont représenté schématiquement à l'aide d'une observation microscopique d'une coupe de disque

intervertebral de moutons (Figure 2) (Tavakoli et al., 2020). Ils ont également démontré que selon la zone sondée, la densité, l'épaisseur et la forme des fibres d'élastine diffèrent entre la région antérolatérale (AL) et la région postérolatérale (PL) de la zone de transition (Smith and Fazzalari, 2006; Tavakoli et al., 2020). Par exemple, l'épaisseur et la densité des fibres sont plus importantes dans la zone extérieure (OAF) que dans la zone intérieure de l'Annulus Fibrosus (IAF) (Figure 2(C)).

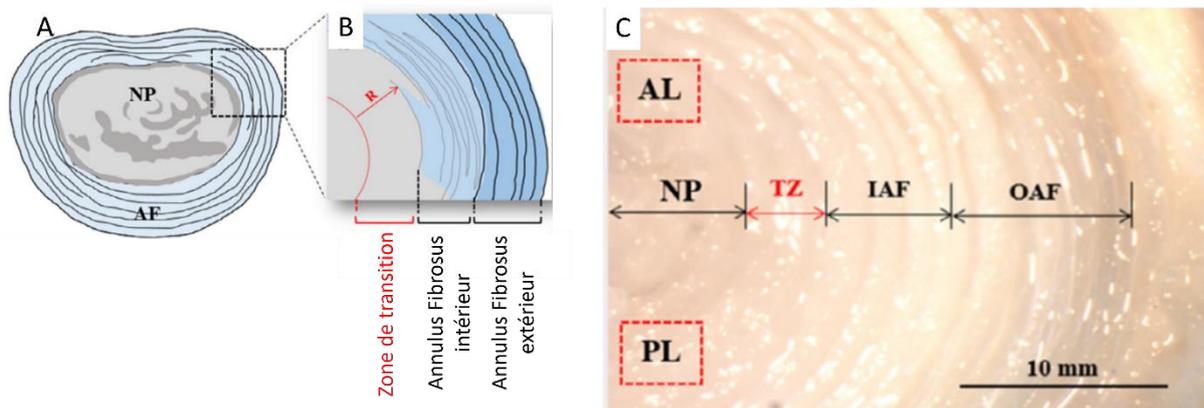


Figure 2 : (A)(B) Représentations schématiques du disque intervertébrale et de la zone de transition entre NP et AF (C) Retranscription des différentes zones sur une image de microscopie optique d'une coupe de disque intervertébral de mouton (Tavakoli et al., 2020).

Wade et *al.* ont démontré par des caractérisations mécaniques et optiques que les fibres élastiques (élastine) dans le NP étaient répartis en 3 arrangements différents avec des longueurs différentes comme représentés en Figure 3 (Wade et al., 2012).

Le premier type de fibres permettent de rattacher le NP aux deux extrémités de la partie interne de l'AF (Figure 3(A)). Lorsqu'elles sont vers l'extérieur du NP, elles sont plus courtes et sous tension qu'au cœur de celui-ci. En effet, les chaînes longues au cœur du NP permettent à celui-ci d'adapter son élasticité en fonction de la pression intradiscale ressentie. De manière générale, les différences de longueur des fibres centrales lui permettent d'avoir un mode de rupture progressif à l'étirement transversal. Cet agencement lui confère une capacité à porter des charges importantes en plus d'assurer son renforcement à l'étirement.

La Figure 3(B) présente la connectivité fibrillaire entre les plateaux cartilagineux et l'Annulus Fibrosus interne qui se fait en oblique. Ceci permet d'assurer une cohésion du système de confinement du NP formé de l'Annulus Fibrosus et des plateaux cartilagineux. Les fibres présentes en extérieur du NP sont comme précédemment plus courtes que celles vers l'intérieur afin de maintenir une tension adéquate au confinement. Les fibres les plus longues permettent au NP de se gonfler sans fuir sous pression.

La connexion entre les deux plaques cartilagineuses à travers le NP est schématisée en Figure 3(C). La longueur des fibres centrales est plus importante pour permettre la déformation axiale du NP aisément. Ainsi, les fibres peuvent s'étendre sans atteindre le point de rupture des faisceaux de fibres.

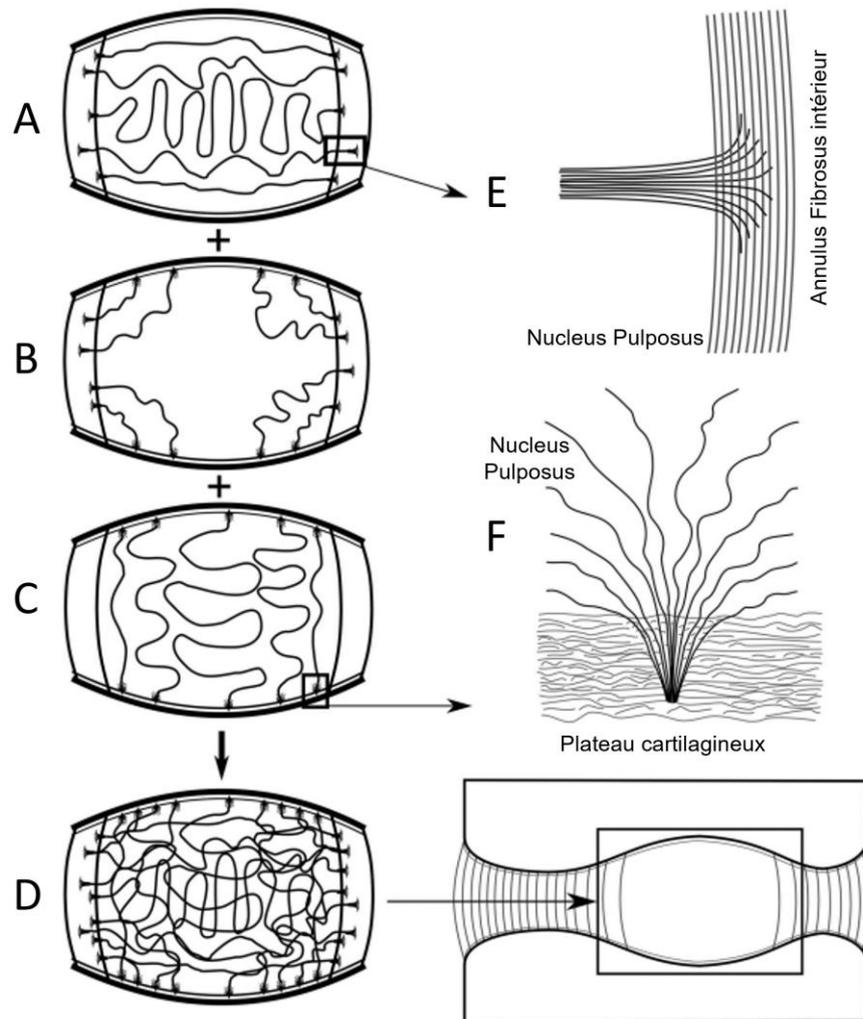


Figure 3 : Schéma des trois types d'assemblages hypothétiques liant le NP aux plateaux cartilagineux et à l'AF (Wade et al., 2012).

Enfin, les trois modes précédemment décrits sont superposés en Figure 3(D). Une fois combinés, ils permettent d'obtenir un réseau élastique entre NP, AF et plateau cartilagineux capable de faire face aux différentes contraintes tout en assurant le confinement du NP. Ce triple réseau confère au NP sa capacité à être étiré selon des modes de traction axial et transversal.

Les fibres de collagène sont également liées entre elles par la présence de glycosaminoglycanes (GAGs) (Figure 4). Parmi les GAGs présents dans le NP, on distingue l'acide hyaluronique (HA) des protéoglycanes comme le kératane sulfate (KS) et le chondroïtine

sulfate (CS). Les GAGs représentent 12% de la masse du NP et lui permettent ainsi d'être défini comme un tissu mou hautement hydraté puisqu'ils jouent un rôle primordial dans l'hydratation de ce tissu. Le ratio collagène : GAGs est de 1 : 3 dans le NP. Alors que l'acide hyaluronique est indépendant, le KS et le CS sont liés à un corps protéique qui forme l'agrécane. L'agrécane est le protéoglycane le plus abondant du NP et se lie à l'HA. En moyenne, une centaine de CS et une soixantaine de KS constitue l'agrécane représentant 90% de sa masse. KS et CS s'organisent en deux zones distinctes conférant à l'agrécane une forme d'écouvillon avec des chaînes longues (CS≈20kDa) puis des chaînes courtes (KS≈5-15kDa). HA, KS et CS sont tous chargés négativement ce qui leur permet de maintenir une bonne hydratation du tissu. En effet, en interagissant avec des ions Na^+ et Ca^{2+} , une pression osmotique est créée permettant de retenir l'eau.

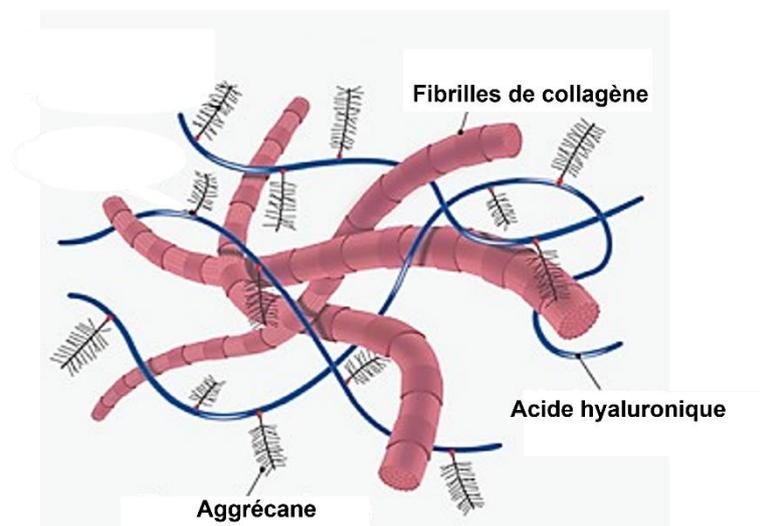


Figure 4 : Composition chimique de la matrice extracellulaire du Nucleus Pulposus traduit de (Buckley et al., 2018).

Enfin, le NP est un tissu mou cellularisé par des nucléopulpcytes. Cette cellularisation lui confère sa faible capacité d'autorégénération. Par conséquent si l'environnement cellulaire du NP venait à défaillir, cela pourrait causer une dégradation de celui-ci et donc une perte de mobilité générale.

3. L'Annulus Fibrosus

Autour du Nucleus Pulposus, se trouve l'Annulus Fibrosus. Celui-ci a pour rôle de confiner le NP tout en résistant à des sollicitations complexes (Wu and Yao, 1976). Il s'agit d'un tissu fibreux majoritairement composé d'un réseau de fibres de collagène de type I (20%), d'élastine (2%), de glycosaminoglycans (5%) et d'eau (65%) (Eyre, 1979). Le ratio

collagène/glycosaminoglycanes est de 4 pour 1, lui conférant son caractère fibreux puisque le collagène représente 70% de la masse sèche de l'Annulus Fibrosus (Raj, 2008).

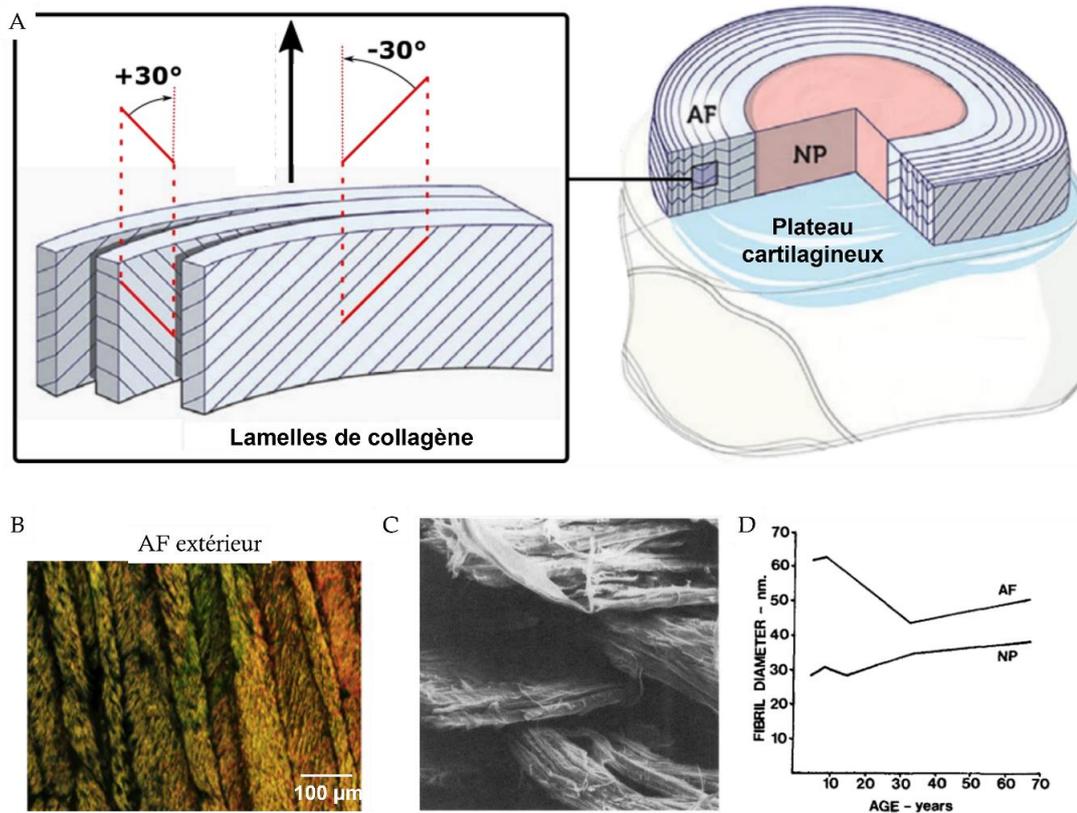


Figure 5 : (A) Schéma représentant l'anisotropie de l'Annulus Fibrosus adapté de (Buckley et al., 2018) par Antoine Frayssinet (Frayssinet, 2020) ; (B) Observation de l'orientation des fibrilles de collagène de l'AF extérieur au Microscopie Optique à Lumière Polarisée (Kandil et al., 2019); (C) Intersection des lamelles dans l'AF d'un disque intervertébral de chien observée au MEB (x120) (Inoue and Takeda, 1975) et (D) Evolution du diamètre des fibrilles dans une lamelle d'AF en fonction de l'âge du patient (Humzah and Soames, 1988).

La résistance mécanique de l'AF est directement liée à l'organisation du tissu en succession de lamelles fibrocartilagineuses orientées de manière concentrique autour du NP. On compte entre 15 et 20 lamelles concentriques qui mesurent chacune entre 200 et 400 μm respectivement de l'intérieur vers l'extérieur du disque. Les fibrilles de collagène présentes dans les lamelles font entre 100 à 200 μm de long et se présentent sous forme de paquets de 40 à 60 μm de diamètre dans les lamelles (Inoue and Takeda, 1975). Ces lamelles sont anisotropes puisque toutes les fibrilles sont alignées dans le même sens.

L'AF est un tissu anisotrope de par l'orientation des fibrilles de collagène à $+30^\circ$ ou -30° par rapport à la normale entre lamelles adjacentes (Figure 5(A)). Cette propriété a été observée en 1985 par Horton *et al.* en microscopie optique à lumière polarisée (MOLP) et diffraction des rayons X (Figure 5(B)) (Horton, 1958; Kandil et al., 2019). Grâce à cette anisotropie, l'AF

possède des propriétés biomécaniques élevées de par la forte orientation des fibres de collagène apportant de l'élasticité au réseau.

Pour garantir la cohésion interlamellaire, des cellules sont confinées entre deux lamelles. Celles-ci permettent les interconnexions sous forme de fibres interlamellaires de collagène et d'élastine en produisant de la matrice extra-cellulaire (MEC). Ces fibres ont pu être observées par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) (Figure 5(C)) (Inoue and Takeda, 1975). Les fibres d'élastine ont pour but d'apporter de l'élasticité au disque et lui permettent de pouvoir revenir à son arrangement initial après l'effort. Elles sont présentes en densité variable selon leur localisation. Leur densité est plus élevée dans la partie externe de l'AF puisqu'il s'agit de la zone la plus sollicitée en traction. Elles se situent principalement entre les couches concentriques de collagène perpendiculairement au plan des lamelles (Smith and Fazzalari, 2006).

En ce qui concerne la zone transitoire reliant l'AF au NP, la présence d'un gradient de transition entre le collagène de type II (vers le NP) et le collagène de type I (vers l'AF) est observé (Tavakoli and Tipper, 2022). Avec l'âge, la structure de l'AF est amenée à changer. Les fibrilles de collagène ont tendance à être plus fines dans l'AF et des fibrilles de plus en plus grosses apparaissent dans le NP synonyme de fibrose (Figure 5(D)). Ceci est principalement dû au travail mécanique du disque au cours du temps qui provoque un vieillissement de celui-ci pouvant aller jusqu'à la dégénérescence.

4. Les plateaux cartilagineux

Les plateaux cartilagineux sont les derniers éléments contribuant à l'intégrité du disque. Ils sont présents de part et d'autre du corps vertébral et délimitent le disque tout en assurant sa liaison avec les vertèbres (Figure 6(A)) (Roberts et al., 1989). Un plateau est une couche horizontale de cartilage hyalin ne mesurant pas plus de 1 mm d'épaisseur. Son rôle est d'assurer la protection du disque intervertébral contre l'atrophie causée par la pression continue imposée sur le tronc et d'apporter des nutriments au disque (Malandrino et al., 2014). Il est composé de fibres de collagène de type II qui sont horizontales et parallèles au corps vertébral et qui se prolonge jusque dans le disque (Eyre, 1979).

Ils agissent tels des membranes semi-perméables en permettant aux fluides de passer par diffusion vers le NP (Figure 6(A)). Ainsi, nutriments et dioxygène sont amenés jusqu'au cœur du NP afin d'assurer la survie du disque (Humzah and Soames, 1988). Ce flux de fluides se fait via des réactions osmotiques à travers des perforations permettant de diffuser les liquides à travers le cartilage. La zone perméable du plateau est limitée en son centre afin de nourrir le disque de l'intérieur en atteignant directement le NP. L'AF, quant à lui, n'est que légèrement irrigué par des

vaisseaux sur sa partie extérieure et encore seulement durant les premières années de vie (Humzah and Soames, 1988). Néanmoins, l'apport en nutriments se faisant par diffusion, celui-ci n'est pas homogène en toute part puisqu'un gradient est observé (Figure 6(B)). Ainsi, alors que la quantité de nutriments et de dioxygène apportée est importante aux abords du NP, celle-ci est beaucoup plus faible en son centre provoquant une hypoxie.

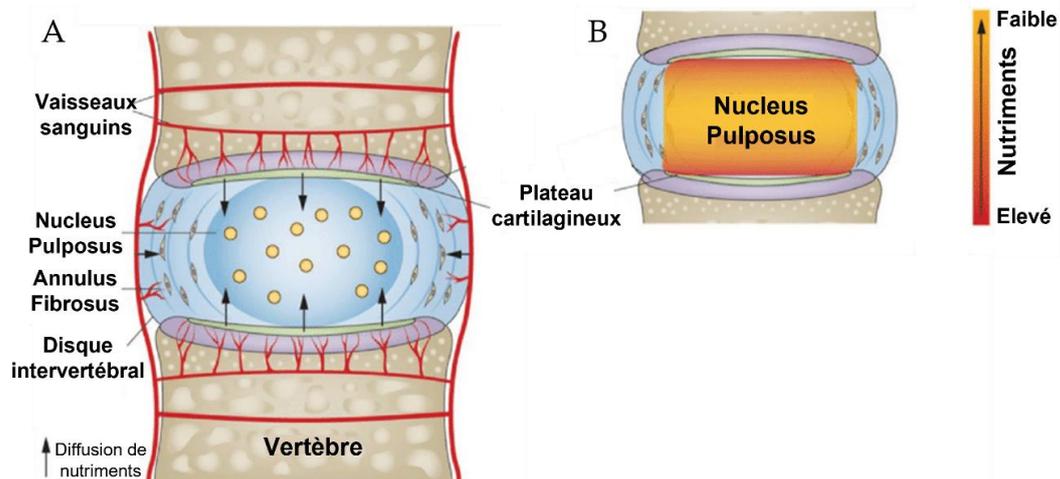


Figure 6 : (A) Schéma du processus de diffusion de dioxygène et de nutriments à travers les plateaux cartilagineux du disque intervertébral et (B) gradient d'apport en nutriments dans le Nucleus Pulposus dû à la diffusion, traduit de (Knezevic, Md, PhD et al., 2017).

II. Environnement cellulaire

1. La matrice extra-cellulaire du disque intervertébral

La matrice extra-cellulaire est nécessaire à la survie, à la prolifération et la différenciation des cellules conjonctives. En effet, cette structure dynamique complexe agit tel un support autour des cellules afin de permettre aux tissus de garder leurs propriétés. Les cellules sont en contact avec cette matrice, ce qui leur permet d'intégrer de nombreux signaux biochimiques via des récepteurs cellulaires. La MEC est composée d'un grand nombre de macromolécules telles que les protéoglycanes dont l'agrécan, l'élastine et les collagènes qui sont sécrétés par les cellules (Tonti et al., 2021). Les cellules sont par ailleurs les producteurs de cette matrice extra-cellulaire qui leur renvoie les signaux via leur récepteurs membranaires pour moduler leur phénotype. Ainsi, les interactions cellules/matrice sont cruciales pour l'homéostasie du tissu (Humzah and Soames, 1988). Dans le cas du disque intervertébral, on y retrouve de la matrice interstitielle ainsi

que de la matrice péricellulaire qui sert de jonction entre la première et les cellules elles-mêmes (Figure 7).

En plus des macromolécules citées précédemment, certaines enzymes sont également présentes afin de dégrader continuellement certaines molécules pour régénérer la MEC. Elles sont appelées des protéinases et peuvent être par exemple des métalloprotéinases ou des agrécanases. Celles-ci sont synthétisées par les cellules discales. La qualité et la mécanique de la MEC sont le résultat de l'équilibre entre synthèse, accumulation et dégradation des macromolécules et sont donc directement liées à l'activité des protéinases (Raj, 2008).

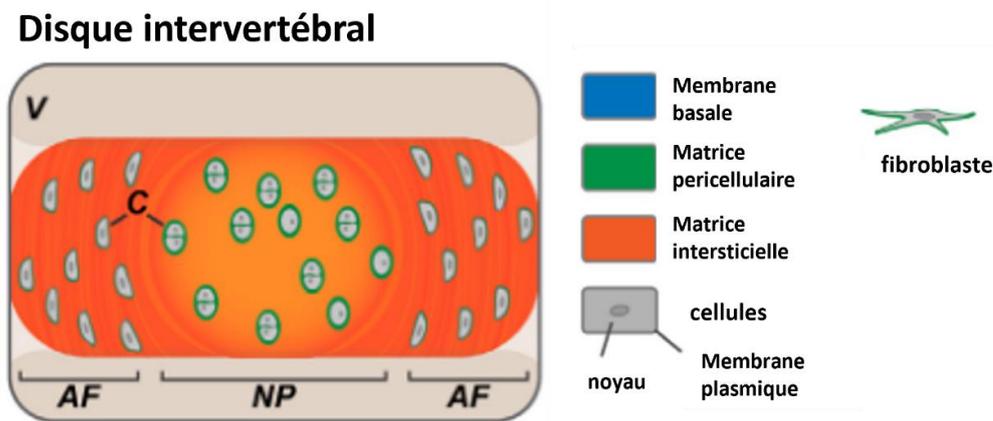


Figure 7 : Composition de la matrice extracellulaire présente dans un disque intervertébral (Tonti et al., 2021).

La régénération du disque par les cellules a été démontrée par les expériences de Bradford et al. en 1983. Lors de ces expériences, une substance issue du latex de la papaya appelée chymopapain a été injectée *in vivo* dans un NP chez le chien. L'injection de cette enzyme provoque la digestion des protéoglycanes de la matrice extracellulaire du NP et donc une destruction partielle de celle-ci. La capacité des cellules à produire de la MEC a donc pu être évaluée par la suite. Lors des deux premières semaines après injection, une perte de la hauteur du disque a pu être observée résultant de l'action de la chymopapain. L'analyse approfondie de cette perte nous renseigne même sur la perte totale de protéoglycanes dans le NP, l'AF et les plateaux cartilagineux. Finalement, la hauteur de disque et une structure histologique normale ont pu être retrouvés au bout de six mois et traduit donc de la capacité des cellules à régénérer la MEC tant qu'elles ne sont pas défailtantes (Bradford et al., 1983). Ainsi cette capacité de régénération est liée aux nucléopulpcytes puisque le DIV n'est pas vascularisé.

2. Les cellules du Nucleus Pulposus

Au sein du Nucleus Pulposus, les cellules peuvent être de deux types. Il peut s'agir de cellules notochordales ou bien de nucléopulpcytes (Clouet et al., 2019).

Les cellules notochordales sont des cellules souches présentes dans le NP jeunes enfants. A partir de l'âge de deux ans, elles tendent à disparaître et le vieillissement du disque est amorcé.

Les nucléopulpcytes sont des cellules que l'on trouve seulement dans le NP et qui s'apparentent à des chondrocytes. Leur densité cellulaire dans le NP mature est d'environ 3000-5000 cellules/mm³ ce qui est peu pour un tissu biologique (Priyadarshani et al., 2016). Ces cellules, tout comme les chondrocytes, sécrètent du collagène de type II et de l'agrécan. Leur morphologie ronde est due à leurs faibles interactions avec la MEC qui les entourent. En effet, ces cellules sont connues pour n'interagir que très peu avec les protéoglycanes qui sont les composants majoritaires du NP. De plus, le réseau tridimensionnel du NP étant lâche, les cellules sont enchevêtrées dans celui-ci (Colombier et al., 2014).

La faible densité cellulaire devient problématique dans le temps. De par sa non vascularisation, les nutriments ne sont apportés aux cellules que par diffusion ce qui provoque une hypoxie. Cependant, avec l'âge, la viabilité cellulaire diminue à cause des stress hypoxiques. Les nucléopulpcytes restants ne parviennent plus à produire suffisamment de matrice extracellulaire pour maintenir l'homéostasie du tissu.

3. Les cellules de l'Annulus Fibrosus

Au sein de l'Annulus Fibrosus, les cellules ne sont pas toutes les mêmes et répondent directement à leur environnement chimique (support). Le support de l'AF est fait de lamelles anisotropes et les cellules sont présentes entre les lamelles orientées de $\pm 60^\circ$ les unes par rapport aux autres. Le fait qu'elles soient confinées entre 2 lamelles hautement orientées les contraints à suivre cet alignement et à adopter une forme plus allongée (Chu et al., 2018). Ces cellules de l'AF sont de type fibroblastes. Elles disposent d'extensions cytoplasmiques pouvant aller jusqu'à 30 μ m de long, ce qui est élevé par rapport aux fibroblastes classiques. Ces extensions servent de capteurs de charges mécaniques à travers le tissu et permet de mieux répondre aux sollicitations mécaniques subies par l'ensemble du disque intervertébral (Torre et al., 2019).

Selon l'endroit où elles se trouvent, elles changent de morphologie. Ainsi, en s'approchant du Nucleus Pulposus, les cellules d'AF qui sont fines et allongées dans la partie extérieure deviennent de plus en plus ovale vers le NP car elles subissent le gradient de composition lamellaire. La densité cellulaire d'un AF mature est d'environ 9×10^6 cellules.cm⁻³. Elle est plus importante sur la partie extérieure de l'AF que sur la partie intérieure probablement dû au gradient d'apport en nutriments et dioxygène (Pattappa et al., 2012).

Finalement, les cellules d'AF ont été peu étudiées jusqu'à présent. C'est pourquoi leur phénotype n'est pas encore bien ciblé. Cependant, deux marqueurs semblent avoir été identifiés

depuis peu comme caractéristiques des cellules d'AF. Il s'agit du collagène de type V et de la ténomoduline (Pattappa et al., 2012). De plus en plus de groupes de recherche centrent leurs problématiques sur l'élucidation du phénotype des cellules d'AF ce qui devrait vite ouvrir la voie à leur meilleure compréhension. Finalement les cellules d'AF semblent jouer un rôle clé dans la biomécanique de l'AF d'une part en produisant de la matrice extra-cellulaire et d'autre part en agissant comme des capteurs de sollicitations mécaniques.

III. Biomécanique et vieillissement

1. La biomécanique du disque intervertébral

La biomécanique du disque intervertébral est complexe puisqu'elle résulte de l'assemblage de deux tissus aux propriétés bien différentes. Le disque subit différentes contraintes tout au long de la vie (Newell et al., 2017). Plusieurs modes de sollicitations sont imposés aux disques. Afin de mieux appréhender la biomécanique du disque, il est important d'avoir un cahier des charges des propriétés mécaniques du tissu correspondant aux sollicitations qu'il endure. Ainsi, les propriétés mécaniques en compression, en cisaillement ou encore en tension doivent être ciblées (Figure 8(A)).

La viscoélasticité du disque lui permet de supporter des charges sans se désintégrer grâce à ses propriétés compressive et élastique qui assurent sa cohésion. Selon la configuration du mouvement, le NP n'est pas systématiquement le centre de rotation ce qui fait que la pression n'est pas ressentie que par celui-ci mais par toute la structure (Figure 8(B)). Les charges sont réparties sur tout le disque grâce à la fonction d'amortisseur hydraulique déformable du NP et à la pression intradiscale.

Trois types de sollicitations mécaniques sont principalement observables dans le disque (Chetoui, 2017).

Lorsqu'une compression est ressentie, les forces sont redistribuées de telle sorte que la hauteur du NP diminue et que son diamètre augmente sans changer de position (Figure 8(A)). L'AF est étiré radialement pour maintenir le NP confiné tout en dissipant les forces compressives. C'est à la fois la résistance élastique des lamelles anisotropes de collagène et la présence d'élastine qui lui permettent d'atteindre une telle déformation sans rupture.

Lorsque le disque est mis en flexion, une compression est ressentie d'un seul côté du disque (Figure 8(B), 1^{er} et 2^e dessin). Pour répondre à cette sollicitation unilatérale, le NP se

déplace hors de la zone compressée. L'AF se retrouve en compression d'un côté et en extension du côté du NP. Une fois de plus, c'est le comportement visqueux du NP et l'élasticité de l'AF qui permettent à la structure de dissiper les charges sans rompre.

Le dernier mode de sollicitation pouvant intervenir est la torsion. La torsion est un mélange de compression et de rotation le long de l'axe vertébral. Il s'agit de la déformation ayant le plus fort impact sur l'Annulus Fibrosus et est ressenti par celui-ci comme du cisaillement. Le cisaillement ressenti est plus important dans la zone postéro-latérale de l'AF et peut provoquer, à répétition, des déchirures lamellaires.

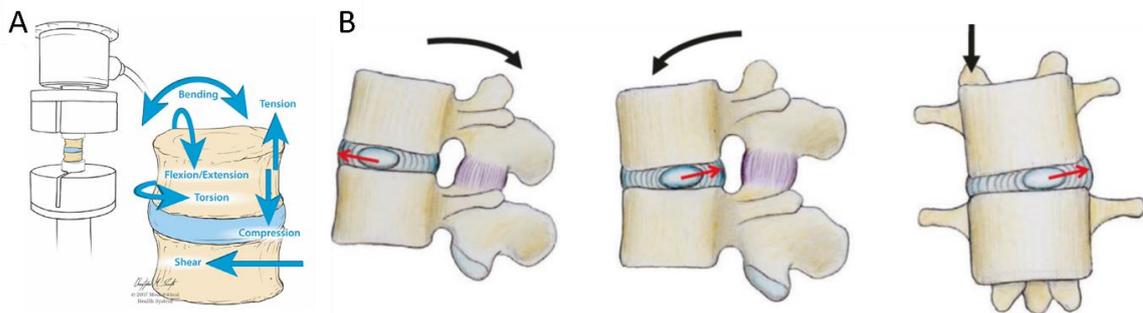


Figure 8 : (A) Différents modes de sollicitation pouvant s'appliquer au disque intervertébral (Buckley et al., 2018) et (B) Equilibre et répartition des charges entre l'AF et le NP lorsque le disque subit des compressions ou des flexions (Lavignolle, 2020).

La détermination des propriétés mécaniques de chaque partie ainsi que de l'ensemble du disque est difficile puisque les sollicitations ne sont jamais individualisées mais combinées entre elles. Néanmoins, afin d'avoir une meilleure visibilité de la mécanique du NP et de l'AF, nous avons établi une base de données des principales caractéristiques mécaniques selon leurs modes de sollicitation (Tableau 1).

Tableau 1 : Propriétés mécaniques spécifiques (A) à l'Annulus Fibrosus (Long et al., 2016) et (B) au Nucleus Pulposus (Iatridis et al., 1996).

A	Mode de déformation	Orientation	Module
Tension		circconférentielle	11-29 MPa
		axial (fibre)	180 MPa
		radial	0,21-0,45 MPa
Coefficient de Poisson		circconférentiel	2,27
		axial	0,61
		radial	0,79
Compression		axial	0,4-3 MPa
Cisaillement		-	0,1-0,28 MPa

B	Mode de déformation	Orientation	Module
	Module d'Young	-	0,0045 - 1,5 MPa
	Tension	axial	0,003-0,004 MPa
	Coefficient de Poisson	-	0,1-0,45
Pression hydrostatique		repos	0,1-0,3 MPa
		sous contrainte	1-3 MPa
Compression		non confiné	0,0054 MPa
		confiné	1 MPa
Cisaillement		-	0,003-0,005 MPa

L'Annulus Fibrosus subissant de multiples sollicitations telles que la tension, le cisaillement mais aussi de la compression, ces trois paramètres ont été étudiés dans la littérature. De par son anisotropie, selon l'axe de sollicitation considéré, le tissu ne répond pas de la même manière. C'est pourquoi les propriétés mécaniques de l'Annulus Fibrosus ont été déterminés

selon des axes circonférentiel, radial ou axial comme présenté en Figure 9(A). De manière générale, il possède un module d'Young en tension axiale le long des fibres de 180 MPa ce qui lui permet de contenir le NP sans rompre (Tableau 1(A)). Son module en tension circonférentielle est 100 fois supérieur au radial ce qui explique son aisance à se déformer préférentiellement dans le plan circonférentiel qui est celui des lamelles (Jacobs et al., 2011). De plus, son coefficient de poisson étant supérieur à 0,5 dans les trois axes de déformation, il s'agit bien d'un tissu anisotrope. Ses propriétés élastiques sont fortement influencées par la présence d'élastine en plus des macromolécules d'HA qui lie les fibrilles de collagène (Han et al., 2012; Nerurkar et al., 2011).

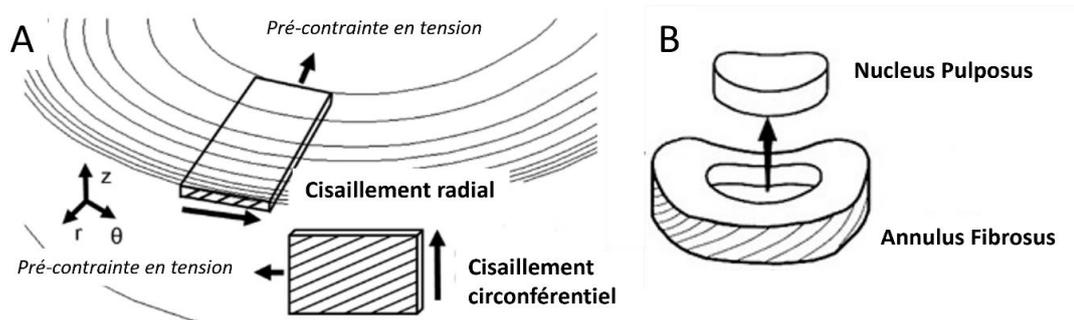


Figure 9 : Schéma (A) des axes considérés pour mesurer les propriétés mécaniques de l'Annulus Fibrosus (Long et al., 2016) et (B) de l'excision du Nucleus Pulposus pour déterminer ses propriétés mécaniques (Iatridis et al., 1996).

Le Nucleus Pulposus, quant à lui, subit surtout des contraintes de compression. Du fait de son rôle d'amortisseur hydraulique et de sa viscoélasticité, ses propriétés mécaniques sont plutôt considérées comme des pressions hydrauliques (Tableau 1(B)). Afin de déterminer ses propriétés mécaniques, celui-ci est excisé du disque intervertébral comme présenté en Figure 9(B). Ses caractéristiques mécaniques peuvent ensuite être étudiées en situation confinée comme c'est le cas dans le tissu natif ou en situation non confinée pour remonter à ses propriétés individuelles. Ainsi, il possède une pression hydrostatique au repos comprise entre 0,1 et 0,3 MPa. Lorsqu'il est sous contrainte, celle-ci peut monter jusqu'à 1-3 MPa soit une augmentation de 10 fois sa pression au repos. Il s'agit d'un matériau isotrope n'ayant aucune orientation spécifique puisque son coefficient de Poisson est inférieur à 0,5. Enfin, son module d'Young mesuré en tension peut atteindre jusqu'à 1500 kPa.

2. Vieillessement mécanique

Comme introduit précédemment, le NP joue un rôle d'amortisseur hydraulique et peut subir de fortes augmentations de pression sous contrainte. Selon l'activité considérée, la pression intradiscale est différente et à répétition, cela engendre un vieillissement du disque. Par exemple

lorsque l'on tousse celle-ci augmente de 40% alors que quand on porte du poids elle augmente de 50%. Il s'agit d'un phénomène normal qui est directement lié au rôle de compresseur hydraulique du NP. Le souci ici est que plus la pression intradiscale est élevée, plus le disque subit une perte de liquide discal. Répété sur le long terme, ces contraintes engendrent une réduction de la hauteur du disque et par conséquent une dégénérescence plus rapide (Humzah and Soames, 1988). De plus, ces contraintes sont également subies par l'Annulus Fibrosus après redistribution des charges par le NP. Cela peut notamment mener à des déchirures de l'AF surtout dans le cas de cisaillement important de celui-ci.

Un exemple de vieillissement du disque intervertébral est présent en Figure 10 ci-dessous comparant un enfant de 10 mois avec un adulte de 50 ans. Sur le disque jeune et sain, la hauteur et la répartition entre AF et NP sont homogènes alors qu'après vieillissement, on observe un affaissement d'un côté de l'AF du disque ainsi qu'une répartition qui n'est plus homogène entre les différentes parties. Nous verrons par la suite les conséquences que ce vieillissement provoque : la dégénérescence.

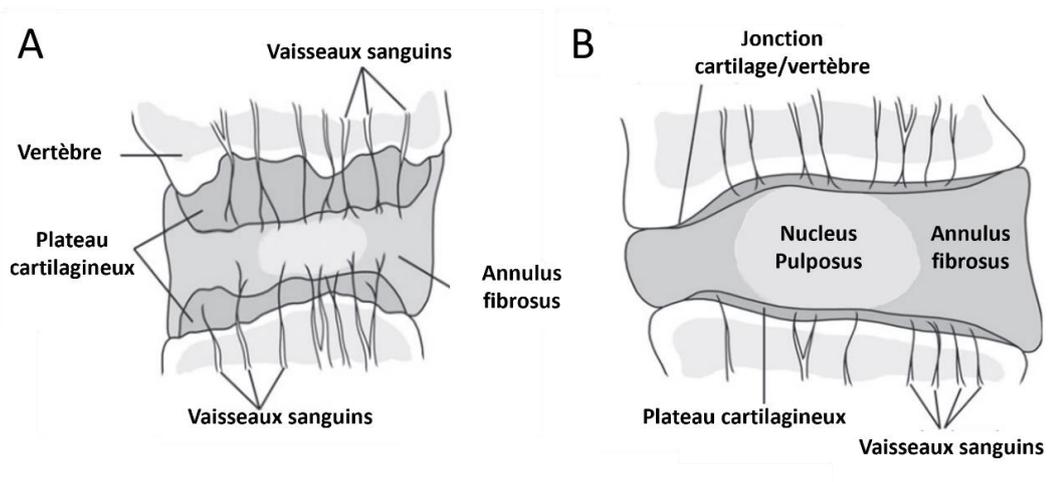


Figure 10 : (A) Schéma d'un disque intervertébral jeune chez un enfant de 10 mois (B) Schéma d'un disque intervertébral vieilli chez un adulte de 50 ans (Raj, 2008).

Chapitre 2 : La dégénérescence du disque intervertébral

Avec le temps, la dégénérescence du disque intervertébral est inévitable et conduit au développement de pathologies douloureuses et invalidantes. La plus commune est la lombalgie discale généralement recensée dans les maux de dos (Clouet et al., 2019). Ici, nous nous proposons d'étudier cette dégénérescence sous plusieurs axes. Tout d'abord nous parlerons des facteurs pouvant l'influencer puis du mécanisme de dégénérescence pour finir avec les traitements actuellement pratiqués et leur efficacité.

I. Facteurs de dégénérescence

Bien qu'ayant été étudiée sous différents angles, la dégénérescence du disque intervertébral est toujours mécomprise (Dickinson and Bannasch, 2020; Freemont et al., 2002; Wang et al., 2014). Ici, l'étiologie de cette pathologie répandue sera explicitée.

Lors de sa dégénérescence, le disque perd de sa hauteur, provoqué par une baisse d'hydratation. Lorsqu'il est délogé de son site habituel, la pression qu'il exerce sur les racines nerveuses provoque des douleurs importantes au niveau du dos : il s'agit d'une hernie discale. La hernie discale a déjà été étudiée comme étant due à une compression des nerfs au niveau d'un ou de plusieurs disque(s) intervertébral(ux) (Tampier et al., 2007).

Il a été démontré qu'il existait des facteurs favorisant ces hernies et directement la dégénérescence du disque intervertébral (Raj, 2008).

La première cause de dégénérescence est liée à un mauvais apport en nutriments au sein du disque. En effet, pour la survie du disque, des nutriments comprenant du glucose et de l'oxygène doivent parvenir jusqu'aux cellules du NP et de l'AF afin de leur permettre de survivre. Si cet apport s'appauvrit, les cellules ne sont plus nourries suffisamment ce qui conduit à l'apoptose c'est-à-dire la mort cellulaire. Cette mort cellulaire impacte la synthèse de matrice extra-cellulaire dont les protéoglycanes. Le maintien de l'hydratation du tissu sain est impossible ce qui cause la perte de matière et d'eau. Puisque l'apport en nutriments se fait par diffusion dans la matrice extracellulaire du NP, une calcification des plateaux cartilagineux avec le temps ou le vieillissement du disque peuvent également altérer la diffusion (Raj, 2008).

Le second facteur accélérant la dégénérescence du disque est la fatigue du disque liée aux charges mécaniques portées. Celles-ci sont synonymes de contraintes qui, si elles sont trop

lourdes et/ou exercées sur le long terme induisent des blessures du disque. Le plus souvent, il s'agit de personnes exerçant un métier pénible où le port de charges est quotidien ou encore où la posture nécessaire n'est pas la bonne (Raj, 2008). L'hygiène de vie a également son importance. Des exercices sportifs trop intenses ou au contraire inexistant mènent à la dégénérescence du disque.

Enfin, le troisième et dernier facteur de dégénérescence est la génétique. Sur les dernières années, 60% des cas de dégénérescence et d'hernies discales ont été reliés à la génétique. Ce même facteur d'hérédité a été étudié grâce à des examens IRM sur des jumeaux. Ainsi, des gènes ont été identifiés comme responsables de la dégénérescence du disque. Un polymorphisme a été identifié sur des gènes d'agrecane, de collagène II et de collagène IX (faisant partie de la matrice structurale du disque) (Raj, 2008).

Ceci représente autant de facteurs que de mécanismes possiblement responsables de cette pathologie ce qui rend sa compréhension et ses traitements difficiles à optimiser.

II. Mécanisme de dégénérescence

Jusqu'il y a peu de temps, le NP était considéré comme le point de départ des mécanismes de dégénérescence. S'agissant du centre cellulaire du disque, l'apoptose des cellules de NP semblait être la cause racine de la pathologie.

Il s'avère que le 1er changement morphologique n'interviendrait pas dans le NP mais au niveau des plateaux cartilagineux. En effet, la dégénérescence se manifeste en premier lieu par le détachement d'une partie des plateaux cartilagineux du corps vertébral adjacent au disque touché (Humzah and Soames, 1988). Ceci illustre bien la difficulté à comprendre le mécanisme exact de destruction du disque puisque beaucoup d'interactions et de liens de causes à effets sont mis en jeu dans ce phénomène. C'est en étudiant tous ces liens et phénomènes autour de la dégénérescence du disque intervertébral que le mécanisme suivant a pu être élucidé.

Les plateaux cartilagineux ne sont vascularisés qu'à des âges précoces. Avec l'âge, la quantité de vaisseaux sanguins diminue drastiquement ce qui entraîne le comportement avasculaire du disque intervertébral. Les nutriments ne sont apportés que par diffusion. Avec l'âge et les sollicitations répétées, le cartilage subit une calcification des pores. Les plateaux deviennent alors fragile et empêche un bon apport en nutriments du NP (Humzah and Soames, 1988). Avec moins de nutriments, les nucléopulocytes sont forcés de s'adapter ou de mourir. Les

cellules qui meurent ne peuvent ainsi plus produire de MEC pour régénérer le disque et celles qui restent s'adaptent. Elles produisent trop de collagène de type I au détriment des protéoglycanes.

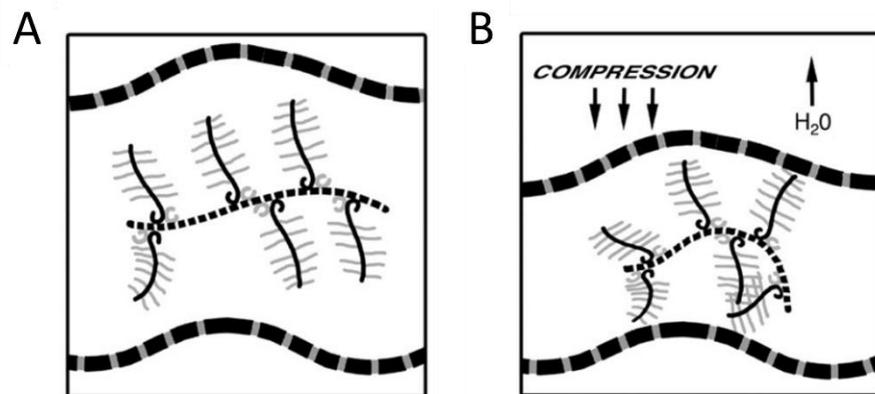


Figure 11 : (A) Mécanisme d'amortissement et de gonflement par l'acide hyaluronique (trait discontinu central) et les agrécanes (ligne noire continue) et les glycosaminoglycanes sulfatés (lignes grises continues) substitués sur celui-ci et (B) Dégradation par perte d'hydratation des protéoglycanes lors de la dégénérescence du disque intervertébral (Raj, 2008).

Cette surproduction de collagène rend le NP de plus en plus fibreux et donc la zone transitoire entre AF et NP sera moins marquée. Quant aux protéoglycanes, en plus de leur baisse de production ils sont dégradés par les contraintes compressives de plus en plus dures à amortir comme montré en Figure 11. L'activité enzymatique est également augmentée par le changement de pH qui devient plus acide. Ceci mène à une perte de GAGs qui entraîne une chute de pression osmotique et donc une perte d'hydratation car l'eau n'est plus retenue par ceux-ci. Enfin, le réseau d'élastine est désorganisé provoquant ainsi une moins bonne cohésion du disque. Tout ceci altère la réponse cellulaire et on entre ainsi dans un cercle vicieux.

Cette baisse d'hydratation du NP entraîne des fuites de fluide plus rapides menant à une perte de hauteur du disque. Un déséquilibre des contraintes est alors exercé sur la zone transitoire menant à, dans un premier temps une désorganisation de l'AF qui devient irrégulier puis dans un second temps à sa rupture (Figure 12) (Raj, 2008).

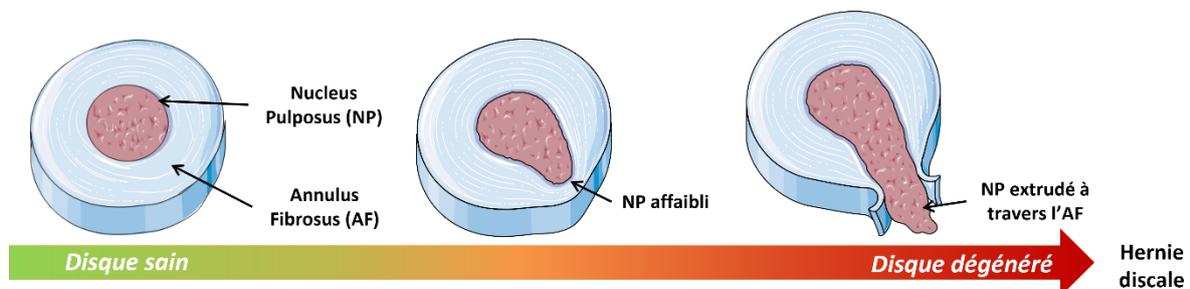


Figure 12 : Mécanisme de dégénérescence du disque intervertébral, adapté de (Tendulkar et al., 2019) à l'aide de Smart Servier.

Quand il y a rupture et fuite du liquide du NP à travers l'AF, l'abcès vient comprimer les nerfs ce qui provoque des douleurs et donc la hernie discale.

III. Des traitements existants insuffisants

Trois sortes de traitement sont aujourd'hui pratiquées : les thérapies non chirurgicales, les thérapies chirurgicales et les nouveaux traitements reposant sur la thérapie cellulaire.

1. Les traitements non chirurgicaux

Les traitements dits non chirurgicaux sont une solution à très court terme. Il s'agit par exemple de prise d'antidouleurs et de décontractant, d'infiltration de corticoïdes ou encore de kinésithérapie et de repos. Ils ne traitent pas la pathologie mais seulement les symptômes de manière ponctuelle (Romaniyanto et al., 2022).

2. Les traitements chirurgicaux

Les traitements chirurgicaux quant à eux peuvent être de plusieurs natures. Ils interviennent lorsque la douleur est trop importante. Généralement, une excision du disque appelé discectomie totale ou partielle est effectuée. Lors de cette intervention, le disque est partiellement ou totalement retiré afin de libérer le nerf comprimé.

S'il est totalement excisé, le chirurgien procède soit à une arthrodèse (fusion entre deux vertèbres adjacentes) avec ajout d'os à l'emplacement du disque soit à l'implantation d'une prothèse (Hanley and David, 1999; Noshchenko et al., 2015). Il s'agit d'interventions invasives qui soulagent ponctuellement la douleur. Néanmoins, si le nerf est trop endommagé pour être restauré, la douleur persiste ainsi que la maladie. Cela ne traite pas la cause de la dégénérescence en elle-même.

Lorsque la discectomie est partielle, elle permet une décompression intradiscale en retirant l'excès de NP qui fait pression sur le nerf. Ainsi, l'apport en nutriments est amélioré et le nerf comprimé est soulagé. Néanmoins, l'AF restant déchiré, il est nécessaire d'accompagner la discectomie partielle d'une annuloplastie si on souhaite éviter tout risque de reherniation (Choi et al., 2011; Choy et al., 2018; Heary, 2001; Kapural et al., 2004). L'annuloplastie consiste à réparer

l'AF une fois déchiré. Ceci peut être fait avec des implants ou dernièrement avec une technologie de suture thermique à l'aide d'une aiguille chauffée à 90°C.

Parmi les implants utilisés en annuloplastie pour maintenir l'AF, les implants Barricaid sont très répandus (Figure 13(A)). Ils permettent de réduire les maux de dos tout en préservant la hauteur du disque et en réduisant le risque de reherniation symptomatique (Parker et al., 2016; van den Brink et al., 2019).

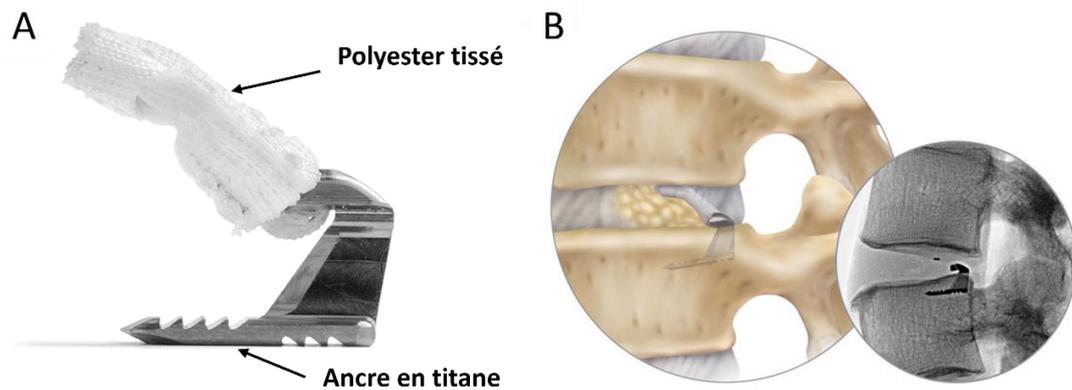


Figure 13 : (A) Photo de l'implant Barricaid et (B) Schéma de son implantation entre le disque et la vertèbre adjacente ("Published clinical evidence," n.d.).

Même s'ils permettent de soulager les douleurs voire d'éviter les rechutes dans le cas de l'implant Barricaid, il ne s'agit pas des traitements optimaux puisqu'ils ne soignent pas la cause racine et sont invasifs.

3. Les thérapies cellulaires

C'est pour cela que des nouveaux traitements sont en voie de développement. Ces nouvelles thérapies ont pour but d'être moins invasives et de traiter les causes de la pathologie et non les symptômes (Raj, 2008). Parmi elles, la thérapie cellulaire semble être la plus prometteuse. Elle repose sur l'injection en intradiscale dans le NP de cellules (Clouet et al., 2019). Quelles que soit les cellules utilisées, il faut que celles-ci puissent se transformer en nucléopulpecytes afin de régénérer la MEC du NP *in situ*. L'idée d'utiliser des chondrocytes articulaires et des nucléopulpecytes natifs a été abandonnée car tous deux ne prolifèrent pas suffisamment en plus d'être très peu disponibles (Acosta et al., 2011; Hohaus et al., 2008). Aujourd'hui la plupart des thérapies cellulaires s'appuient sur l'utilisation de cellules souches mésenchymateuses (MSC) car ce sont des cellules à haut potentiel multiplicatif et sont multipotentes. Cela signifie qu'elles ont une capacité à se différencier en lignées chondrogénique, ostéogénique ou adipogénique. Avec

l'ajout de facteurs de croissance tels que GDF5 ou GDF6, elles peuvent se différencier en nucléopulpecytes (Augello and De Bari, 2010; Ding et al., 2011). Enfin, les cellules souches pluripotentes induites humaines (iPSC) pourraient également être de bons candidats pour une application sur le disque intervertébral mais elles sont pour l'instant moins étudiées. Les thérapies cellulaires les plus avancées ne sont toujours pas à la hauteur des espérances puisque la hauteur du disque n'est pas restaurée (Tong et al., 2017). Ceci est principalement dû au fait qu'environnement ne soit pas adéquats. De plus, en injectant une suspension en intradiscale, la pression augmente localement dans le NP ce qui provoque des fuites cellulaires. Aujourd'hui, de plus en plus de projets de recherche se penchent sur l'utilisation de la thérapie génique. L'objectif serait d'injecter des gènes responsables de produire des facteurs de croissance pour des protéines ciblées en intracellulaire. Ainsi, la production de protéoglycanes pourrait être stimulée en interne.

Que ce soient les thérapies non chirurgicales, chirurgicales ou la thérapie cellulaire, elles ne traitent pas de manière optimale la dégénérescence du disque intervertébral. Ceci est dû au manque de connaissance sur les mécanismes exactes de dégradation liés à cette pathologie. C'est pourquoi avant de trouver un traitement optimal, il faut dans un premier temps comprendre le disque sain ainsi que le disque dégénéré pour mieux cibler les facteurs de dégénérescence. Pour mieux les comprendre, les modèles sont essentiels.

Chapitre 3 : Les modèles de disque intervertébral

La plupart des modèles utilisés à des fins médicales sont des modèles *in vivo* tels que les modèles murins, ovins, bovins ou encore porcins. Pour mimer le disque intervertébral, ces modèles ne sont pas adaptés car ce sont des quadrupèdes. Les contraintes exercées sur les disques ne sont pas les mêmes que celles exercées sur les disques humains. Aucun modèle *in vivo* bipédique n'est disponible.

Mis à part le fait qu'ils soient quadrupèdes, la cinétique de dégénérescence n'est pas non plus la même que chez l'homme, elle est beaucoup plus lente. Cette cinétique est directement liée à la taille du disque intervertébral qui est plus petite. Les phénomènes de diffusion sont donc plus rapides (Kroeber et al., 2002). La population cellulaire diverge également puisque notamment pour les petits animaux les cellules notochordales sont présentes tout au long de la vie alors qu'elles disparaissent dans les premières années de vie pour l'homme. La présence de ces cellules notochordales et les propriétés mécaniques du tissu limite la dégénérescence chez l'animal. Chez l'homme, une étape supplémentaire de dégénérescence structurale du disque est observée au cours du temps contrairement aux animaux (Lotz, 2004). Il s'agit du moment où le NP devient fibrotique déclenchant une modification de la zone de transition entre NP et AF qui devient de moins en moins distincte. Donc, la nécessité de développer des modèles *in vitro* devient de plus en plus importante.

Dans cette partie, nous recenserons les modèles *in vitro* développés concernant le NP, l'AF puis le disque complet. Les différents modèles seront présentés afin de faire un constat sur ce qu'il manque pour obtenir un modèle satisfaisant.

I. Les modèles *in vitro* du Nucleus Pulposus

Le Nucleus Pulposus est la partie du disque qui suscite le plus d'intérêt dans la communauté scientifique puisqu'elle est l'épicentre de la dégénérescence du disque. Les tentatives pour la mimer sont multiples, néanmoins nous ne nous contenterons de citer ici que les modèles les plus avancés. Le développement de modèles adéquats repose sur l'usage de polymères respectant deux facteurs. Ils doivent permettre l'adhérence des cellules en étant de bons supports cellulaires et doivent permettre de mimer l'hydratation notamment dans le NP. Pour cela, deux

sortes de polymères peuvent être utilisés : les polymères synthétiques et les polymères naturels aussi appelés biopolymères.

1. Les modèles à base de polymères synthétiques

De nombreux polymères synthétiques peuvent être utilisés. Néanmoins, le polyéthylène glycol (PEG) est le plus utilisé lorsqu'il s'agit de mimer le Nucleus Pulposus. Le PEG est un polymère hydrophile qui après réticulation peut former un hydrogel. Sa particularité le rendant intéressant pour le Nucleus Pulposus est sa haute hydratation. Dans certains cas, il peut aussi être couplé à d'autres polymères par exemple le poly(N-isopropylacrylamide) (PNIPAAm) qui est un polymère thermosensible (Vernengo et al., 2008). Le PNIPAAm est un polymère dit à LCST c'est-à-dire à température en solution critique basse. Grâce à cette particularité, il est capable de former un hydrogel compact à partir d'une certaine température. En dessous de 32°C, il s'agit d'un polymère hydrophile et donc soluble dans l'eau. Lorsque la température devient supérieure à 32°C, ce qui est le cas lors de conditions physiologiques, il devient hydrophobe, se repliant sur lui-même et formant un gel. Ainsi, en greffant des PEG sur du PNIPAAm, des copolymères branchés sont obtenus par polymérisation radicalaire résultant en la formation d'hydrogel au-delà de 32°C.

Selon la masse molaire du PEG greffé, des taux d'hydratation différents ont été obtenus (Figure 14(A)). Le taux d'hydratation le plus élevé et correspondant à celui du NP a été mesuré lorsque les plus grosses masses molaires de PEG étaient utilisées c'est-à-dire 8000 g/mol. De plus, le taux d'hydratation est stable sur 100 jours. Les propriétés mécaniques en compression des hydrogels ont été déterminées à 15% de déformation afin d'être comparées à celles du tissu natif (Figure 14(B)). Un module compressif autour de 50kPa a été obtenu à l'équilibre et stabilisé après 90 jours d'incubation dans du PBS à 37°C (Joshi et al., 2006). Ceci correspondant aux valeurs obtenues, leur système semble adéquat pour mimer le NP.

Le temps de relaxation a également été déterminé afin de qualifier l'élasticité du réseau (Figure 14(C)). Celui-ci est le même peu importe la masse molaire du PEG utilisée. Néanmoins, l'élasticité est un paramètre important dans le cas du NP car cela lui confère une capacité d'adaptation aux sollicitations répétées. A ce stade, des hydrogels de copolymères greffés avec des propriétés d'hydratation, de rigidité en compression et d'élasticité correspondant au cahier des charges du NP et stables dans le temps ont été obtenues.

Cette capacité des hydrogels de PEG a inspiré d'autres chercheurs qui ont développé des hydrogels de PEG aux propriétés physiques similaires tout en essayant d'augmenter leur bioactivité. Pour cela, les polymères de PEG ont souvent été fonctionnalisés avec des molécules

bioactives. Ainsi, cela augmenterait leur affinité avec les cellules et leur capacité d'adhérence cellulaire.

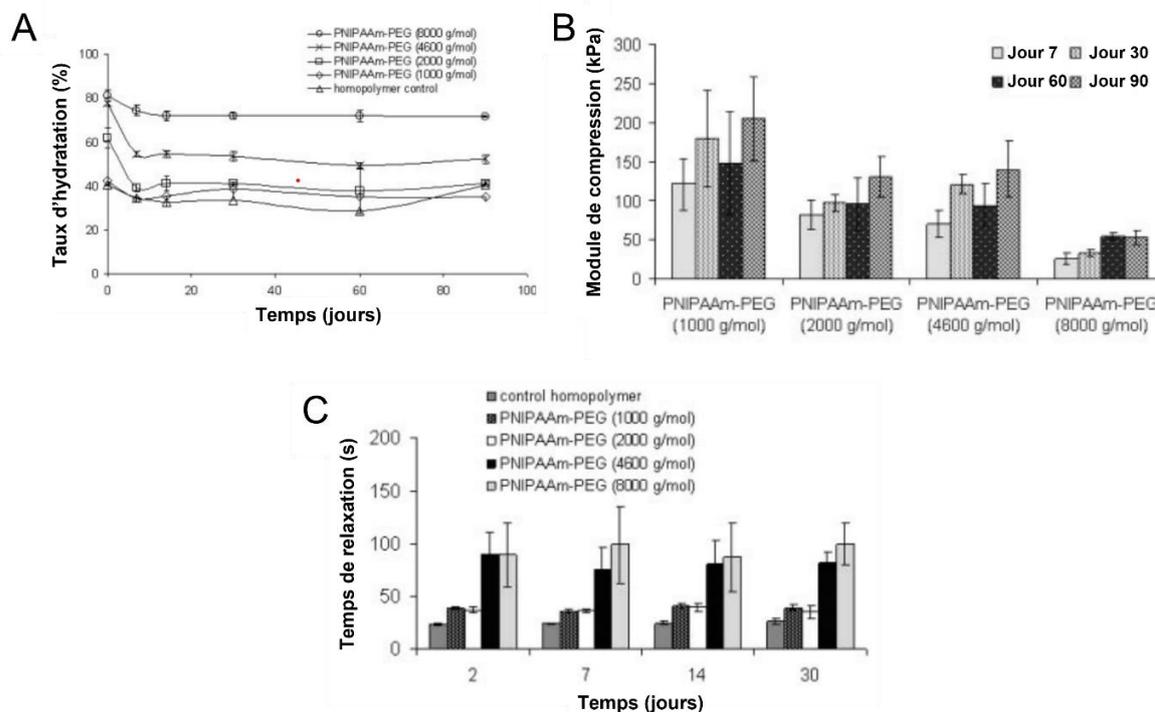


Figure 14 : (A) Taux d'hydratation (B) Module en compression et (C) Temps de relaxation de différentes formulations d'hydrogels PEG/PNIPAAm (Vernengo et al., 2008).

Les molécules bioactives utilisées peuvent être de différents types et il peut s'agir par exemple de laminine (Francisco et al., 2013). La laminine est une protéine naturelle de la matrice extra-cellulaire jouant un rôle dans l'adhésion, la survie, la migration et la différenciation cellulaire. En la greffant sur des macromolécules de PEG, ceci permettrait donc d'augmenter tous ces facteurs intervenant dans la bioactivité du matériau. Le greffage se fait en présence de NHS et selon les ratios laminine/PEG utilisés, des degrés de fonctionnalisation différents peuvent être atteints, le PEG étant toujours en excès.

Des ratios allant de 0 à 500 de PEG : laminine ont été étudiés. La rigidité des hydrogels a été déterminée par rhéologie en cisaillement en mesurant le module complexe G^* (Figure 15(A)). La rigidité la plus élevée a été évaluée pour le plus grand ratio PEG : laminine utilisé c'est-à-dire 500. Leur bioactivité a ensuite été étudiée avec des cellules de NP porcins. Comme observé en Figure 15(B), plus le ratio augmente, plus l'adhérence cellulaire est faible. Ceci est notamment dû au fait que de moins en moins de laminine soit présente, les cellules interagissent donc directement avec les PEG qui ne sont pas de bons supports d'adhésion comme démontré précédemment. Le greffage de laminine sur des macromolécules de PEG à des ratios inférieurs à

100 permet d'augmenter graduellement l'adhésion cellulaire de nucléopulpecytes sur les hydrogels.

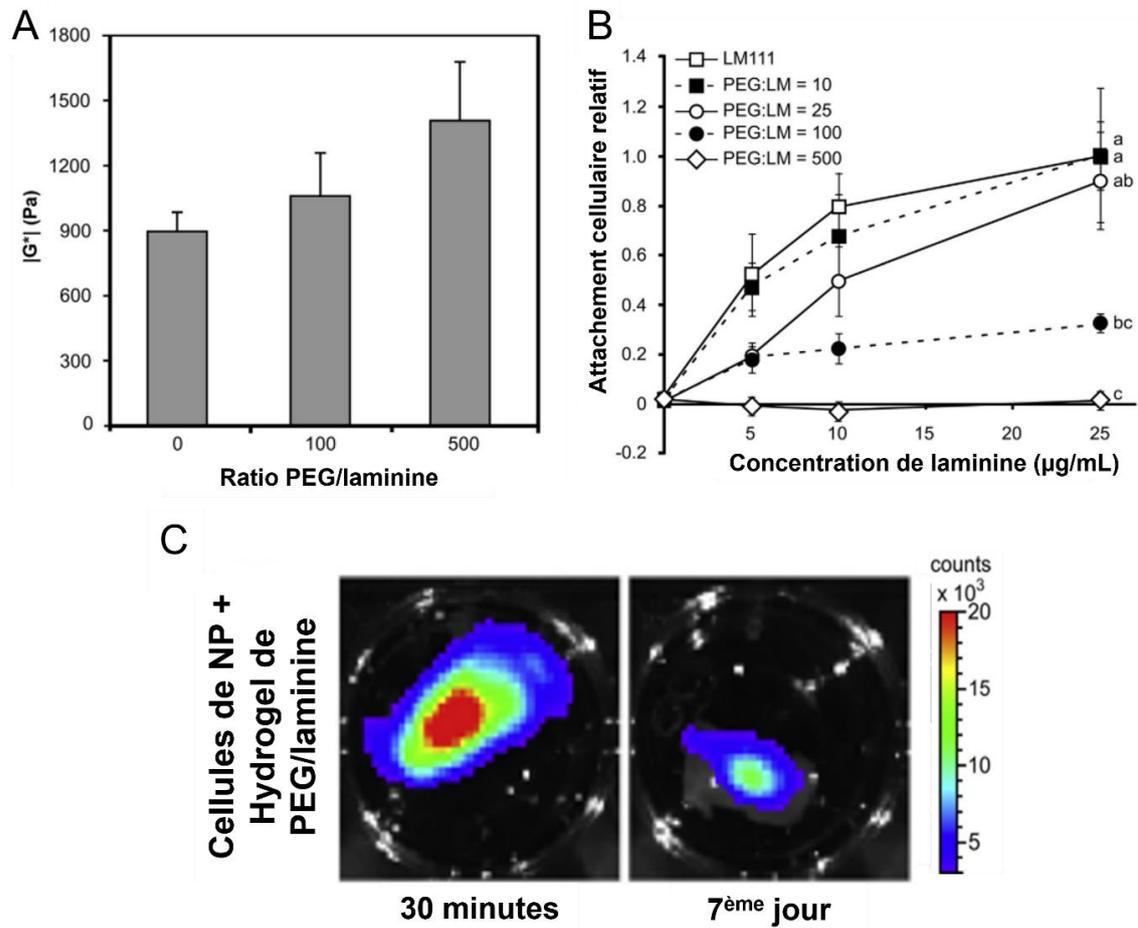


Figure 15 : (A) Rigidité des hydrogels mesurée par rhéologie en cisaillement en fonction du ratio PEG/laminine (B) Evaluation de l'adhésion cellulaire selon le ratio PEG : laminine et la concentration en laminine et (C) observation de bioluminescence après implantation de l'hydrogel cellularisé (Francisco et al., 2013).

Les hydrogels cellularisés avec des nucléopulpecytes ont été implantés dans des queues de rat entre deux vertèbres et la densité cellulaire a été mesurée sur 7 jours grâce à l'ajout d'un marqueur bioluminescent (Figure 15(C)). Après 30 minutes d'injection de l'hydrogel, une densité cellulaire importante a été décelée par bioluminescence avec une diffusion des cellules où la zone cellulaire la plus concentrée semble être centralisée au point d'injection. Au 7^{ème} jour d'implantation, le signal est beaucoup plus faible significatif d'une baisse de densité cellulaire. En prenant en compte le centre de densité cellulaire, celle-ci a diminué d'un facteur deux entre le 1^{er} et le 7^{ème} jour.

Malgré l'augmentation de la bioactivité des hydrogels de PEG avec de la laminine, ceux-ci ne semblent pas pouvoir contenir des nucléopulpecytes vivants dans un milieu physiologique sur 7 jours sans migration ou mort cellulaire. En effet, l'environnement cellulaire n'étant pas le

même que dans le tissu natif avec des signaux biochimiques différents, les systèmes synthétiques semblent compromettre la bioactivité cellulaire même lorsqu'ils n'engendrent pas de toxicité sur des supports 2D. C'est pourquoi d'autres stratégies utilisant des biopolymères sont de plus en plus considérées afin de reproduire l'environnement cellulaire natif du NP.

2. Les modèles à base de polymères naturels

Afin d'améliorer la bioactivité des modèles de Nucleus Pulposus, Les biopolymères sont de plus en plus utilisés. Les propriétés des biomatériaux en résultant peuvent être modulées selon la nature du ou des polymères utilisés et de leurs proportions. L'hydratation est l'élément central du développement d'un modèle de Nucleus Pulposus. Parmi ces biopolymères, on distingue ceux présents dans le tissu natif (collagène et acide hyaluronique par exemple) de ceux qui ne sont pas présents dans des tissus de mammifères (chitosane, cellulose et alginate par exemple). Ceux –ci sont souvent utilisés sous forme d'hydrogel.

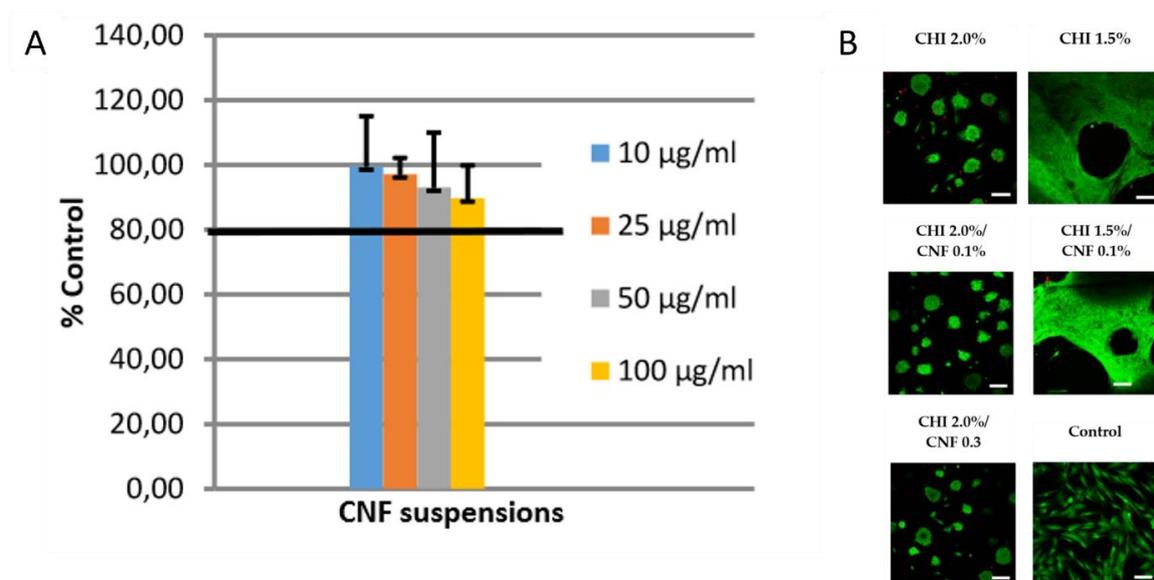


Figure 16 : (A) Activité métabolique mesurée par MTT sur différentes formulations composites après 24h de culture de fibroblastes dermaux humains et (B) Live/Dead sur différentes formulations après 24h de culture de fibroblastes dermaux humains (CHI = chitosane et CNF = nanofibres de cellulose) (Doench et al., 2018).

Brièvement, nous avons sélectionné un modèle à base de biopolymères ne provenant pas de mammifères (Doench et al., 2018). Ce modèle repose sur la formulation d'un hydrogel composite injectable permettant de mimer le NP hautement hydraté. Il s'agit d'hydrogels de chitosane renforcés avec des nanofibres de cellulose. Le chitosane a été sélectionné afin de mimer l'hydratation à l'image des protéoglycanes dans le NP alors que la cellulose vient représenter la partie élastique fibreuse assurée par les réseaux de collagène et d'élastine dans le NP. Après avoir généré ces hydrogels, ils ont étudié la cytocompatibilité en utilisant des fibroblastes dermiques

humains. L'activité métabolique des cellules encapsulées dans l'hydrogel a été évaluée par des tests aux sels de tétrazolium MTT. A l'issue de ce test, ils ont montré que l'activité métabolique était bonne après 24h de culture dans les hydrogels composites (Figure 16(A)).

Grâce à des essais de type Live/Dead qui permettent de différencier au microscope les cellules mortes des cellules vivantes, les hydrogels composites se sont avérés compatibles puisque la viabilité cellulaire était également bonne (100%) après 24h de culture (Figure 16(B)). Comme les cellules du NP diffèrent des fibroblastes puisqu'elles s'apparentent plutôt à des chondrocytes, il serait intéressant d'évaluer la bioactivité de ce matériau en présence de nucléopulpecytes ou de chondrocytes. Le majeur inconvénient de ce modèle provient de la volonté de mimer l'hydratation et l'élasticité du NP en utilisant des biopolymères qui ne font pas partie de la MEC du NP. Par conséquent, même si les polymères sont naturels, ils n'apportent toujours pas le même microenvironnement de l'AF et les mêmes interactions cellules/MEC.

D'autres modèles s'appuient plutôt sur l'usage de biopolymères naturellement présents dans le NP. Si les biopolymères comme le collagène et la gélatine sont sélectionnés pour leur bioactivité, l'acide hyaluronique l'est surtout pour sa capacité d'hydratation. Par conséquent, lorsque des modèles de NP sont développés, ils s'appuient majoritairement sur l'utilisation de l'acide hyaluronique. Par exemple, un groupe de chercheurs a généré des hydrogels d'acide hyaluronique renforcés par réticulation chimique et cellularisés (Kim et al., 2015). Pour cela, ils pré-fonctionnalisent l'acide hyaluronique avec des méthacrylates (HAMA) et ils le gélifient avec le photoinitiateur Irgacure 2959. Des cellules de types nucléopulpecytes de source bovine sont ajoutées à la solution suivi d'une photoréticulation à la lampe UV pendant 10 min afin de permettre la gélification du HAMA ainsi que l'encapsulation des nucléopulpecytes.

Ces hydrogels cellularisés ont été mis en culture dans du milieu pour étudier leur biocompatibilité et leur aptitude à se conduire comme un tissu de NP. Les essais de viabilité cellulaire ont ici été conduits sur 28 jours (Figure 17(A)) qui montre une bonne viabilité cellulaire même si elle a diminué tout au long du temps de culture. De plus, ils ont comparé les propriétés mécaniques dans le temps et se sont aperçus qu'entre 28 et 56 jours de culture, le module de compression dynamique des hydrogels cellularisés avait doublé passant de 1 MPa à 2 MPa (Figure 17(B)), ce qui est proche du tissu natif.

La production de MEC a également été suivie dans le temps par l'intermédiaire de trois types de marquage. Un marquage au Bleu Alcian a permis de détecter la présence de glycosaminoglycane tandis qu'un marquage au Picrosirius Red a permis d'observer la présence de collagène. Enfin, un immunomarquage du collagène de type II a été effectué afin de différencier la production de collagène de type I et de type II. Comme présenté en Figure 17(C), les hydrogels d'acide hyaluronique se sont avérés biocompatibles et propices à la production de

matrice extracellulaire par les nucléopulpcytes. De plus, du collagène de type II a été produit ce qui montre la capacité du biomatériau à se comporter comme le NP pour les cellules. A l'issue de cette étude, des hydrogels d'acide hyaluronique réticulé semblent pouvoir mimer les propriétés mécaniques du NP tout en étant viable quant à la production de MEC similaire au tissu natif.

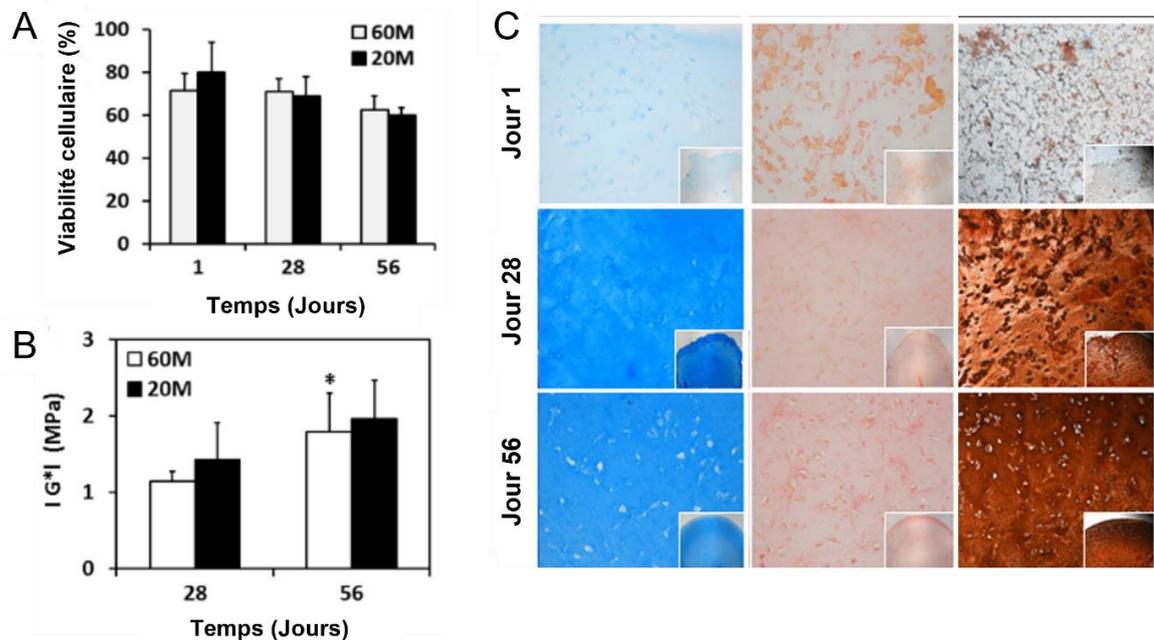


Figure 17 : (A) Viabilité cellulaire déterminée avec des nucléopulpcytes pour deux densités différentes (20 ou 60 millions de cellules.mL⁻¹)(B) Module dynamique des hydrogels cellularisés et (C) immunomarquage au bleu alcian (HA), au picrosirius red (collagène) et du collagène de type II respectivement de gauche à droite sur 56 jours de culture (Kim et al., 2015).

A l'image de la laminine qui augmente les propriétés d'adhérence cellulaire des hydrogels de PEG, un mélange de biopolymères permet d'atteindre une meilleure viabilité cellulaire. Néanmoins, afin de mimer le NP, l'HA doit être majoritaire en masse afin de garder une haute hydratation et de conserver les propriétés mécaniques précédemment observées. Parmi les biopolymères de choix, la gélatine, le collagène et la fibrine semblent les plus adéquats pour ce mélange (Chen et al., 2019; Gansau and Buckley, 2018).

La Gélatine et l'acide hyaluronique, peuvent être fonctionnalisés avec des méthacrylates menant à du GelMA et du HAMA (Chen et al., 2019). Une fois la fonctionnalisation effectuée, ces deux biopolymères sont mélangés en présence d'Irgacure et de cellules souches adipeuses de rat (ASCs) puis photoréticulés pendant 10min sous UV. Cela a donné lieu à la formation d'un réseau hybride. Des ponts covalents entre homopolymères type GelMA-GelMA ou HAMA-HAMA ont été créés à côté des ponts covalents HAMA-GelMA. Ce réseau hybride est composé

de voiles comme observé en Figure 18(A). Les hydrogels générés possèdent un module en compression de $13,44 \pm 0,60$ kPa ce qui est du même ordre de grandeur que pour le tissu natif.

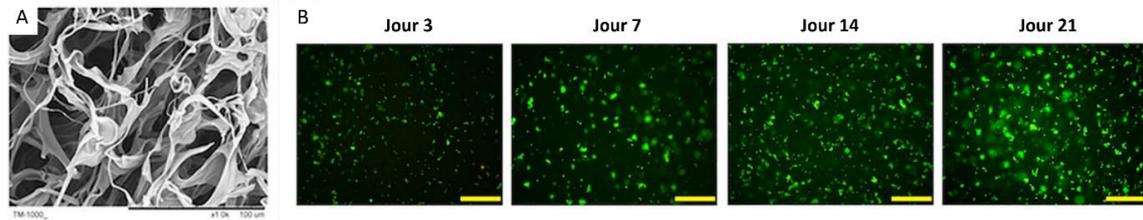


Figure 18 : (A) Ultrastructure du réseau visualisée au MEB (x1k) (barre d'échelle : 100 µm) et (B) Viabilité cellulaire des hydrogels cellularisés avec des ASCs sur 21 jours de culture via Live/Dead (Chen et al., 2019).

Les tests de cellularisation conduits ont eu pour but d'évaluer la différenciation des ASCs en nucléopulpecytes. Pour cela, la viabilité cellulaire et la mesure d'expression des gènes responsables de la différenciation en nucléopulpecytes ont été analysés. Au terme de leur étude, ils sont parvenus à démontrer que leurs hydrogels constituaient un environnement viable pour les ASCs sur 21 jours (Figure 18(B)). Les cellules semblent avoir une morphologie ronde caractéristique des nucléopulpecytes. Afin de vérifier qu'il s'agit bien d'une différenciation en nucléopulpecytes, ils ont ciblé les marqueurs caractéristiques des nucléopulpecytes par immunofluorescence et PCR quantitative. Les marqueurs PAX1, OVOS2, CD24, GLUT-1, COL2A1, ACAN, MMP-2, GPC3 et K19. A l'issue des tests de PCR quantitative, la régulation de ces 9 marqueurs a montré que les cellules parvenaient à sécréter les composants de la matrice extracellulaire du NP et à exprimer les marqueurs des nucléopulpecytes. A l'issue de cette étude, un modèle de NP a été validé avec des hydrogels ayant une structure poreuse permettant d'atteindre une bonne viabilité cellulaire, la différenciation d'ASCs en nucléopulpecytes ainsi que des propriétés mécaniques similaires à celles du tissu natif. La limite de cette étude réside en la photoréticulation des polymères sous UV pour former les hydrogels et encapsuler les cellules. En effet, les UVs peuvent provoquer des modifications d'ADN dans les cellules pouvant perturber leur phénotype. Ainsi une autre voie de réticulation ou bien une photoréticulation plus douce par exemple à la lumière visible serait à envisager pour améliorer ce système.

Enfin, le dernier modèle que nous proposons d'aborder s'appuie cette fois-ci sur la seule présence de composés naturels présents dans le NP natif : le collagène et l'acide hyaluronique (Frayssinet et al., 2020). Pour ce système, l'acide hyaluronique a été fonctionnalisé avec de la tyramine (THA) afin de permettre sa réticulation. Dans le NP, le collagène majoritairement présent est de type II. Néanmoins, de par son coût et sa difficulté à être extrait, celui-ci a été remplacé par du collagène de type I directement extrait de queues de rat. Dans cette étude, différentes formulations de collagène de type I combiné à du THA ont été obtenues

correspondant à différents ratios. Les ratios qui nous intéressent cependant sont ceux mimant le NP c'est-à-dire les ratios collagène/THA de 1 : 2 et 1 : 5. La gélification du collagène a été faite par fibrillation des triple hélice grâce à du PBS et du NaOH. La gélification du THA a été conduite par voie enzymatique en utilisant la peroxydase de Raifort (HRP) combiné à du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2). Ces conditions de réticulation sont plus douces que la photoréticulation précédemment utilisée.

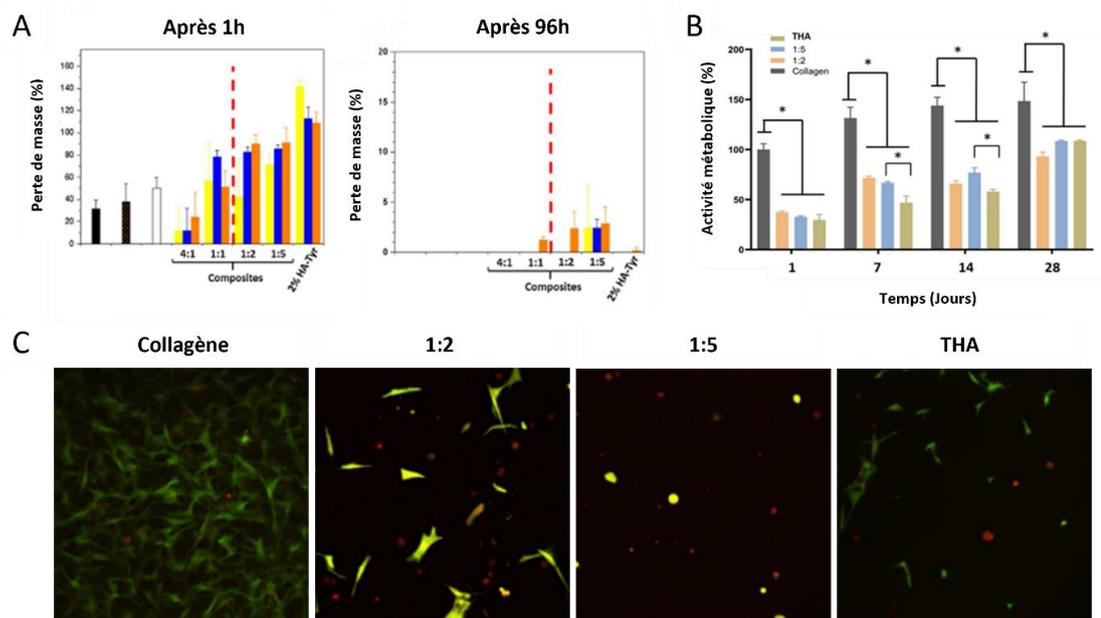


Figure 19 : (A) Perte de masse des hydrogels collagène/THA après dégradation enzymatique accélérée, (B) Activité métabolique des hydrogels cellularisés avec des MSCs et (C) Viabilité cellulaire des hydrogels cellularisés après 28 jours de culture (Frayssinet et al., 2020).

La gélification par fibrillogénèse du collagène et la réticulation enzymatique du THA ont été conduites en simultanée lors du mélange à froid des deux polymères conduisant à la formation d'un réseau hybride. La co-gélification a permis de former un réseau hybride et d'éviter la formation de complexes polyioniques. Les hydrogels formés ont un taux d'hydratation supérieur à 90% et une bonne résistance à la dégradation enzymatique. La dégradation enzymatique a été évaluée en présence d'hyaluronidase et de collagénase sur 96 h (Figure 19(A)). Après 96 h de dégradation enzymatique, la perte de masse a été évaluée en moyenne à 90% et les hydrogels ayant la meilleure résistance sont ceux avec le ratio collagène/THA de 1 : 5. Les propriétés mécaniques des hydrogels ont été multipliées par quatre grâce à la réticulation enzymatique permettant d'atteindre un module d'Young de 3 kPa pour le ratio 1 : 5, ce qui est proche des propriétés mécaniques du NP (environ 5 kPa). La stabilité thermique du réseau fibrillaire de collagène a également été augmentée puisqu'elle a gagné entre 7 et 10°C après réticulation enzymatique attestant bien du réseau hybride entre collagène et THA.

Des études de viabilité cellulaire ont également été conduites afin de valider le modèle. Pour cela, des cellules souches mésenchymateuses humaines (MSCs) ont été incorporées aux formulations puis la co-gélification des deux biopolymères a été déclenché afin d'encapsuler les cellules dans le réseau comme précédemment expliqué. L'activité métabolique a été mesurée sur 28 jours de culture (Figure 19(B)). Après 28 jours, elle n'était pas au même niveau que le contrôle de collagène qui est notre contrôle positif mais l'activité métabolique a augmenté considérablement traduisant une prolifération cellulaire optimale. Les essais de viabilité via Live/Dead ont démontré que ces hydrogels étaient de bons supports pour les cellules puisque la viabilité a été confirmée sur 28 jours (Figure 19(C)). Le phénotype des cellules à la morphologie ronde obtenues a été étudié via PCR quantitative. L'expression d'agrécan, de collagène de type II ainsi que de collagène de type I est détectée attestant de la différenciation des cellules en nucléopulpcytes. La formulation permettant de mimer le mieux le NP et de conserver un phénotype des cellules de NP était celle avec un ratio collagène/THA de 1 pour 5 ; ratio proche de celui présent dans le tissu natif. A l'issue de cette étude qui nous paraît la plus aboutie, un modèle de NP a pu être validé pour un ratio collagène/THA 1 : 5 similaire à celui du tissu natif. Ce modèle remplit tous les critères nécessaires à la modélisation du NP qu'il s'agisse des propriétés mécaniques, de sa fonction d'absorbeur hydraulique, de sa résistance à la dégradation ou encore de sa biocompatibilité et bioactivité. En plus de réunir tous ces critères, il est également celui reproduisant le plus fidèlement la nature biochimique du tissu natif.

II. Les modèles *in vitro* d'Annulus Fibrosus

De par sa structure lamellaire anisotrope complexe, l'Annulus Fibrosus représente un challenge à part entière pour l'élaboration d'un modèle. Parmi les polymères utilisés pour un tel modèle, l'utilisation de biopolymères est favorisée par rapport aux polymères synthétiques. Ces derniers ont tout de même fait l'objet d'études dont les plus avancées sont retranscrites ci-dessous.

1. Les modèles à base de polymères synthétiques

A ce jour, l'un des modèles les plus avancés pour mimer l'Annulus Fibrosus est celui développé par Nerurkar et *al* (Nerurkar et al., 2009). Celui-ci repose sur le procédé d'électrospinning souvent utilisé pour obtenir des filaments avec une orientation spécifique. L'AF étant un tissu fibreux, le modèle repose sur l'électrospinning d'une solution de polycaprolactone

(PCL) pour produire des filaments orientés. Le modèle a été généré par l'équipe de Nerurkar mais il a ensuite fait l'objet d'études complémentaires notamment concernant des essais *in vitro* et *in vivo* par Le Visage et al. Des lamelles de 250 μm de PCL sont electrospinnées avec une orientation préférentielle et collectées comme observé en Figure 20(A). Ensuite les lamelles sont superposées selon deux orientations : parallèles c'est-à-dire dans le même sens ou opposées c'est-à-dire avec un angle de 60° entre deux lamelles comme dans le tissu natif (Figure 20(B)) (Nerurkar et al., 2010, 2009). Puis, à l'image des cellules d'AF confinées entre deux lamelles adjacentes *in vivo*, des BM-MSCs sont déposées entre deux couches. Le confinement se fait alors soit dans le sens parallèle soit dans le sens opposé.

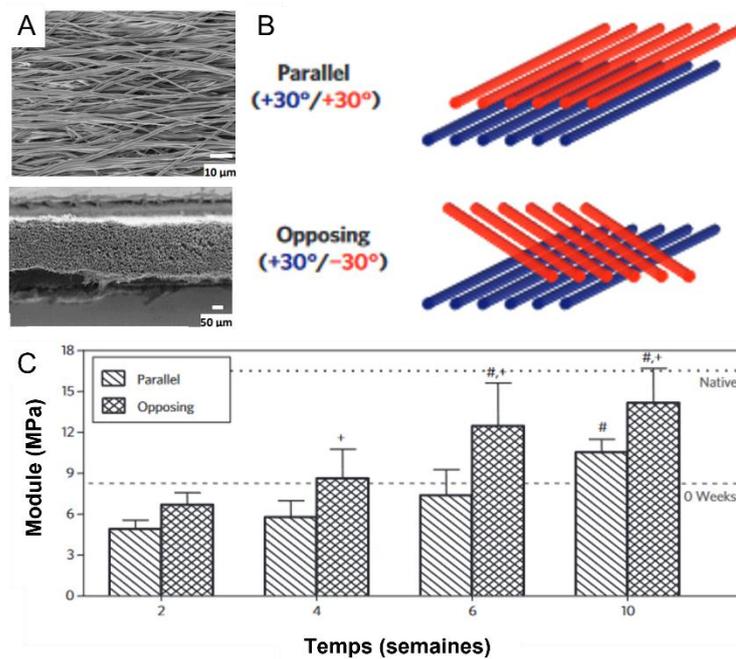


Figure 20 : (A) Observation au MEB des filaments de PCL electrospinnées formant une lamelle orientée (Gluais et al., 2019), (B) stratégie d'orientation des lamelles electrospinnées en position parallèle ou opposée développée (Nerurkar et al., 2009), (C) Propriétés mécaniques des lamelles cellularisés.

Les propriétés mécaniques des lamelles cellularisées ont été mesurés en tension circonférentielle sur 10 semaines de culture (Figure 20(C)). Après 2 semaines de culture, le module des biomatériaux qu'ils soient confinés parallèlement ou dans le sens opposé est presque trois fois plus faible que dans le tissu natif. Néanmoins, un module plus important est mesuré lorsque le sens des deux lamelles superposées est opposé. En effet, cette structure en contreplaqué permet le renforcement des matériaux à plus large échelle puisqu'elle est largement développée dans le milieu des matériaux composites lorsqu'une importante rigidité est visée. Après 10 semaines de culture, les propriétés mécaniques du tissu natif ne sont pas atteintes dans le cas des lamelles parallèles ($10,6 \pm 0,9$ MPa). Dans le cas des lamelles opposés, elles sont similaires

puisque un module circonférentiel de $14,2 \pm 2,5$ MPa est mesuré contre 16 MPa pour l'AF (Elliott and Setton, 2001).

L'augmentation du module de tension circonférentiel dans le temps permet de suggérer la production de matrice extracellulaire qui renforce la jonction entre les deux lamelles et donc leur cohésion. C'est justement un élément qui a été étudié par la suite par Le Visage et al (Gluais et al., 2019). Leur biomatériau, inspiré du modèle de Nerurkar, dispose de 88% de fibres de PCL orientées à 20° par rapport à la normale et d'une porosité de 81% (Gluais et al., 2019). La détermination de la porosité est un paramètre clé lorsqu'on cellularise un matériau puisque les pores sont des niches permettant aux cellules de se développer et de proliférer. Ils sont ensuite parvenus à implanter ce modèle non cellularisé chez le mouton afin d'effectuer des tests *in vivo*. Pour cela, un défaut a été créé dans l'AF natif et l'AF biomimétique y a été placé pour évaluer sa biointégration (Figure 21(A)). La colonisation, la morphologie et l'organisation des cellules d'AF ont été étudiées dans l'implant après explantation au bout de 4 semaines.

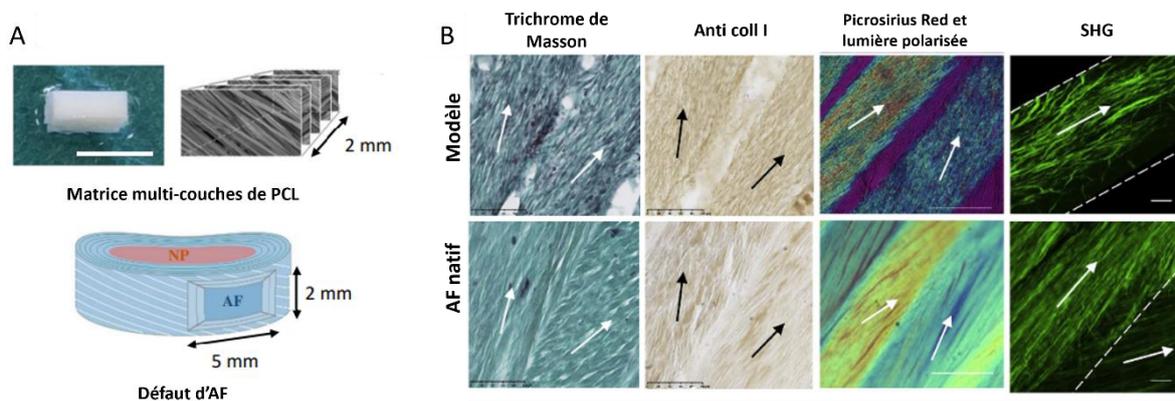


Figure 21 : (A) Stratégie d'implantation du matériau chez le mouton par génération d'un défaut dans la partie externe de l'AF et (B) Observation de la production de collagène de type I, de l'orientation du collagène produit par les cellules le long des fibres de PCL (Gluais et al., 2019).

Après 4 semaines d'implantation, les cellules sont alignées le long des fibres de PCL comme observé en Figure 21(B). Les flèches blanches et noires montrent l'orientation préférentielle qui a également été détectée. Le dispositif multilamellaire s'est avéré induire la production de tissus collagéniques fibreux via des marquages histologiques et l'utilisation de microscopie à génération de seconde harmonique (SHG) et de lumière polarisée comme observé au sein de l'AF natif.

A l'issue de cette étude, un modèle d'AF à base de filament de polycaprolactone a été généré. Ce matériau dispose de propriétés mécaniques similaires à celles du tissu natif après 10 semaines de culture. Après 4 semaines d'implantation *in vivo*, le matériau est biocompatible et peut être colonisé par des cellules d'AF qui sont alignées le long des fibres de PCL. De plus, ils

sont parvenus à démontrer qu’après explantation, de la matrice extra-cellulaire et notamment du collagène de type I avait été produite sur les fibres de PCL. L’inconvénient majeur de ce modèle reste sa biochimie. Le PCL étant un polymère synthétique qui n’est pas naturellement présent dans l’AF natif, la biochimie n’est pas mimée et donc a potentiellement un impact sur la communication avec les cellules qui est alors ralentie et donc non optimale. Néanmoins, ce dernier modèle reste à ce jour le plus avancé et le plus prometteur.

L’électrospinning a également été utilisé pour l’élaboration d’un second modèle développé à partir de poly-L-acide lactique (PLLA) (Zhou et al., 2021). A travers cette preuve de concept développée sur trois couches, les auteurs ont voulu faire varier le diamètre des fibres pour voir leur incidence sur la différenciation de MSCs en cellules d’AF. Pour cela, le PLLA a été mis en forme par électrospinning afin d’obtenir des fibres alignées aux dimensions contrôlées selon trois diamètres de fibres différents (Figure 22(A)). Les fibres obtenues sont de taille petite ($0,5 \pm 0,08 \mu\text{m}$), moyenne ($1,00 \pm 0,16 \mu\text{m}$) ou grande ($3,19 \pm 0,19 \mu\text{m}$) et sont alignées comme présenté en Figure 22(B).

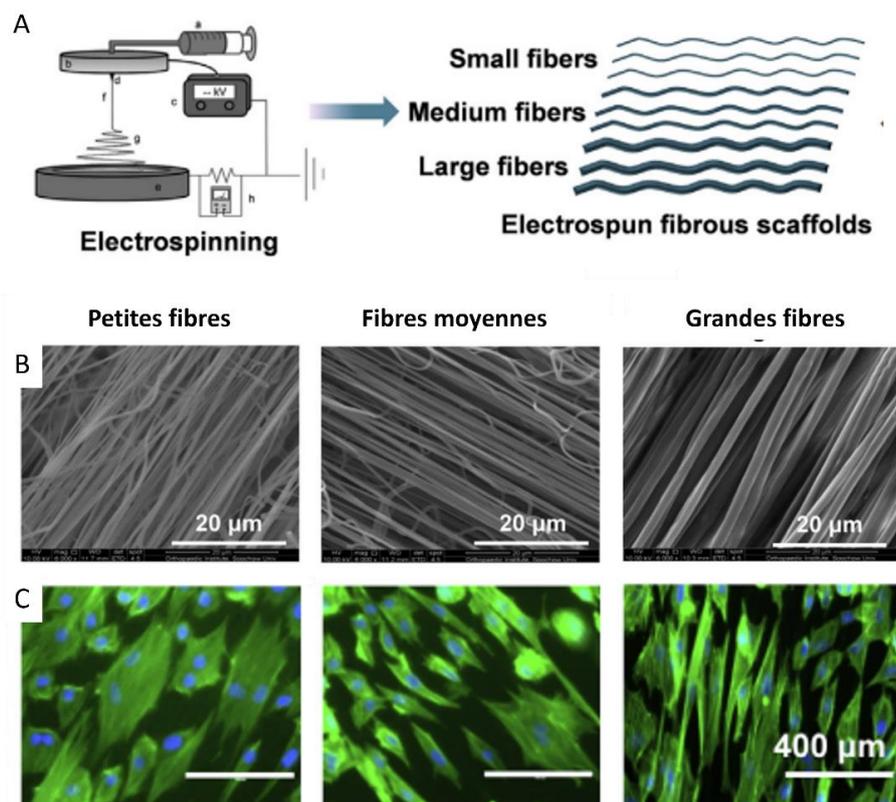


Figure 22 : (A) Stratégie d’électrospinning de fibres de PLLA de trois tailles différentes (B) Observations au MEB des trois types de fibres électrospinnées et (C) Marquage des noyaux et des cytoplasmes des cellules ensemencées on top des fibres de PLLA électrospinnées (Zhou et al., 2021).

Une fois les filaments aux diamètres contrôlés collectés, les matrices ont été cellularisées via des dépôts de cellules on top de chaque couche. Ainsi, les cellules ont pu être confinées en empilant les trois couches cellularisées. A travers cette étude, ils sont parvenus à montrer que lorsque le diamètre des fibres était faible les MSCs adoptaient une morphologie chondrocytaire ronde. A contrario, les MSCs mises en contact de plus grandes fibres avaient une morphologie typique des fibroblastes allongés (Figure 22(C)). Par ce biais, ils voulaient reproduire la structure de l'AF natif dans laquelle les lamelles s'épaississent de l'intérieur vers l'extérieur avec des chondrocytes à l'intérieur et des fibroblastes à l'extérieur. Les phénotypes chondrocytaire ou fibroblastique selon le diamètre des fibres ont été vérifié via PCR quantitative en ciblant l'expression des gènes chondrocytaires. Cela aurait pu être directement comparable au tissu natif si l'expérience se faisait sur des lamelles similaires à celles de l'AF. Or, la comparaison est faite entre des fibres pour le modèle et des lamelles qui sont des assemblages de fibres, ce qui ne correspond pas à la même échelle d'interactions et d'activité. Cependant l'idée de fabriquer un gradient d'épaisseur de lamelles et non pas de fibres pourrait être intéressante pour un modèle d'AF.

2. Les modèles à base de polymères naturels

De plus en plus de modèles à base de biopolymères émergent. Ils se différencient par l'usage de polymères différents mais surtout par l'utilisation de procédés de mise en œuvre différents.

De par le caractère fibreux de l'AF, des biopolymères fibreux sont majoritairement utilisés. Le modèle à suivre s'appuie sur un procédé similaire à l'électrospinning (Chuah et al., 2021). Celui-ci utilise un dispositif d'enroulement afin de générer des fibres composites de polyélectrolytes. Ces fibres composites sont composées d'un mélange d'alginate et de collagène. Pour les former, deux solutions stocks sont utilisées : une première composée de chlorure de calcium et de collagène dilué à $0,3 \text{ mg.mL}^{-1}$ et une seconde d'alginate à 1,5% en masse avec des cellules couches mésenchymateuses (MSCs) ajoutées à une concentration de 5×10^6 cellules par mL. Les deux solutions sont ensuite mélangées formant un gel de polyélectrolytes encore visqueux qui est immédiatement filé à l'aide d'une aiguille 18G par enroulement pour former une matrice multilamellaire cellularisée (Figure 23(A)). Lors d'une dernière étape, la structure est fixée avec une solution d'alginate et de chlorure de calcium. Le chlorure de calcium permet de complexer l'alginate et de le gélifier. Certains hydrogels cellularisés ont subi une induction avec de l'acide ascorbique. En effet, l'acide ascorbique aussi appelé vitamine C joue un rôle important dans la biosynthèse du collagène de type I et donc dans la régénération des tissus.

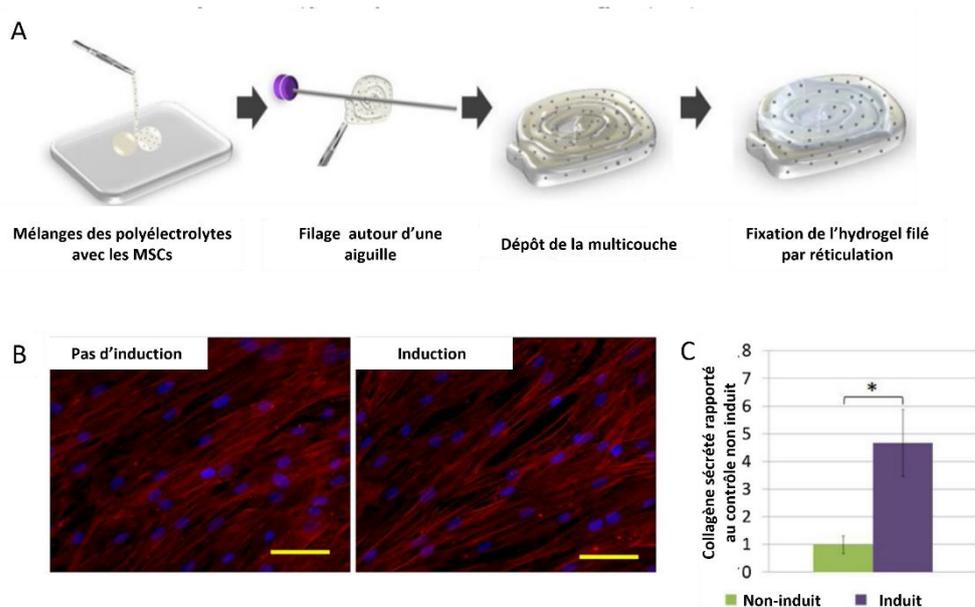


Figure 23 : (A) Etapes du procédé de mise en forme du matériau multilamellaire cellularisé (B) Marquage des cellules ensemencées après 7 jours de culture avec et sans induction (noyau : bleu et filaments d'actine : rouge) et (C) Impact de l'induction à l'acide ascorbique sur la quantité de collagène de type I sécrété après 1 semaine de culture (Chuah et al., 2021).

Après 1 semaine de culture, un marquage des noyaux au DAPI (bleu) et des filaments d'actine (rouge) à la rhodamine phalloïdine a été effectué pour visualiser la morphologie des cellules (Figure 23(B)). Pour les deux conditions d'induction ou non, les cellules ont adhéré et paraissent allongées comme des cellules d'AF de type fibroblastiques. De plus elles semblent à confluence et toutes alignées dans la même direction. Néanmoins, il serait judicieux de vérifier l'anisotropie du gel dans sa profondeur afin de vérifier qu'elles soient également alignées et fibroblastiques au cœur du matériau et qu'il ne s'agit pas que d'un effet de surface. Ils sont tout de même parvenus à développer une stratégie pour stimuler les cellules puisqu'avec induction à l'acide ascorbique, celles-ci sécrètent jusqu'à 5 fois plus de collagène de type I que lorsqu'il n'y a pas d'acide ascorbique (Figure 23(C)). L'expression des gènes associés aux cellules d'AF a également été ciblé via PCR quantitative ce qui a démontré que ceux-ci étaient exprimés de manière similaire au tissu natif. Si la bioactivité et le phénotype cellulaire induits par ce matériau semble correctes, aucune information n'a été communiquée sur ses propriétés physiques ne permettant pas de le valider complètement comme modèle d'Annulus Fibrosus même si les résultats de cytotoxicité sont très encourageants.

Le dernier modèle d'Annulus Fibrosus traité dans ce manuscrit a été élaboré via impression 3D d'un mélange de polymères naturels (Bhunja et al., 2021). L'impression 3D a

l'avantage de pouvoir générer des structures orientées avec une bonne résolution. Pour utiliser ce procédé, une encre homogène doit être générée.

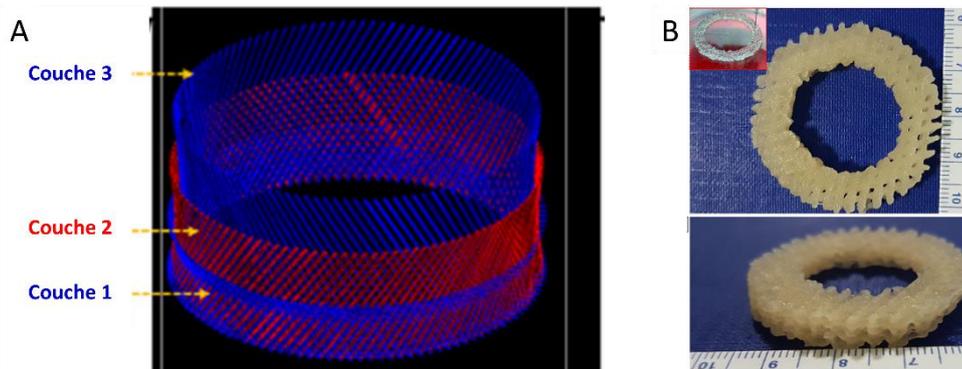


Figure 24 : (A) Modèle informatique simplifié sur trois couches montrant l'angle de 60° entre deux couches et (B) Hydrogel hybride de carraghénane et de fibroïne de soie généré par impression de micro-extrusion (Bhunia et al., 2021).

L'encre utilisée pour le modèle de Mandal et *al.* repose sur un mélange de carraghénane qui est un glycosaminoglycane et de fibroïne de soie. Le carraghénane, comme tout glycosaminoglycane, apporte de l'hydratation à la structure alors que la fibroïne de soie apporte l'élasticité fibreuse à l'image du collagène dans le tissu natif. Des filaments sont extrudés de cette encre pour donner un matériau hybride par impression 3D de micro-extrusion. Le modèle généré prend en compte l'alignement des fibres à 30° par rapport à la normale et permet d'obtenir une alternance à $\pm 30^\circ$ en distinguant des couches paires et impaires (Figure 24(A)). Chaque couche mesure 250 μm et l'impression a été construite sur 20 couches afin de mimer la structure de l'AF (Figure 24(B)). La caractérisation physique de l'hydrogel généré a permis de confirmer l'alignement des fibres en plus de valider les propriétés mécaniques qui sont similaires à l'AF. En effet, une résistance mécanique de 78kPa a été mesurée, ce qui est supérieur à l'AF natif (37kPa pour les porcins) mais reste du même ordre de grandeur.

Ils sont également parvenus à conduire une étude *in vitro* sur 14 jours. Pour cela, deux types de cellules ont été utilisés : des cellules d'AF porcines et des cellules souches adipeuses (ASCs). Celles-ci ont été déposées sur les hydrogels imprimés après les avoir préconditionnés dans du milieu de culture pendant 1 nuit. Les hydrogels cellularisés ont ensuite été mis en culture pendant 14 jours avec des suivis réguliers de l'activité métabolique cellulaire (Figure 25(A)). Au cours des 14 jours, l'activité métabolique augmente graduellement pour les deux types cellulaires. Les cellules d'AF semblent tout de même avoir une meilleure prolifération que les ASCs puisque leur activité métabolique est légèrement supérieure aux jours 7 et 14. L'hydrogel généré semble être un bon support pour les cellules d'AF puisqu'après 14 jours de culture, l'activité métabolique des cellules d'AF a augmenté de 50% par rapport au jour 1 (Figure 25(A)).

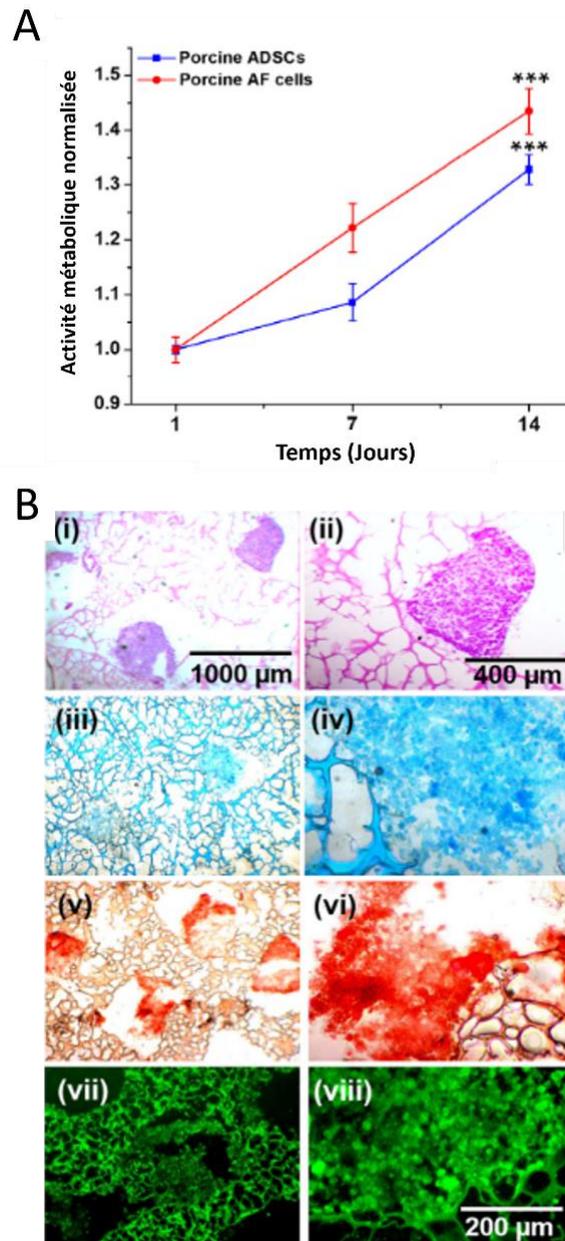


Figure 25 : (A) Suivi de l'activité métabolique des hydrogels de carraghénane et de fibroïne de soie cellularisés avec des cellules d'AF ou des ASCs sur 14 jours de culture et (B) Observation microscopique du modèle cellularisé après 14 jours par (i)(ii) Coloration Hematoxyline & Eosine pour visualiser les cellules d'AF (iii)(iv) Coloration à l'Alcian Blue pour visualiser la production de GAGs (v)(vi) Coloration au Picrosirius Red pour visualiser la production de collagène de type I (vii)(viii) immunofluorescence pour visualiser les cellules vivantes (Bhunja et al., 2021).

Ils ont également procédé à des marquages histologiques pour cibler la présence des cellules ainsi que de matrice extracellulaire après 14 jours de culture. Après 14 jours de culture, des structures sont effectivement marquées en rouge (collagène) et en bleu (GAGs) permettant de déduire que de la matrice extra-cellulaire a bien été sécrétée par les cellules. Les résultats du marquage au bleu alcian sont néanmoins à prendre avec des pincettes puisque l'encre est

composée de carraghénane qui est un GAGs anionique pouvant également être marqué par le bleu alcian. En effectuant de l'immunofluorescence, ils sont parvenus à montrer que les cellules étaient toujours en vie après 14 jours de culture (Figure 25(B)(vii)(viii)). Le biomatériau a également été implanté *in vivo* afin d'évaluer son immunogénicité qui s'est avérée minimale. Ce modèle est également bien avancé et semble prometteur puisqu'il utilise des biopolymères d'origine naturelle néanmoins la fibroïne n'étant pas un polymère de mammifère ceci diverge du tissu natif.

A ce jour, aucun modèle d'AF ne parvient à mimer l'environnement cellulaire, biochimique et physique du tissu natif même si les procédés utilisés et les résultats de cytotoxicité semblent prometteurs. Un modèle reposant sur des polymères naturellement présent dans l'Annulus Fibrosus permettant de mimer au plus proche le tissu, d'avoir une cytotoxicité minimale en plus de promouvoir une bioactivité bien supérieure reste à développer.

III. Modèles de disque intervertébral

1. Simulation informatique de la mécanique d'un modèle de disque intervertébral

Aujourd'hui, aucun modèle *in vitro* de disque intervertébral n'a encore été approuvé. Avant même de le mimer physiquement à l'aide de biomatériaux, des chercheurs ont tenté de le mimer informatiquement. Pour cela, une multitude d'étude de simulation 3D est en développement afin de mieux comprendre la mécanique du disque et chacune de ces structures. Ces simulations s'appuient en général sur l'utilisation du modèle à éléments finis et sont comparés aux données expérimentales recensées dans la littérature.

Par exemple, l'équipe du Pr Baaijens a publié une série d'articles permettant de mieux cibler la mécanique du disque (Schroeder et al., 2006). Ils sont parvenus à combiner les forces élastiques, visqueuses et osmotiques afin d'établir des profils 3D de contraintes mécaniques. Ceci représente une belle avancée dans le domaine des modèles 3D simulés puisque les autres modèles déjà établis négligeaient les forces osmotiques essentielles dans la mécanique et la réorganisation du tissu. Ils ont développé un modèle 3D de gonflement poro-viscoélastique renforcé de fibrilles sur un disque intervertébral sous charge compressive axiale. Ils sont ensuite parvenus à modéliser la pression intradiscale et osmotique en comparant leur modèle virtuel aux données expérimentales mesurées sur des disques humains post-mortem. Malgré cela, ils ont constaté des différences de profil de contraintes entre les données expérimentales et les données simulées. Ces

différences sont majoritairement dues au fait que leur modèle 3D n'intègre pas la présence d'une zone transitoire entre NP et AF comme c'est le cas dans le tissu natif. Il s'agit donc d'un matériau discontinu alors que le disque natif est un matériau continu d'où l'importance d'intégrer cette zone transitoire aux nouveaux modèles de disque intervertébraux. Afin de compenser ce défaut, ils ont par la suite ajouté un réseau fibrillaire secondaire à leur simulation calquée sur l'organisation des fibres de collagène dans l'AF par l'élaboration d'un nouveau modèle appelé OVED pour modèle de disque osmo-poro-visco-hyper élastique (Schroeder et al., 2010).

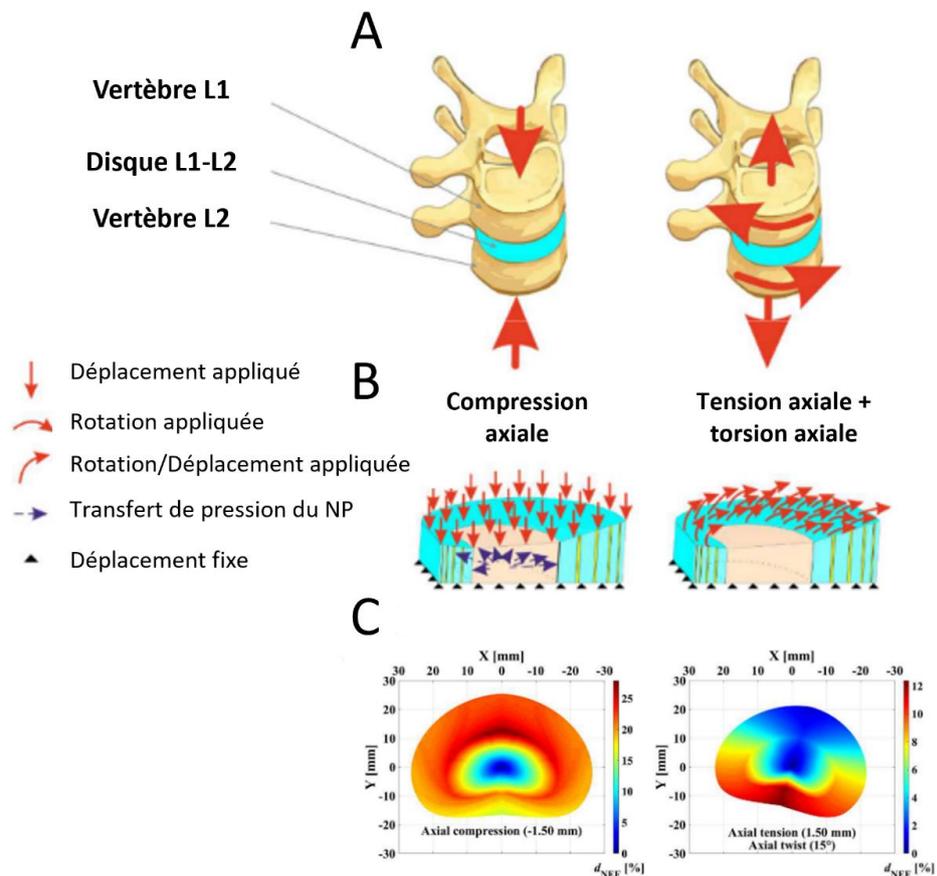


Figure 26 : (A) Schéma d'une compression axiale du disque et d'une combinaison de tension et de torsion axiales (B) Représentation des forces appliquées sur le disque pour les deux sollicitations considérées et (C) profil de contrainte ressenti par le disque sous sollicitation (Tamoud et al., 2022).

Cette compensation par l'utilisation d'un réseau de fibres est de mieux en mieux développée à mesure qu'on comprend le réseau fibrillaire présent dans l'AF (Tamoud et al., 2022). Dans cette dernière étude de simulation 3D, ces chercheurs ont pris en compte la présence de fibres de collagène ainsi que leur orientation spécifique dans l'AF. Ils ont également inclus la présence de protéoglycanes et donc de la MEC et les interactions entre l'AF et le NP par le biais d'une zone transitoire. Ce modèle a été développé sous différentes contraintes subies par le disque au quotidien. Deux d'entre elles ont été jointes ci-dessous afin de mieux illustrer cette étude : une

contrainte simple de compression (gauche) et une contrainte combinée de tension axiale et de torsion axiale (droite) (Figure 26(A)). Les forces appliquées au disque dans ces deux cas ont ensuite été étudiées et pointées par la présence de flèches différentes suivant la force exercée (Figure 26(B)). Il s'agit de l'intermédiaire de simulation informatique permettant par la suite d'évaluer les profils de contrainte (Figure 26(C)). Comme observé, selon si le NP, la zone transitoire ou l'AF est sollicité, la contrainte ressentie n'est pas la même. Néanmoins, dans les deux cas, l'AF semble directement impacté puisqu'il subit une contrainte plus importante que le NP. En effet, de par son hydratation et sa grande déformabilité, le NP parvient à subir moins de contraintes, l'AF agit comme une protection portant toutes les forces exercées. Ces derniers ont été comparés aux données recensées expérimentalement dans la littérature et semblent être en adéquation avec celle-ci.

Finalement, ils sont parvenus par l'utilisation de ce nouveau modèle à étudier l'impact des contraintes sur la morphologie du disque, sur les lamelles concentriques de l'AF ainsi que sur les nanofibres élastiques du disque. Pour aller plus loin et valider ce nouveau modèle 3D simulé, il faudrait comparer leurs simulations aux IRM de patients ce qui n'a pas encore été fait.

2. Les modèles *in vitro* de disques intervertébraux

Une fois que la mécanique du disque est mieux appréhendée, il est possible de développer des modèles *in vitro* prenant en compte pression osmotique, composition et viscoélasticité du tissu. Aujourd'hui, trois types de modèles sont bien avancés.

Le premier repose sur l'élaboration d'une matrice composée d'acide hyaluronique et de nanofibres de PLLA (Nesti et al., 2008). L'acide hyaluronique a été sélectionné pour mimer le NP au centre du dispositif et le PLLA l'Annulus Fibrosus tout autour. Dans un premier temps, les nanofibres de PLLA ont été formées par électrospinning puis collectées formant ainsi l'AF. Dans un second temps, des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) y sont déposées et cultivées. Enfin, le NP est généré lors d'une ultime étape par injection d'un hydrogel d'acide hyaluronique au centre de la matrice cellularisée pour la faire gonfler de l'intérieur et générer une allure de disque intervertébral (Figure 27(A)).

La morphologie des cellules a été observée par marquage H&E pendant 28 jours. Alors qu'aucune cellule n'est visible après 7 jours de culture dans l'hydrogel d'acide hyaluronique, un allongement des MSCs est observé dans les fibres de PLLA mimant l'AF. Après 14 jours, des cellules commencent à être décelées dans l'hydrogel d'HA puis elles sont clairement visibles au 28^{ème} jour manifestant une prolifération qualitative sur 28 jours. Les cellules observées dans la zone mimant le NP semblaient rondes alors que celles situées dans la zone mimant l'AF

semblaient plus allongées comme dans le tissu natif. Néanmoins, ceci n'a été observé que par marquage H&E ce qui n'est pas le plus révélateur en termes de morphologie cellulaire. Une analyse par marquage fluorescent des noyaux et des filaments d'actine auraient intéressante afin d'étudier la morphologie des cellules.

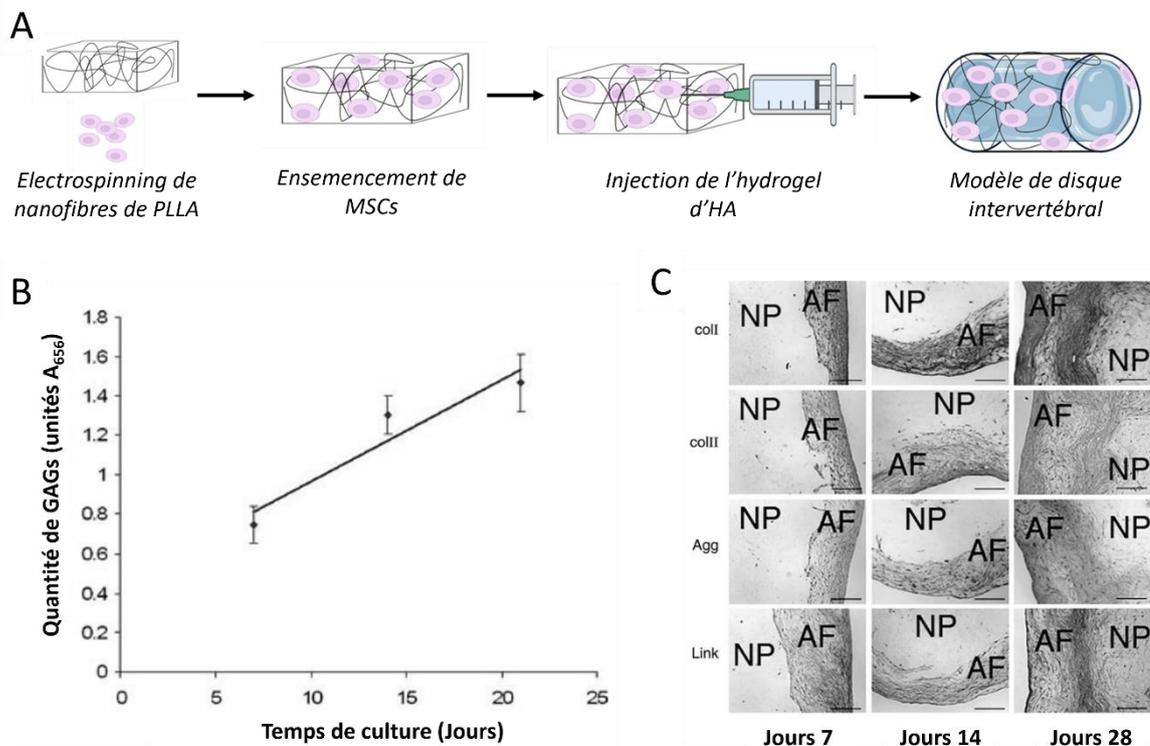


Figure 27 : (A) Stratégie d'élaboration du modèle de disque par électrospinning de nanofibres de PLLA suivi de l'injection d'un hydrogel d'acide hyaluronique, (B) Quantification de la production de GAGs sur 21 jours de culture de MSCs cellularisées dans le modèle et (C) Marquage par immunohistochimie du collagène de type I, collagène de type II, agrécane et des protéines de liaisons sur 28 jours de culture (Nesti et al., 2008).

Par la suite, ils sont parvenus à montrer que les cellules produisaient de la MEC dans la partie NP et dans la partie AF en quantifiant la quantité de GAGs sécrétée pendant 21 jours de culture (Figure 27(B)). En effet, celle-ci a doublé entre le 7^{ème} jour de culture et le 21^{ème} jour. La présence de collagène de type I, de type II ainsi que d'agrécane et de protéine de liaison a également été ciblée par immunohistochimie (Figure 27(C)). Ces quatre composants de la matrice extra-cellulaire semblent être produits en plus grande quantité au 28^{ème} jour significatif de la production de matrice extra-cellulaire de type cartilagineuse. L'étude de ce modèle reste tout de même incomplète puisque le phénotype des cellules spécifiques à chaque zone, la viabilité cellulaire, les propriétés physiques du matériau, l'orientation des fibres de PLLA et leur influence sur les cellules n'ont été étudiés. De plus, l'orientation des fibres de PLLA semble être aléatoire alors que tout l'intérêt d'utiliser l'électrospinning réside en l'orientation contrôlée des fibres à

l'issu du procédé. Peut-être qu'en contrôlant cet alignement et donc l'anisotropie de la partie mimant l'AF, un impact pourra être observé sur les cellules et leur phénotype.

Le second modèle repose sur une stratégie totalement différente s'apparentant plutôt à de l'impression 3D (Sun et al., 2021). Celui-ci requiert l'impression 3D d'une encre mimant le NP, l'AF et les plateaux cartilagineux d'une part et l'utilisation d'un support en PCL d'autre part (Figure 28). Pour cela, leur modèle de disque est divisé en 5 parties. Dans un premier temps, un support en PCL est imprimé en 3 parties :

- Un socle inférieur représentant le plateau cartilagineux inférieur
- Un socle supérieur représentant le plateau cartilagineux supérieur
- Un support de contour pour maintenir le biomatériau mimant l'AF.

Ce support en PCL a pour objectif d'apporter un soutien mécanique à la structure.

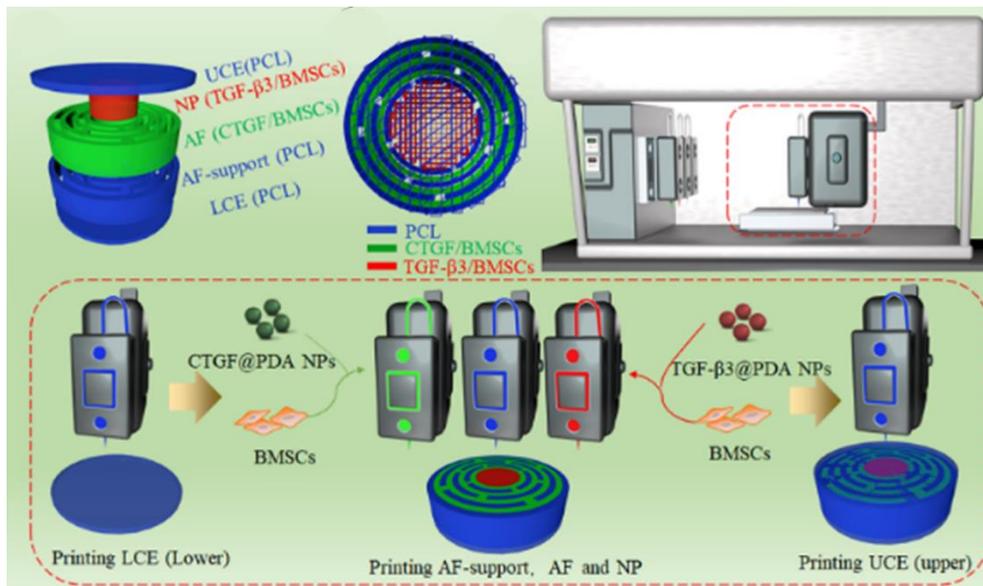


Figure 28 : Stratégie d'élaboration d'un modèle de disque composé de deux encres de gélatine, d'acide hyaluronique et d'alginate, de facteurs de croissance et d'un support en PCL (Sun et al., 2021).

Dans un second temps, deux bioencres différentes sont imprimées mimant le NP ou l'AF respectivement. Elles sont toutes deux composées d'un assemblage de cellules avec des facteurs de croissances et un hydrogel. Les cellules utilisées sont des cellules souches mésoenchymateuses (MSCs) de la moelle osseuse dans les deux cas et l'hydrogel est également le même composé de gélatine, d'acide hyaluronique et d'alginate. Alors que la gélatine permet d'apporter la partie fibreuse et la bioactivité au matériau, l'alginate et l'acide hyaluronique apportent l'hydratation (Figure 28).

Les facteurs de croissance sont introduits dans l'encre en les greffant préalablement sur des nanoparticules de polydopamine ayant été pré-synthétisées par polymérisation oxydative. Ce greffage repose sur l'excellente adhérence des facteurs de croissance à la surface des nanoparticules de Pour les deux encres, les facteurs de croissance utilisés sont ceux permettant la différenciation des cellules souches en cellules d'AF ou de NP présents dans les tissus conjonctifs natifs. Pour l'encre mimant le NP, des TGF- β 3 ont été utilisés alors pour l'encre mimant l'AF, il s'agit de CTGF.

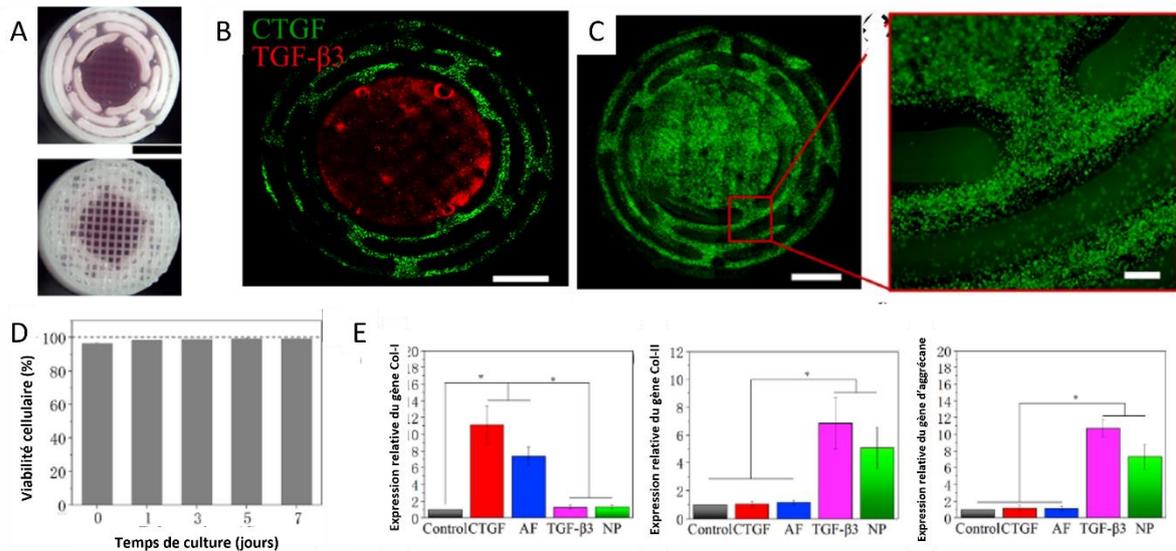


Figure 29 : (A) Modèle complet de disque intervertébral après impression 3D et réticulation de l'alginate (B) Photo prise par fluorescence au microscope confocal de la répartition des deux encres en fonction du facteur de croissance utilisé (C) Live/Dead après 7 jours de culture (D) Suivi de viabilité cellulaire par Live/Dead sur 7 jours (E) Expression relative des gènes coll-I, coll-II et agrégane après 28 jours de culture par RTq-PCR (Sun et al., 2021).

Une fois ces deux encres imprimées dans le support en PCL, les deux hydrogels sont réticulés avec du chlorure de calcium pour rendre le biomatériau cohésif. Après des rinçages successifs pour éliminer le chlorure de calcium en excès, le dispositif est mis en culture pour évaluation de sa bioactivité. Le biomatériau obtenu dispose de parties blanches représentant le support en PCL et de parties roses propres aux deux hydrogels composites modélisant le NP et l'AF (Figure 29(A)). Le modèle mesure 14mm de diamètre pour 4 mm de hauteur et les deux encres ont pu être observées par fluorescence pour vérifier qu'il n'y ait pas eu de problème de diffusion durant l'impression 3D (Figure 29(B)). La viabilité cellulaire a été évaluée sur 7 jours via Live/Dead comme montré en Figure 29(C) et (D). Au 7^{ème} jour, la viabilité cellulaire était toujours quasiment à 100%. L'expression génique du collagène I et II, de l'agrégane vont dans le même sens pour l'encre au TGF- β 3 et le contrôle de NP et pareillement pour l'encre CTGF et l'AF (Figure 29(E)). Ceci atteste de l'utilité des facteurs de croissance qui ont permis de différencier les cellules afin qu'elles se comportent comme des cellules d'AF ou de NP selon

l'encre utilisée. Ce modèle reste incomplet et ne nous semble pas être le plus adéquats pour plusieurs raisons. Tout d'abord, il repose sur l'utilisation de polymère synthétique (PCL) et de polymères naturels non présents dans le tissu natif (alginate et gélatine) ne permettant pas de reproduire l'environnement biochimique du disque. De plus, les propriétés physiques de ce biomatériau n'ont pas été discutées ne permettant pas de le valider en tant que modèle de disque intervertébral. Finalement, la composition des encres reproduisant le NP et l'AF hors facteurs de croissance étant la même, les différences de propriétés et de composition entre les deux tissus ne sont pas reproduites.

Enfin, le dernier modèle de disque intervertébral que nous avons souhaité traiter utilise une machine d'enroulement dont le fonctionnement est similaire à l'électrospinning (Bhattacharjee et al., 2012). Ce modèle repose sur l'assemblage d'un support fibreux et d'un hydrogel central composés tous les deux de fibroïne de soie. Il est généré en deux étapes.

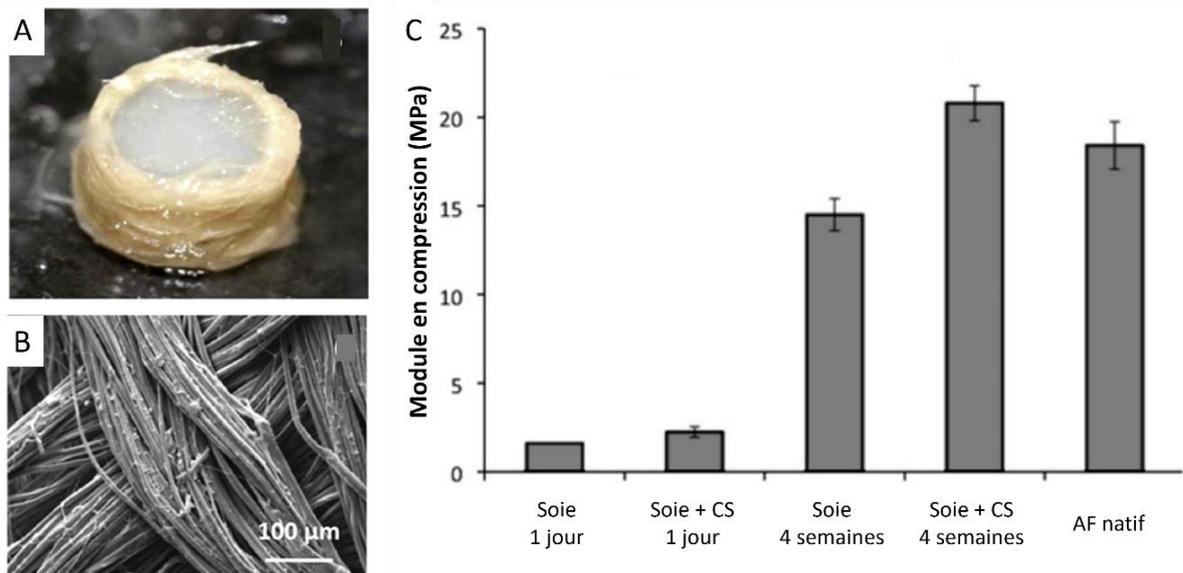


Figure 30 : (A) Modèle de disque intervertébral composé de fibroïne de soie, (B) Ultrastructure des fibres mimant l'Annulus Fibrosus agencées avec des angles de 60° entre chaque couche et (C) Module en compression de la partie AF cellularisée et mis en culture pendant 4 semaines (Bhattacharjee et al., 2012).

Dans un premier temps, un hydrogel de fibroïne de soie est placé au centre de la machine d'enroulement pour former la structure mimant le NP. Dans un second temps, des fibres de fibroïne de soie sont enroulées de façon alignée autour de l'hydrogel central avec des orientations de 60° entre chaque couche enroulée pour reproduire la structure de l'AF. Lors d'une dernière étape, la matrice est renforcée par réticulation chimique avec du chondroïtine sulfate pour donner le matériau présenté en Figure 30(A). L'architecture de l'AF a été reproduite avec succès puisque

les lamelles de fibres s'entrecroisent bien avec une orientation de $\pm 30^\circ$ par rapport à la normale (Figure 30(B)).

Aucune donnée n'est communiquée concernant les performances et la caractérisation de l'hydrogel central mimant le NP dans cet article. Leur étude repose surtout sur l'évaluation de la bioactivité ainsi que de la biomécanique des fibres de fibroïne de soie utilisées pour mimer l'AF. Pour cela, des chondrocytes humains ont été incorporés dans la matrice enroulée sans l'hydrogel central. La viabilité n'a été évaluée que de manière qualitative puisqu'à l'issue d'un test MTT après seulement 1 jour de culture, une coloration violette a été observée attestant d'une bonne activité métabolique. Ceci n'est cependant pas suffisant pour qualifier la viabilité cellulaire. Pour cela il faudrait suivre l'activité métabolique ainsi que le nombre de cellules mortes et vivantes sur plus de temps pour avoir un suivi et le faire de manière quantitative. De plus, l'objectif étant d'étudier le comportement de la partie mimant l'AF, les chondrocytes ne semblent pas être le choix de plus judicieux puisque les cellules d'AF s'apparentent plutôt à des fibroblastes. Néanmoins, ils sont tout de même parvenus à démontrer que leur modèle permettait de modéliser la biomécanique de l'AF après 4 semaines de culture en ayant un module de compression autour de 20MPa, ce qui est similaire à celui du tissu natif (Figure 30(C)). L'augmentation significative du module de compression entre le 1^{er} jour de culture et la 4^{ème} semaine montre bien qu'il y a eu génération de matrice extracellulaire résultant en un renforcement des propriétés mécaniques du matériau. Lors de cette étude, ils sont parvenus à démontrer que des chondrocytes pouvaient vivre, proliférer, s'aligner et produire de la matrice extracellulaire cartilagineuse sur 4 semaines.

Néanmoins, la biomécanique de l'assemblage n'a pas encore été étudiée et le choix des cellules devra être adapté puisqu'AF et NP ne présentent pas les mêmes phénotypes cellulaires. De plus, l'environnement biochimique n'est pas similaire à celui du tissu natif même si la présence de chondroïtine sulfate a été pensée à ces fins.

Pour conclure, aucun modèle de disque intervertébral ne possède toutes les caractéristiques nécessaires pour reproduire fidèlement l'Annulus Fibrosus. Certaines stratégies semblent être encourageantes et mènent vers une utilisation de biopolymères pour mimer le microenvironnement cellulaire. L'environnement biochimique est un facteur clé lorsqu'on cherche à mimer un tissu vivant puisqu'il fournit des signaux spécifiques aux cellules. C'est pourquoi, nous pensons qu'il serait plus judicieux de développer un modèle composé uniquement de polymères naturels présents dans le disque natif. Pour sélectionner ces biopolymères, il suffit de prendre en compte les résultats obtenus par les différents groupes pour l'élaboration de modèles d'AF, de NP ou de disque complet. L'acide hyaluronique et le collagène semblent alors

être des candidats de choix puisqu'ils sont tous deux présents dans le disque intervertébral. L'acide hyaluronique permettra alors de mimer l'hydratation du tissu alors que le collagène permettra de mimer l'aspect fibreux de celui-ci en plus d'apporter de la bioactivité. En utilisant ces deux polymères, nous espérons pouvoir combiner leur potentiel pour obtenir un matériau viscoélastique similaire au disque.

Chapitre 4 : Les biopolymères en ingénierie tissulaire

I. Le collagène

1. Intérêt du collagène en ingénierie tissulaire

Le collagène est la protéine la plus abondante de la MEC, c'est pourquoi elle est un candidat de choix pour l'ingénierie tissulaire. Il existe 28 types différents de collagène mais le plus abondant dans l'organisme est le collagène de type I, qui représente 70% du collagène total (Terzi et al., 2020). Ce dernier est présent dans la peau, les tendons, les ligaments, les os et dans les différents tissus conjonctifs. Le collagène de type II qui est le second plus abondant est présent dans le cartilage, l'humour vitrée, le nucleus pulposus du disque intervertébral, la rétine et la notochorde. Des catégories de collagène ont été définies selon leur type d'assemblage. Il en existe 5 (Kühn, 1987; Ricard-Blum, 2011) :

- Les collagènes fibrillaires regroupent les types I, II, III, V, XI, XXIV et XXVII
- Les collagènes associés aux fibrilles avec triple hélices interrompues aussi appelés FACIT sont de types IX, XII, XIV, XVI, XIX, XX, XXI et XXII
- Les collagènes de type VI qui forment des filaments perlés
- Les collagènes associés à la membrane basale qui sont de types IV, VII, XV et XVIII
- Et les collagènes à réseau hexagonal de type VIII et X

En ingénierie tissulaire, le collagène est souvent utilisé pour des applications liées à l'os, aux vaisseaux sanguins, à la peau, aux tendons ou encore aux organes fibreux ; c'est-à-dire les tissus natifs pour lesquels il est le plus abondant (Kadler et al., 2007). De plus, son aptitude à former des réseaux fibrillaires est très appréciée pour reproduire les tissus natifs (Sato et al., 2016). Les biomatériaux à base de collagène peuvent être utilisés sous différentes formes (Xu et al., 2021). Les éponges de collagène sont généralement utilisées pour traiter les brûlures et les plaies chroniques en retenant l'eau et en stimulant la prolifération cellulaire. D'autres applications sont visées comme le traitement des défauts osseux de taille critique par implantation d'une matrice de collagène combiné avec des facteurs de croissance. Ce type de biomatériau est produit en 4 étapes débutant par la préparation d'une solution de collagène obtenue par dissolution d'une poudre de collagène. Celui-ci est par la suite congelé à -80°C puis lyophilisé afin de générer une macroporosité des éponges. Celle-ci est souvent de l'ordre de 150 à 200 µm. Enfin les éponges sont renforcées grâce à une dernière étape de réticulation chimique (glutaraldéhyde, 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide (EDC)/N-hydroxysuccinimide (NHS)). Ces matériaux ne

présentent pas de formes fibrillaires et seraient dénaturés à 37°C si le pontage chimique n'était pas effectué.

Des fils de suture de collagène peuvent également être générés. Leur principal avantage est qu'ils sont résorbables et permettent ainsi de refermer des plaies sans avoir à les retirer. Cette résorption est possible de par la présence d'enzymes dans le corps du patient capables de cliver les fils de collagène (Plasmine, Métalloprotéases).

Enfin, les hydrogels de collagène sont la forme la plus utilisée puisqu'ils permettent de mimer les tissus et notamment leur hydratation. Les hydrogels peuvent contenir jusqu'à 90 % de leur poids en eau grâce à leur réseau. Il s'agit souvent d'un réseau fibrillaire d'un gel physique qui peut être renforcé à façon par des voies de réticulation chimiques. Il existe également des stratégies qui pontent le collagène avant que le réseau fibrillaire soit formé. Ainsi, leur avantage est de pouvoir moduler différents types d'hydratation, de propriétés mécaniques ou encore de porosité ouvrant la voie à d'énormes possibilités.

2. Composition et structure

Le collagène fibrillaire se caractérise notamment par une architecture complexe à plusieurs échelles. L'assemblage des chaînes polypeptidiques synthétisées par les cellules forment des triples hélices de collagène (Figure 31) (Albaugh et al., 2017; Brodsky and Persikov, 2005; Chung et al., 1974; Kadler et al., 2007).

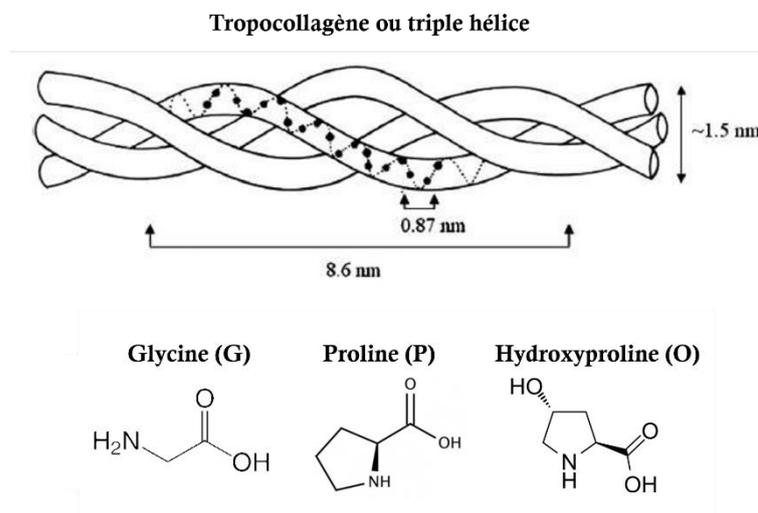


Figure 31 : Assemblage en triple hélice du collagène et les trois acides aminés majoritaires le composant (Meyers et al., 2008).

Les chaînes polypeptidiques, aussi appelée chaînes α , sont composées d'un tripeptide qui se répète selon une séquence GXY où G est la Glycine et X et Y peut différer d'une chaîne à une autre. X est souvent la proline (P) et Y représente souvent une hydroxyproline (O) ou une

hydroxylysine. Le triplet le plus répandu est le triplet GPO. Ces trois acides aminés sont présentés en Figure 31.

L'agencement en triple hélice des chaînes α est directement lié à l'encombrement stérique des acides aminés qui les composent. La présence de glycine, qui est l'acide aminé le plus petit qui existe, permet d'assurer le repliement en triple hélice de la structure. Cette glycine est située à l'intérieur de l'hélice. La proline apporte de la flexibilité ce qui engendre une faible énergie de compression, d'extension et de torsion moléculaire. Enfin l'hydroxyproline permet de stabiliser la triple hélice à travers la formation de liaisons hydrogènes intramoléculaires grâce à la position vers l'extérieur de sa chaîne latérale (Figure 32). La présence d'hydroxylysine permet d'atteindre des degrés de glycosylation différents d'une chaîne à une autre. En effet, en présence d'oses, les enzymes peuvent aisément créer une liaison covalente entre ces dernières et un hydroxyle de l'hydroxylysine.

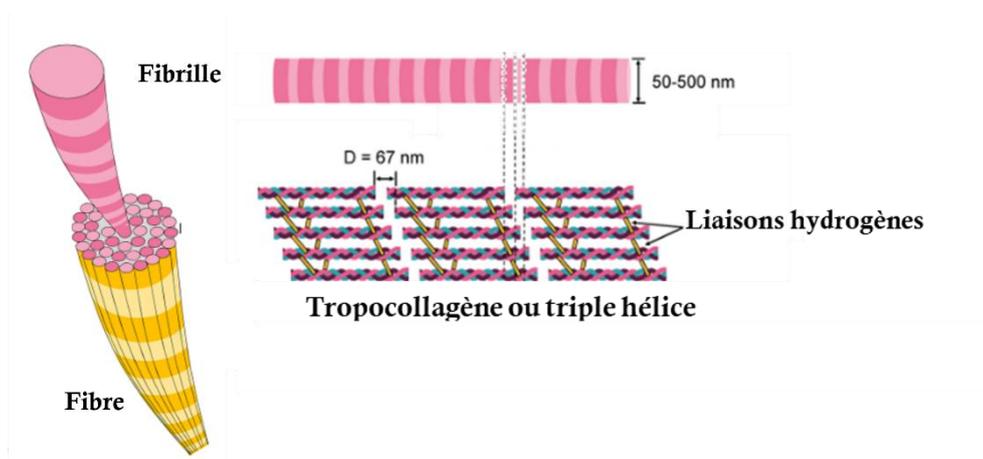


Figure 32 : Structure d'une fibrille de collagène (Xu et al., 2021).

Le collagène de type I est composé de deux chaînes α_1 identiques et d'une chaîne α_2 . On dit donc que c'est un hétérotrimère puisqu'il possède différentes chaînes α . Le collagène de type II quant à lui est un homotrimère car il dispose de trois chaînes α_1 . Leur degré de glycosylation est différent. Alors que la moitié des hydroxylysines du collagène de type II est glycosylée, seulement deux résidus par chaîne le sont pour le collagène de type I ayant un impact sur la structure secondaire de l'assemblage.

Suivant leur composition, les chaînes alpha s'auto assemblent par des liaisons hydrogènes pour former des triples hélices de collagène ou tropocollagène. Celles-ci sont caractérisées par une dénaturation thermique autour de 37°C.

Lorsque les triples hélices s'auto assemblent entre elles, cela mène à la formation de fibrilles de collagène (Figure 32). Ces fibrilles mesurent entre 50 et 500 nm de diamètre et possèdent une température de dénaturation autour de 53°C. Leur présence peut être détectée

notamment par microscopie électronique à transmission en observant des stries. Ces stries sont dues au décalage axial entre les triples hélices auto-assemblées appelé D d'une valeur périodique de 67 nm. Cette striation est observée par une alternance régulière de zones sombres et claires en Microscopie Electronique à Transmission. Ces fibrilles sont assemblées en fascicules qui forment les fibres de collagène d'un diamètre moyen entre 50 et 100 μm . L'auto-assemblage des triples hélices en fibrilles de collagène s'appelle la fibrillogénèse.

In vivo, la fibrillogénèse est initiée à partir du procollagène qui est une triple hélice de collagène avec deux propeptides collagène primitif formé dans la cellule (Gallop et al., 1972). Lorsque le procollagène est sécrété, ses extrémités propeptidiques sont clivées par des enzymes transformant le procollagène en tropocollagène ou triple hélice. En clivant les extrémités de chaînes, cela entraîne une baisse de solubilité du collagène qui s'auto-assemble pour former des fibrilles.

3. Gélification du collagène *in vitro*

La triple hélice de collagène peut également être défini d'un point de vue physico-chimique comme un polyélectrolytes amphotère de par la présence de résidus ionisables. Cela signifie que sa charge nette varie en fonction du pH pour lui permettre d'agir soit comme une base soit comme un acide selon ses conditions de solvatations (pH et force ionique). Cette propriété permet son auto-assemblage en fibrilles par un processus de fibrillogénèse *in vitro*. Frédéric Gobeaux a calculé lors de sa thèse au laboratoire la charge nette du collagène en fonction du pH. Lorsque le pH est acide, celle-ci est positive. Lorsque le point isoélectrique est atteint, le collagène possède une charge globalement nulle provoquant sa perte de solubilité. Ceci déclenche l'auto-assemblage des triples hélices de collagène en fibrilles par formation de liaisons hydrogènes inter chaînes. A pH basique, le collagène est chargé négativement et donc soluble dû aux répulsions électrostatiques (Gobeaux, n.d.).

Lors d'une étude physico-chimique, il a montré que la fibrillogénèse et la gélification du collagène étaient conditionnées par plusieurs facteurs dont la température, la force ionique, le pH et la concentration en collagène (Gobeaux et al., 2008). Ces facteurs peuvent influencer la taille et l'orientation des fibrilles, les propriétés thermiques et mécaniques des matériaux obtenus.

Le pH impacte directement la solubilité du collagène. En effet, le collagène précipite à partir d'un pH 4,5 qui est proche de son point isoélectrique (pH6) par perte de solubilisation. Lorsque le pH est plus élevé, les hydrogels formés ont une rigidité supérieure. Cela s'explique par la présence d'avantages d'interactions attractives comme les liaisons hydrogènes à partir d'un pH 7,5 ce qui améliore la gélification. Celles-ci favorisent les interactions entre triple hélices et par

conséquent la formation des fibrilles. De plus ceci améliore les interactions entre fibrilles à l'origine de la formation de l'hydrogel. En Figure 33(A), la striation des fibrilles formées à partir d'un pH 6,2 est observée rendant compte de la présence de fibrilles stables. Cependant, lorsque le pH est trop élevé, comme pour le pH 13 observé en Figure 33(A), la striation des fibrilles n'est plus observée car des faisceaux de nanofibrilles sont formés. Ceci s'explique par des répulsions électrostatiques.

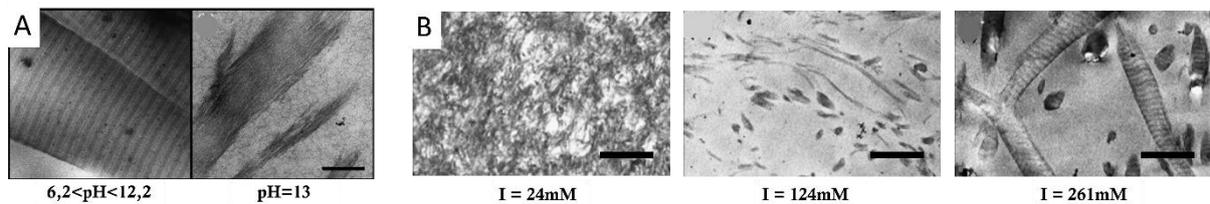


Figure 33 : Observation au MET de (A) l'effet du pH sur la striation des fibrilles pour une concentration en collagène de 100 mg.mL^{-1} ; barre d'échelle : 200 nm (B) l'effet de la force ionique sur la taille des fibrilles pour une concentration de 100 mg.mL^{-1} ; barre d'échelle : 500 nm (Gobeaux et al., 2008).

La fibrillogénèse et la gélification peuvent être modulées par l'augmentation de la force ionique. Lorsqu'elle est faible ($<100\text{mM}$), les hydrogels sont mous et translucides. Les fibrilles composant ces hydrogels sont petites avec une largeur comprise entre 15 et 20 nm et une longueur de 200 à 250 nm comme observé Figure 33(B). Les fibrilles sont dites immatures. Ceci impacte également les interactions entre fibrilles ce qui aboutit à un hydrogel avec de faibles propriétés mécaniques. A plus haute force ionique ($>100\text{mM}$), des gels opaques et rigides sont obtenus avec des fibrilles plus larges et longues observées (Figure 33(B)). Celles-ci font entre 60 et 180 nm de largeur pour 1 à 2 μm de longueur pour une force ionique de 124mM. Ici, les interactions hydrophobes et non-ioniques sont déterminantes. L'obtention de fibrilles plus grosses et plus grandes est liée à l'augmentation de la force ionique. En augmentant celle-ci, la contrainte physique engendrée favorise les interactions entre petites fibrilles préalablement formées. Cela conduit à la fusion des fibrilles les plus petites entre elles pour former de plus grands auto-assemblages.

La concentration a également son rôle à jouer sur la fibrillogénèse et la gélification. Deux facteurs lui sont directement liés : la viscosité et l'encombrement stérique. Ces deux facteurs en lien avec la concentration nous permettent d'observer quatre domaines non monotones pour lesquels l'épaisseur des fibrilles varie. En dessous de 5 mg.mL^{-1} , le régime I est prédominant avec des épaisseurs de l'ordre du μm . Entre 10 et 80 mg.mL^{-1} , le régime II est caractérisé par des fibrilles plus petites et fines avec une épaisseur de l'ordre de 20 à 80 nm. Elles n'ont pas d'orientation et leur polydispersité est faible. Le régime III est défini entre 90 et 150 mg.mL^{-1} . Les fibrilles formées sont plus grandes et épaisses puisqu'à 100 mg.mL^{-1} elles forment $1,2 \mu\text{m}$ de largeur pour $6 \mu\text{m}$ de longueur. Enfin le dernier régime se fait entre 200 et 300 mg.mL^{-1} et

présente des fibrilles plus fines et d'une épaisseur moyenne de 100 nm et d'une longueur de 1 μm . Ces tendances s'expliquent par le fait qu'en augmentant la concentration, les forces attractives sont plus importantes liées à l'encombrement. Celles-ci compensent alors les forces électrostatiques et provoquent l'auto-assemblage en fibrilles plus stables.

Le dernier facteur favorisant la fibrillogénèse est la température. En effet, l'augmentation de la température accélère la formation de fibrilles puisque l'agitation thermique est plus importante. Les interactions sont alors favorisées permettant la formation de fibrilles.

Expérimentalement, les hydrogels de collagène sont formés par remontée de pH d'une solution acide de triple hélice de collagène. Cette remontée de pH est déclenchée par un ajout de base. Généralement, on distingue deux méthodes (Figure 34).

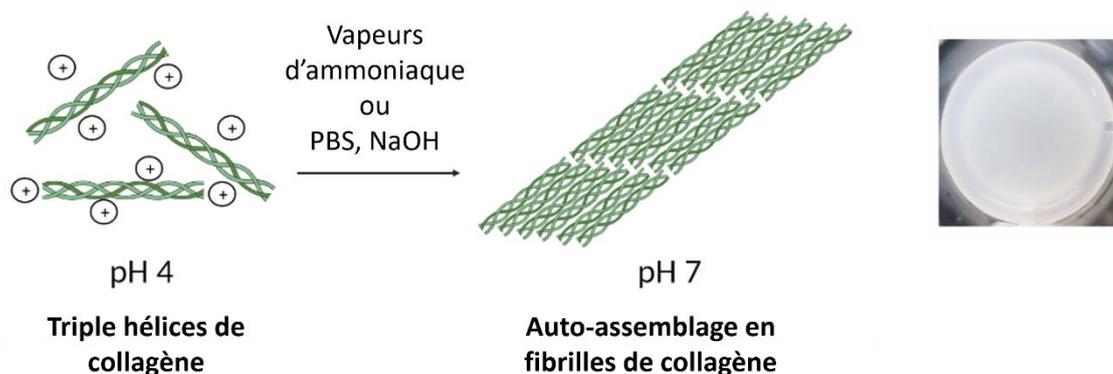


Figure 34 : Stratégie expérimentale d'élaboration d'hydrogels de collagène dessiné sur BioRender.

La première repose sur l'utilisation de vapeurs d'ammoniaque. Pour cela une solution acide de triples hélices de collagène est mise en contact de vapeurs d'ammoniaque pendant un temps déterminé dans un dessiccateur. A mesure que l'échantillon blanchit, la fibrillogénèse est amorcée et un gel physique se forme par interaction entre les fibrilles.

La seconde méthode repose sur l'utilisation de PBS et de soude. La force ionique est modulée par la concentration de PBS et le pH par la quantité de soude ajoutée. Lorsque la gélification est faite en présence de cellules, la seconde méthode est la plus adaptée à condition de ne pas utiliser une force ionique trop importante afin de ne pas lyser les cellules. Les vapeurs d'ammoniaque ne sont pas adaptées en raison de leur pH beaucoup trop basique (pH 11).

4. Cellularisation d'hydrogels de collagène

La plupart des biopolymères sont cytotocompatibles c'est-à-dire que les cellules parviennent à y adhérer et la viabilité cellulaire est bonne. L'une des raisons pour lesquelles le collagène est

fortement apprécié en ingénierie tissulaire est sa bioactivité notamment avec des cellules conjonctives puisqu'il est leur support naturel. En effet, le collagène interagit avec les cellules via des récepteurs à leur surface appelés intégrines (Barczyk et al., 2010; Heino, 2007; Humphries et al., 2006). Ces interactions sont encore plus favorisées avec les collagènes fibrillaires comme le collagène de type I par exemple (Heino et al., 2009; Ortega and Werb, 2002).

II. L'acide hyaluronique

1. Intérêt de l'acide hyaluronique en ingénierie tissulaire

Tout comme le collagène, l'acide hyaluronique est apprécié en ingénierie tissulaire car il est lui aussi naturellement présent dans la MEC. En plus d'être un composant des tissus natifs, il a un fort pouvoir d'hydratation. Il fait partie de la famille des glycosaminoglycanes (GAGs) et il est le seul GAG anionique linéaire non sulfaté (Fraser et al., 1997).

Dans le corps humain, il s'agit du plus grand GAG puisque sa masse molaire est comprise entre 10 et 800 kDa (les autres étant entre 15 et 20 kDa) (Cowman et al., 2015; Vasvani et al., 2020). La masse molaire a un impact sur les propriétés biologiques et biomécaniques du tissu. De plus, en condition physiologique il est présent sous forme de sels c'est-à-dire sous sa forme chargée stabilisée par un contre-ion de sodium (Kuo and Prestwich, 2011; Necas et al., 2008).

En ingénierie tissulaire, sa grande longueur de chaîne lui permet de stimuler la réponse anti-inflammatoire et la prolifération cellulaire (Tavianatou et al., 2019). Les acides hyaluroniques de haute masse molaire ont également démontré un fort pouvoir cicatrisant. Ils peuvent également être de masse molaire moyenne c'est-à-dire entre 250 et 500 kDa. Enfin les acides hyaluroniques de faible masse molaire, entre 10 et 250 kDa, permettent d'activer la réponse pro-inflammatoire et les macrophages. Ainsi, la lymphangiogenèse et l'angiogenèse peuvent être induites. La réponse immunitaire induite par l'HA est permise via sa dégradation. Elle est primordiale puisqu'elle permet d'informer l'organisme d'un dérèglement qui est souvent lié à l'homéostasie. Celui-ci est dégradé par des enzymes qui diffèrent selon le tissu considéré et qui peuvent être la hyaluronidase, la chondroïtinase, l'hexosaminidase et les espèces réactives oxydantes (ROS). A titre d'exemple, les hyaluronidases clivent l'acide hyaluronique dans les tissus somatiques. Pour cela, l'HA est clivé en monosaccharides par ces dernières. Une fois clivés, ces fragments de HA sont évacués par les récepteurs HARE du foie ou des ganglions lymphatiques *via* un procédé d'endocytose (Bastow et al., 2008; Noble, 2002; Stern et al., 2007).

En ingénierie tissulaire, la forme de l'acide hyaluronique permet de cibler différentes applications (Xu et al., 2021). Ainsi on distingue les solutions des hydrogels. Les solutions d'acide hyaluronique sont utilisées dans le cadre de la reconstruction de tissus mous ou de la chirurgie plastique. Par exemple, elles peuvent être injectées pour compléter le liquide synovial dans le cadre de la lutte contre l'ostéoarthrite, l'arthrose ou encore pour des applications ophtalmologiques. Lorsque l'acide hyaluronique est sous forme d'hydrogel, il est surtout utilisé pour des applications de cicatrisation de plaies ou encore pour une implantation dans les tissus. Cette forme nous intéresse particulièrement car dans cette configuration, les interactions entre les cellules et l'hydrogels sont favorisées par la présence de récepteurs membranaires CD44 (Knudson, 2003).

2. Structure de l'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique est un glycosaminoglycane (GAG) non sulfaté anionique. Il est constitué d'une répétition d'unités disaccharidiques d'acide D-glucuronique et de N-acetyl-D-glucosamine comme présenté en Figure 35(A) (Lapčik et al., 1998). La stabilité de ce polymère est liée au positionnement des groupes encombrants en position équatoriale sur les cycles osidiques (Figure 35(B)) (Morris et al., 1980). En milieu physiologique, des liaisons H se forment entre molécules d'acide hyaluronique ce qui lui confère une conformation en bobine aléatoire. Ces bobines peuvent aisément s'enchevêtrer à partir d'une concentration critique d'enchevêtrement de 1 mg.mL^{-1} ce qui augmente significativement sa viscosité. Sa grande viscosité permet de restreindre la diffusion d'autres substances à travers la MEC. En ingénierie tissulaire, il s'agit d'un avantage en termes de propriétés mécaniques et de stabilité des matériaux en résultant cependant cela rend sa mise en forme plus difficile.

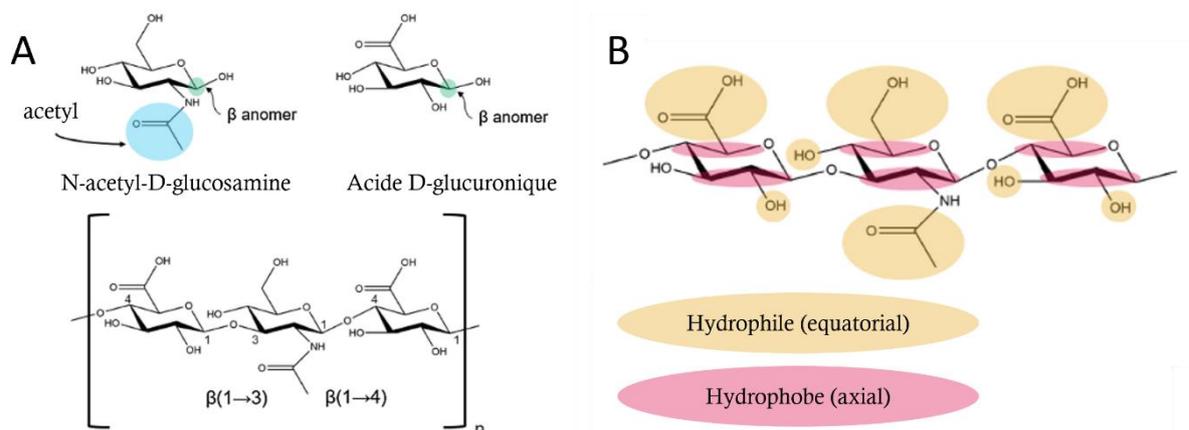


Figure 35 : (A) Unités saccharidiques composant l'acide hyaluronique (B) Disposition des groupements latéraux en conformation bateau (Xu et al., 2021).

Cette capacité à former des liaisons H nombreuses sous forme de bobine aléatoire lui permettent d'avoir une capacité de rétention d'eau très forte. Il peut retenir 1000 fois son poids dans l'eau (Essendoubi et al., 2016). Son comportement est dit viscoélastique et dépend du pH. En effet, les forces électrostatiques étant modifiées en modulant son pH, les liaisons H, les enchevêtrements et donc la conformation sont également modifiés. Ceci résulte en la modification de la viscosité de la solution.

3. La fonctionnalisation nécessaire à la gélification de l'acide hyaluronique

Nativement, l'acide hyaluronique ne forme pas d'hydrogel car il ne peut pas être réticuler. Afin de former un réseau polymérique, il faut fonctionnaliser les chaînes polysaccharidiques de l'HA. Selon le type de fonctionnalisation une modification de la structure primaire de l'acide hyaluronique va être effectuée. En modifiant sa structure, il existe un risque d'engendrer des changements dans son activité biologique c'est-à-dire la capacité des enzymes à le dégrader ou encore les interactions avec les cellules. Une fois fonctionnalisé, la formation d'un réseau peut être induite soit par réticulation chimique soit par réticulation physique (Xu et al., 2021).

3.1. La réticulation physique

La réticulation physique est plutôt utilisée pour la libération contrôlée de médicaments car elle est facilement réversible. Ainsi, selon les conditions environnementales (pH, température, force ionique), le réseau peut s'auto-désassembler pour libérer le médicament. Pour cela, le système repose sur des forces intermoléculaires entre deux chaînes d'acide hyaluronique fonctionnalisées. Il peut s'agir de liaisons hydrogènes, d'interactions hydrophobes ou hydrophiles selon la nature du groupement greffé ou d'interactions ioniques ou électrostatiques (Hu et al., 2019; Voorhaar and Hoogenboom, 2016).

Un exemple de réticulation physique sont les nanohydrogels développés par Montanari et al (Montanari et al., 2014). Ils ont développé un système de délivrance d'antibiotique pour lutter contre les infections bactériennes intracellulaires. Pour cela, les auteurs ont généré des nanohydrogels constitués d'acide hyaluronique et de cholestérol dans lesquels ils ont encapsulé de la levofloxacin qui est un antibiotique hydrophobe. Ici, l'acide hyaluronique qui est hydrophile a été fonctionnalisé avec du cholestérol qui est hydrophobe. Le greffage du cholestérol se fait sur les acides carboxyliques de l'acide hyaluronique. Par interactions hydrophobes, le nanohydrogel peut alors s'auto-assembler en encapsulant la levofloxacin comme illustré schématiquement en Figure 36. Au contact des cellules, le nanohydrogel se désassemble en

interagissant avec des récepteurs membranaires ce qui libère l'antibiotique dans la cellule pour lutter en interne contre les bactéries.

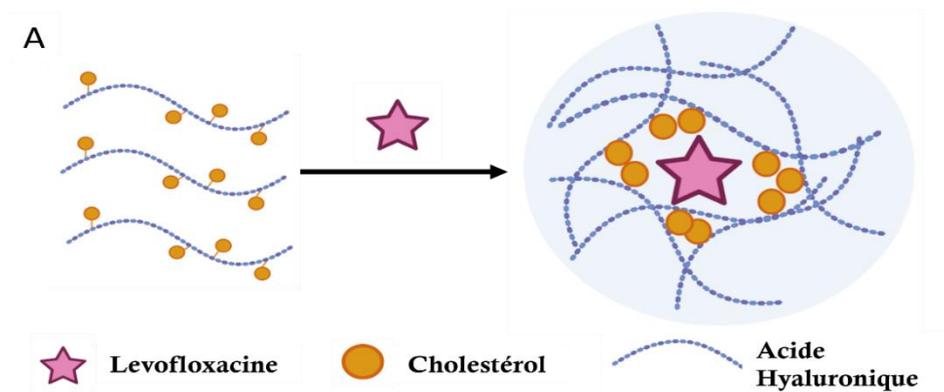


Figure 36 : (A) Schéma de l'auto-assemblage des nanohydrogels d'acide hyaluronique fonctionnalisé avec du cholestérol (Montanari et al., 2014).

Le système a été testé sur deux souches de bactéries, les *Staphylococcus aureus* et *Pseudomonas aeruginosa*. L'activité antibactérienne a été augmentée par ce système, ce qui a permis de valider les nanohydrogels de cholestérol et d'acide hyaluronique en tant que système de délivrance contrôlée de médicaments.

Les avantages de la réticulation physique sont doubles. Premièrement, le système peut répondre à des stimuli comme par exemple la lumière, le pH, la présence d'enzymes spécifiques ou d'un changement de température (Purcell et al., 2014; Zabow et al., 2015; Zheng et al., 2017). De plus, puisque la réticulation repose sur des interactions intermoléculaires, l'usage d'agent réticulant n'est pas requis ce qui diminue la cytotoxicité des matériaux résultants. Les inconvénients majeurs sont liés à la stabilité de ces systèmes. En effet, cette même réversibilité du réseau engendre une stabilité mécanique et chimique faible.

3.2. La réticulation chimique

La réticulation chimique permet de former un réseau polymérique avec des ponts covalents. Des fonctions réactives sont greffées sur l'acide hyaluronique dans un premier temps. Puis, celles-ci peuvent être activées afin de déclencher la réticulation en formant des ponts entre deux fonctions réactives.

Les avantages de ces systèmes sont leur stabilité thermique et mécanique très élevées. Ceci est directement dû à la force des liaisons covalentes qui est plus élevée que n'importe quelles autres interactions.

Le seul inconvénient est lié à l'utilisation d'agents réticulant extérieurs pour assurer la réticulation chimique. Ceux-ci peuvent augmenter la cytotoxicité des hydrogels résultants selon

leur nature. Il peut s'agir d'enzymes, d'irradiations, de composés générateurs de radicaux libres ou d'agents chimiques.

L'acide hyaluronique possède trois types de fonctions chimiques réactives pouvant être fonctionnalisées : les hydroxyles, les acides carboxyliques et les $-NHCOCH_3$ (Figure 37) (Khunmanee et al., 2017). L'acide carboxylique est la fonction la plus utilisée pour la fonctionnalisation. Celle-ci est faite à l'aide de réactifs spécifiques comme les carbodiimides ou les carbonyldiimidazoles. Le mécanisme se fait en deux étapes. D'abord l'acide carboxylique est activé en réagissant avec le réactif de couplage puis le groupement à greffer subit une attaque nucléophile de la part de la molécule qui va le fonctionnaliser. Ceci mène à la formation de fonctions amide ou ester entre l'acide hyaluronique et le groupement fonctionnel (Figure 37(a)). Le groupe hydroxyle est fonctionnalisé via l'utilisation d'une multitude de réactifs. Cela donne généralement lieu à la formation d'éther ou d'ester entre l'acide carboxylique et le groupement fonctionnel (Figure 37(b)).

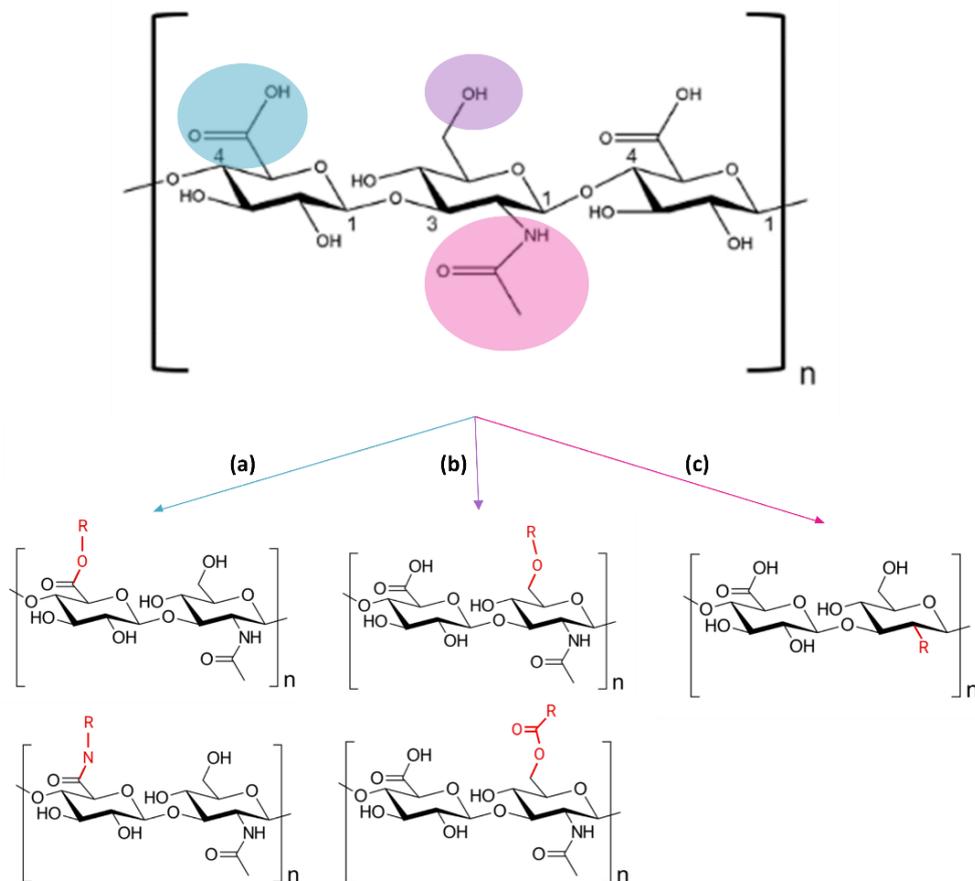


Figure 37 : Groupements d'intérêt pour la fonctionnalisation de l'acide hyaluronique et fonctions types observées après fonctionnalisation de (a) l'acide carboxylique, (b) l'hydroxy et (c) le groupement $-NHCOCH_3$ dessiné à l'aide de BioRender.

La modification du groupement $-NHCOCH_3$ se fait par désacétylation, amidation ou encore hémiacétylation. La réaction consiste en une désacétylation de l'acide hyaluronique qui réagit par la suite avec un acide pour greffage du groupement fonctionnel (Figure 37(c)).

Peu importe la fonction modifiée, les groupements fonctionnels greffés peuvent être de différentes sortes. Ici, nous recenserons les quatre types de groupements fonctionnels les plus utilisés pour former des hydrogels chimiques d'acide hyaluronique.

La thiolation est la réaction la plus commune car elle permet d'augmenter la biocompatibilité et les propriétés de perméation des hydrogels résultants (Laffleur et al., 2017, 2014; Tian et al., 2018). Pour cela, une réaction d'amidation des acides carboxyliques de l'HA est effectuée en présence d'un dérivé thiolé et d'un activateur. La cystéine est fréquemment utilisée comme dérivé thiolé puisqu'il s'agit d'un acide aminé présent dans l'organisme et biocompatible. Pour fonctionnaliser les acides carboxyliques avec les dérivés de cystéine, l'EDAC/NHS peut être utilisé comme présenté en Figure 38. L'EDAC/NHS permet d'activer l'acide carboxylique de l'acide hyaluronique qui va réagir sur l'amine de la cystéine. Ce type de réaction est surtout utilisé pour la libération contrôlée de médicaments car il s'agit de systèmes déclenchables *in situ* sur commande rendant la libération de produits facile, réversible et non toxique. Le seul inconvénient de l'utilisation de thiols est la cinétique de gélification de ces systèmes. En effet, elle est lente c'est pourquoi les recherches sont actuellement axées sur l'accélération de celle-ci.

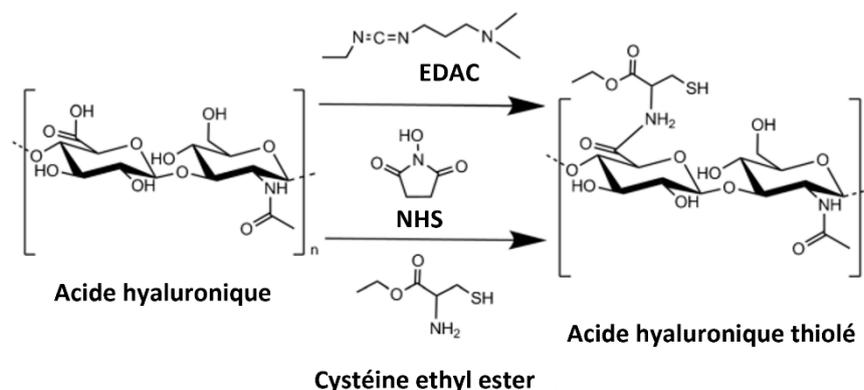


Figure 38 : Réaction de thiolation de l'acide hyaluronique avec un dérivé de cystéine en présence d'EDAC/NHS (Laffleur et al., 2017).

De manière similaire, l'acide hyaluronique peut être modifié faisant intervenir la formation d'une base de Schiff (Hassib et al., 2012; Khunmanee et al., 2017). Une cétone et une amine (sur l'acide hyaluronique désacétylé) sont condensées pour former une imine. La

formation de l'imine permet de réticuler le réseau et de former un hydrogel. Ces systèmes sont appréciés pour leurs conditions de réactions douces ainsi que leur réactivité. Il s'agit de systèmes où les imines peuvent réagir de manière réversible tout comme les thiols. Ces hydrogels se forment rapidement et sans usage d'agents de réticulation toxiques ce qui en fait de bons hydrogels injectables que l'on peut déclencher *in situ*. Ici la cinétique de gélification n'est plus un problème mais il reste néanmoins un inconvénient : la stabilité des imines. Les imines s'hydrolysent en conditions acides ce qui est problématique pour la libération de contrôlée de médicaments puisque la plupart des maladies se caractérisent par un pH acide.

Une autre manière de réticuler l'acide hyaluronique serait de lui greffer des fonctions pouvant conduire à des réactions de polymérisation radicalaire. La polymérisation est activée par des sources extérieures telles que la température, la lumière ou encore les réactions redox (Hong et al., 2019; Petta et al., 2018; Poldervaart et al., 2017). Le principe est d'utiliser des groupes fonctionnels qui pourront devenir radicalaires afin de créer un pontage entre deux groupes fonctionnels radicaux du HA modifié. La photopolymérisation ou photoréticulation est la technique la plus prisée dans la recherche aujourd'hui car elle offre beaucoup de possibilités et est très efficace avec un bon contrôle des hydrogels générés. Ces derniers disposent de propriétés modulables selon le degré de modification de l'acide hyaluronique, les concentrations en monomères fonctionnels et en photoinitiateur utilisées, la source lumineuse utilisée, son temps d'exposition ainsi que son intensité. Sa limitation majeure est due à l'usage d'une source lumineuse qui peut induire de la cytotoxicité si la photoréticulation est conduite en présence de cellules (présence de radicaux). Pour ce genre de procédé, deux types de groupements sont majoritairement utilisés pour la fonctionnalisation : les méthacrylates et les tyramines.

Le greffage chimique des méthacrylates est beaucoup utilisé dans la littérature (Seidlits et al., 2010; Tsanaktsidou et al., 2019). Cette réaction se fait sur les groupements hydroxyles de l'acide hyaluronique en présence d'anhydride méthacrylique en milieu basique (Figure 39(A)). Une fois fonctionnalisé, l'acide hyaluronique méthacrylate est réticulé sous UV. Pour cela, un activateur comme l'Irgacure ou la riboflavine est requis. Celui-ci va générer un radical sur une double liaison d'un premier acrylate. Une fois le radical formé, l'acrylate attaque la double liaison d'un deuxième acrylate, ce qui forme des ponts C-C entre deux acides hyaluroniques. Les limitations majeures de cette photoréticulation est l'utilisation d'UV. En effet, les UV constituent des conditions cytotoxiques pour les cellules. De par sa forte intensité, cette source lumineuse libère une grande quantité de chaleur et est mutagène pour les cellules.

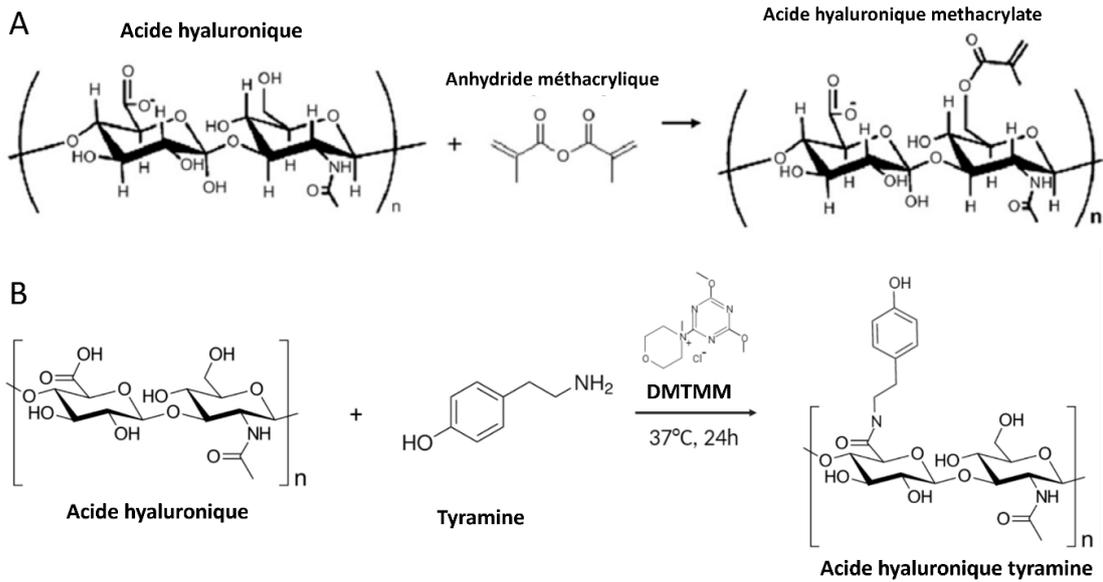
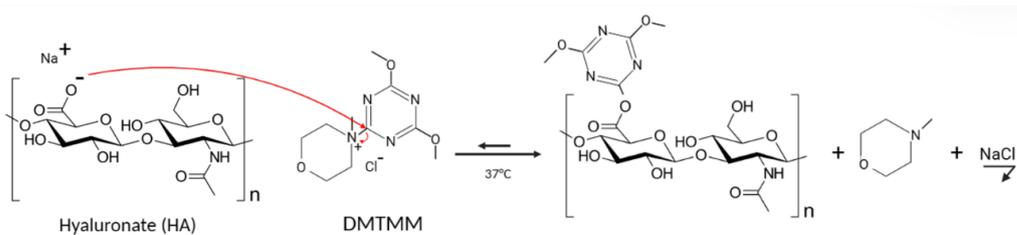


Figure 39 : Equations de réaction de fonctionnalisation de l'acide hyaluronique avec (A) des méthacrylates (Seidlits et al., 2010) ou (B) avec de la Tyramine dessiné à partir de BioRender.

La fonctionnalisation par les tyramines permet d'atteindre des systèmes similaires aux méthacrylates en utilisant des conditions plus douces et moins cytotoxiques. Le greffage se fait sur l'acide carboxylique de l'acide hyaluronique et résulte en la formation d'une liaison amide. Cette réaction fait intervenir trois réactifs : l'acide hyaluronique, la tyramine qui est le groupement fonctionnel et le DMTMM, un activateur d'acides carboxyliques (Figure 39(B)).

(1) Activation du hyaluronate de sodium



(2) Attaque nucléophile par la Tyramine

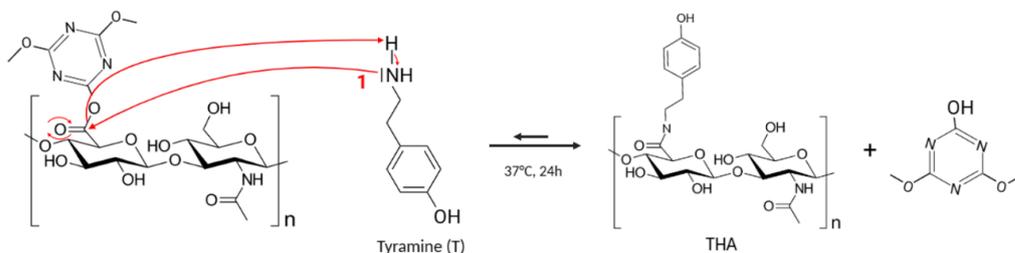


Figure 40 : Mécanisme de fonctionnalisation de l'HA avec la tyramine avec (A) une première étape d'activation du HA et (B) l'attaque nucléophile par la tyramine ; dessiné sur BioRender.

La réaction est conduite en deux temps. Lors d'une première étape, l'acide carboxylique de l'HA est activé par le DMTMM qui rend sa cétone électrophile (Figure 40(A)). Dans un second temps, la cétone de l'acide carboxylique activé subit une attaque nucléophile par l'amine de la Tyramine (Figure 40(B)). L'acide hyaluronique fonctionnalisé avec de la tyramine (THA) est alors obtenu.

La réticulation du THA peut ensuite avoir lieu soit en utilisant des photoinitiateurs activés par UV comme la riboflavine, soit en utilisant des photoinitiateurs déclenchable sous lumière visible comme l'éosine (Figure 41). Cette dernière possibilité est moins toxique pour les cellules ce qui donne un avantage considérable aux tyramines par rapport aux méthacrylates. Qu'il s'agisse des UV ou de la lumière visible, le pont covalent formé se fait toujours entre deux extrémités phénol des tyramines soit via des ponts C-C entre cycles aromatiques soit via une liaison éther entre deux cycles aromatiques.

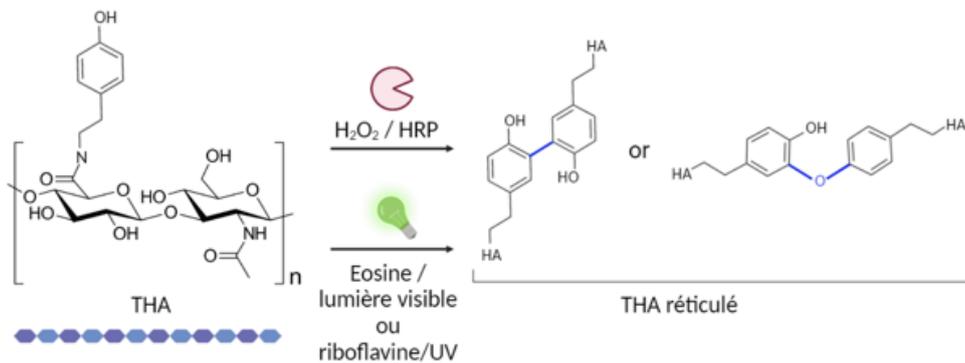


Figure 41 : Equation de réaction de gélification par réticulation chimique du THA dessiné à l'aide de BioRender.

Enfin, l'acide hyaluronique peut aussi être fonctionnalisé avec des fonctions compatibles avec la réticulation enzymatique (Roberts et al., 2016; Sakai et al., 2010). Ce dernier procédé de réticulation suscite beaucoup d'intérêt car la gélification induite est rapide et contrôlée. Les propriétés finales des hydrogels peuvent être modulées à travers des conditions de réactions douces et physiologiques d'où son utilisation pour des applications biomédicales. Selon l'enzyme, différents sites d'intérêt spécifiques sont ciblés et donc différentes fonctionnalisations peuvent être effectuées. Le système Peroxydase de Raifort (HRP) couplée au peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) est le plus utilisé. Ce système agit sur les groupements phénoliques pour créer des liens entre phénol et cycles aromatiques. C'est pourquoi la fonctionnalisation la plus développée pour ce système est celle de la tyramine précédemment introduite et dont le mécanisme en deux étapes a été explicité en Figure 40.

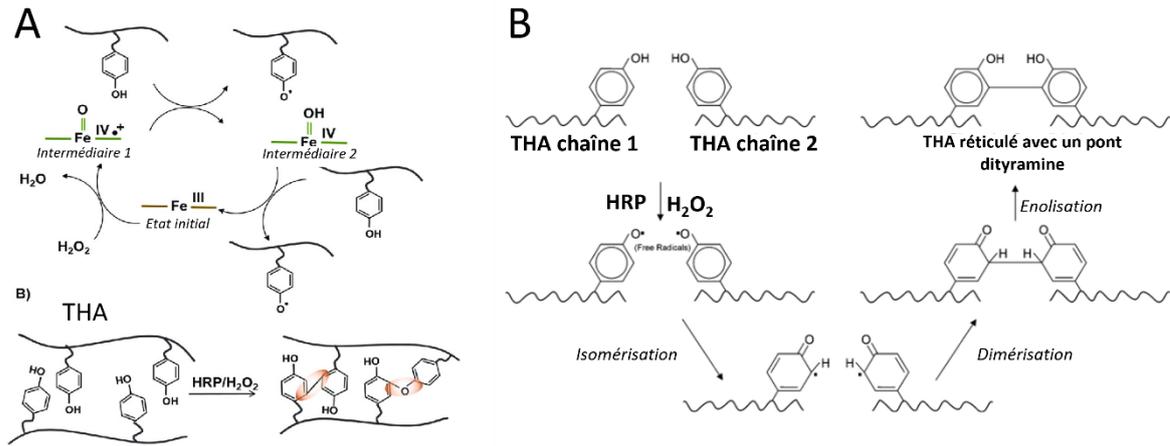


Figure 42 : Mécanismes (A) du cycle catalytique du système HRP/H₂O₂ (Khanmohammadi et al., 2018) et (B) de la réticulation entre deux THA en présence de HRP/H₂O₂ (Darr and Calabro, 2009).

La HRP est une enzyme ferrique dont le degré d'oxydation initial est de +III. Lors de la réaction de réticulation du THA, elle subit un cycle catalytique initié par le peroxyde d'hydrogène qui l'oxyde en Fe IV⁺ (Figure 42(A)). Le radical généré sur le complexe de fer va réagir sur l'hydroxyle de la tyramine menant à la formation d'un radical porté par l'oxygène du THA. Le FeIV⁺ obtenu à l'issue de cette réaction peut ensuite réagir avec une deuxième tyramine pour former un radical porté par l'oxygène. Ainsi, la HRP retrouve son état d'oxydation initial et peut subir un nouveau cycle catalytique. Les deux polymères de THA portant un radical chacun subissent une isomérisation qui tend à déplacer le radical pour stabiliser la structure des polymères (Figure 42(B)). Ainsi, une dimérisation entre les radicaux présents en α de la cétone conduit à la formation d'un pont covalent entre les deux carbones. Finalement, une dernière étape d'énolisation permet d'obtenir un réseau de THA réticulé stable.

Le problème de ce système est le coût de production de la HRP trop important face aux faibles rendements obtenus. C'est pourquoi d'autres enzymes comme l'hématine sont de plus en plus étudiées.

4. Cellularisation d'hydrogels d'acide hyaluronique

L'acide hyaluronique peut interagir avec les cellules par l'intermédiaire des récepteurs membranaires. Les récepteurs membranaires les plus spécifiques sont le CD44 et les récepteurs de motilité médiée d'acide hyaluronique (RHAMM) (Knudson, 2003; Nikitovic et al., 2013). Il s'agit de glycoprotéines transmembranaires présentes dans de nombreuses cellules comme les leucocytes, les fibroblastes, les cellules mésodermales ou encore les cellules cancéreuses. Par conséquent, cela motive l'utilisation d'acide hyaluronique pour de vastes applications biomédicales. L'acide hyaluronique peut avoir un effet sur de nombreux mécanismes cellulaires

tels que l'adhérence cellulaire, la signalisation cellulaire ou encore le dépôt de matrice extracellulaire. La reconnaissance de l'acide hyaluronique par les récepteurs membranaires est aussi dépendante de sa masse molaire (Noble, 2002; Turley et al., 2002). Lorsque la masse molaire est faible, cette reconnaissance déclenche la réponse inflammatoire alors que lorsqu'elle est élevée, elle est à l'origine de la stimulation des fibroblastes. De manière générale, l'adhérence cellulaire vis-à-vis de ce dernier n'est pas optimale d'où la nécessité de le combiner à d'autres polymères ayant une meilleure bioactivité.

III. Les hydrogels de collagène et d'acide hyaluronique

La combinaison de deux polymères est souvent utilisée pour accroître les propriétés du matériau visé. La présence d'acide hyaluronique dans un hydrogel de collagène permet d'augmenter ses propriétés mécaniques et son hydratation tout en augmentant sa bioactivité grâce au collagène. Cependant, afin d'atteindre ce but, il faut pouvoir appréhender leurs interactions physicochimiques afin d'obtenir des matériaux homogènes.

1. Interactions physico-chimiques

Pour mélanger deux biopolymères, il faut qu'ils soient tous les deux dans un état soluble. Le collagène précipitant à partir d'un pH 6, le mélange doit se faire en condition acide, généralement en acide acétique à pH 4-5. Dans ces conditions, le collagène est chargé positivement. De son côté, le pKa des acides carboxyliques de l'acide hyaluronique étant autour de 2,5-3, ce dernier est donc chargé négativement à pH 4-5 (Brown and Jones, 2005). Lorsqu'ils sont mis en présence l'un de l'autre, des interactions électrostatiques ont lieu. Ces interactions sont si fortes qu'elles entraînent la formation de complexes polyioniques (CPI) (Figure 43).

Ces complexes polyioniques ont été étudiés partiellement dans le cas du collagène et de l'acide hyaluronique mais très largement à l'échelle d'autres biopolymères utilisés en ingénierie tissulaire (chitosane, alginate, etc). Une fois les CPI formés, il est très difficile de les dissoudre de par leur grande stabilité. C'est pourquoi, afin d'obtenir des formulations homogènes collagène/acide hyaluronique, il est important de prévenir leur formation avant même la mise en contact des deux biopolymères. Pour cela, plusieurs paramètres peuvent être modulés tels que le ratio entre les polymères, la concentration des polymères, le pH et la force ionique (Zhang et al., 2021).

Deux équipes ont principalement étudié les CPI de collagène et d'acide hyaluronique et leur inhibition.

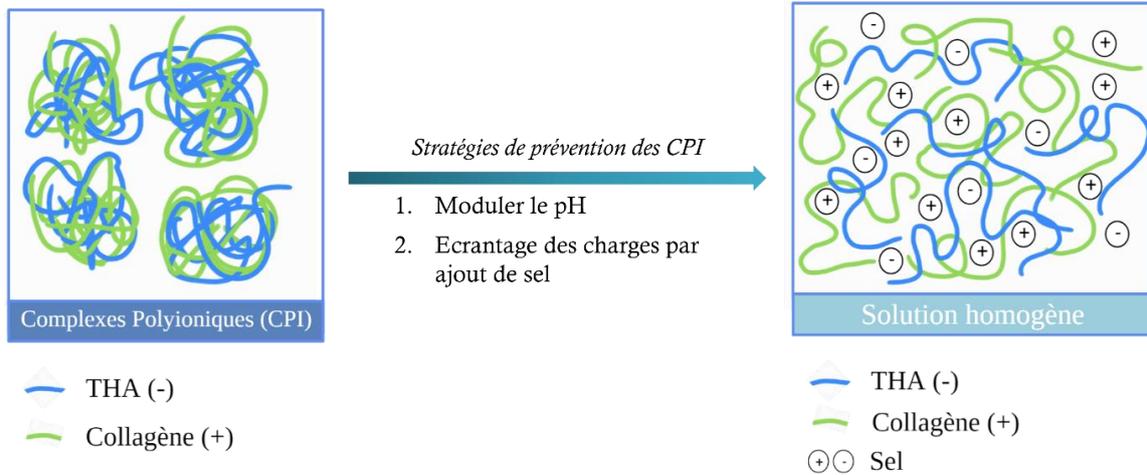


Figure 43 : Schéma de la formation des complexes polyioniques, adapté de (Chen et al., 2014).

Un des leviers pour affaiblir ces interactions est le pH. Etant donné que la formation des CPI est dû à l'état de charge des biopolymères, la modulation du pH permettrait de jouer sur celle-ci (Taguchi et al., 2002). Ainsi, Taguchi et *al.* ont démontré que les CPI pouvaient être inhibé à pH acide à ratio collagène/HA de 1 pour 1 mais également pour des ratio où le collagène est en excès. Ceci s'explique par l'utilisation d'un pH inférieur au pKa des acides carboxyliques de l'acide hyaluronique. Ceux-ci sont alors protonés et l'état de charge du biopolymère est neutre. Par conséquent l'acide hyaluronique n'interagit plus avec le collagène par des interactions électrostatiques. Dans leur étude, ils ont suivi la formation des complexes en fonction du pH par transmittance comme présenté en Figure 44.

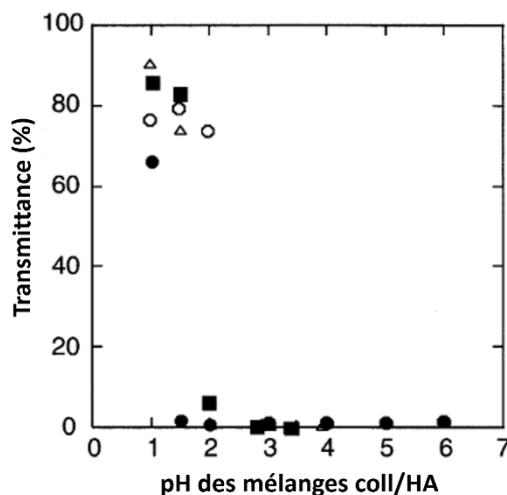


Figure 44 : Effet du pH sur la turbidité des solutions hybrides collagène/HA (Taguchi et al., 2002).

Le deuxième levier d'inhibition des CPI qui a été utilisé par ces mêmes chercheurs est la force ionique. Ils l'ont modulé entre 0,01 et 2 M en ajoutant du NaCl et ont suivi la formation de CPI par transmittance comme présenté en Figure 45(A). En dessous d'une force ionique de 0,2 M, la transmittance est minimale ce qui se traduit par un blanchiment de la solution et la présence de complexes. A 0,4 M, la concentration en sel est suffisante pour écranter les charges inhibant ainsi les CPI. Cela se traduit par une valeur maximale de la transmittance. Lorsque la force ionique utilisée était supérieure à cette valeur optimale de 0,4 M, la transmittance était à nouveau minimale car la force ionique est si importante qu'elle provoque la précipitation du collagène et donc un blanchiment de celui-ci. Pour aller plus loin, Chen et *al.* ont travaillé avec un ratio collagène/THA de 9/1 en modulant la force ionique avec des sels monovalents ou divalents entre 0 et 0,2 M (Chen et al., 2014). Que les sels soient monovalents ou divalents, les résultats étaient les mêmes à force ionique équivalente. Ils se sont aperçus par turbimétrie qu'à partir de 0,150M, les charges étaient écranées par remontée de la transmittance (Figure 45(B)) et que la viscosité des biopolymères était restaurée. On retrouve alors un comportement rhéofluidifiant de la suspension en augmentait la concentration en sel de par l'inhibition des complexes (Figure 45(C)). Lorsque la force ionique est inférieure à 0,1 M, la concentration en sel n'est pas suffisante pour écranter les charges se traduisant par plus d'interactions électrostatiques et formation de complexes comme observé en (Figure 45(D)).

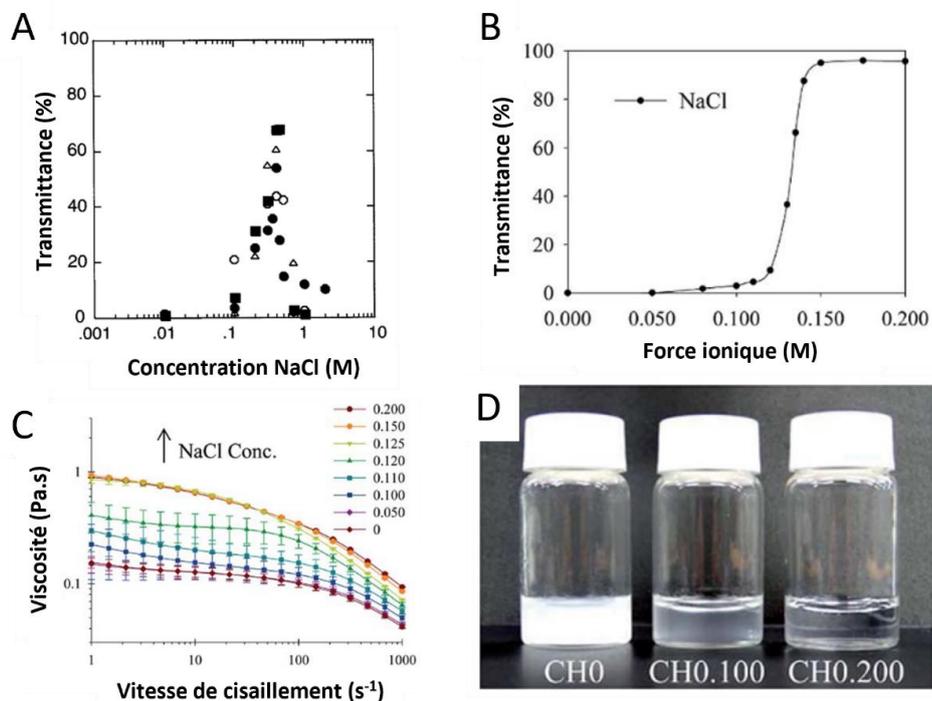


Figure 45 : (A) Impact de la force ionique sur la formation des CPI selon (Taguchi et al., 2002) ; (B) Impact de la force ionique sur la formation des CPI, (C) Mesure de la viscosité en fonction de la force ionique et (D) observation macroscopique à trois concentrations de sel différentes pour suivre la formation des CPI, d'après (Chen et al., 2014).

Il y a alors moins de polymères solubles en solution ce qui provoque une chute de la viscosité. Entre 0,125 et 0,1 M, l'écrantage est partiel et les CPI sont affaiblis. N'étant pas totalement précipité, les polymères sont partiellement en solution ce qui mène à une augmentation de la viscosité. Enfin, lorsque la force ionique est supérieure à 0,150 M, l'écrantage est complet et les CPI sont inhibés résultant à une solubilité totale des polymères. La viscosité atteint son maximum et est au plateau. Une fois ce lien entre solubilité des polymères, viscosité et force ionique établi, Chen et al ont étudié l'effet du sel sur la structure moléculaire des polymères par cartographie 2D infrarouge. Ils ont montré que la présence de complexes déforme la structure hélicoïdale du collagène. La bande d'amide I se retrouve décalée lorsqu'il n'y a pas ou peu de sel. Ce décalage est synonyme d'une structure partiellement désordonnée des triples hélices α du collagène. Quand la concentration en sel est plus élevée (à partir de 0,150 M), le signal de la triple hélice est récupéré avec des autocorrélations en élongation et en flexion N-H plus intenses que précédemment. Ceci suggère que la structure de la triple hélice est rétablie car les molécules de collagène et d'acide hyaluronique sont moins complexées.

En résumé, il est possible d'inhiber la formation des CPI de collagène et d'acide hyaluronique sous certaines conditions de pH et de force ionique qui sont dépendantes du ratio collagène/THA. Lorsque ces complexes se forment, la structure de la triple hélice α du collagène est perturbée et la viscosité est drastiquement réduite dû à la non solubilité des deux polymères. Il serait intéressant de poursuivre ces études notamment pour évaluer l'impact de la désorganisation de la triple hélice sur la capacité du collagène à former un réseau fibrillaire après gélification et plus largement à évaluer la stabilité thermique et mécanique de ces matériaux.

2. Biomatériaux collagène/acide hyaluronique

Les hydrogels de collagène et d'acide hyaluronique ont déjà en partie été évalués pour des applications en santé et en ingénierie tissulaire. Pour cela, deux caractéristiques sont importantes : leurs propriétés physicochimiques et leur biocompatibilité. Concernant la physicochimie, les propriétés essentielles de ces systèmes sont leur microstructure, leurs propriétés mécaniques et leur hydratation. Afin d'être de bons supports cellulaires, il est important que ces systèmes soient bioactifs mais également qu'ils puissent assurer le transport de molécules vers des cellules

L'intérêt de combiner ces deux biopolymères est de générer des matériaux améliorés qui disposeraient des avantages des deux biopolymères afin de satisfaire propriétés physiques et bioactivité.

L'acide hyaluronique permet d'augmenter la rétention d'eau et donc la viscoélasticité des systèmes générés (Entekhabi et al., 2021). Cette viscoélasticité a un impact direct sur la cinétique

de fibrillogénèse du collagène. Par conséquent, les fibrilles formées peuvent être impactées ainsi que les propriétés mécaniques des hydrogels de collagène. De manière générale, les propriétés mécaniques auront tendance à augmenter grâce à une flexibilité plus importante du réseau. La présence d'acide hyaluronique apporte de l'hydratation ainsi que de la flexibilité par des glissements de fibrilles de collagène dans les interstices. La résistance à la déformation est donc d'autant plus grande.

Le collagène, quant-à-lui, augmente la bioactivité du système. Il améliore la prolifération cellulaire, l'adhésion cellulaire et l'étalement des cellules étant donné qu'il contient beaucoup de domaines qui se lient spécifiquement aux intégrines (récepteurs transmembranaires cellulaires).

Aujourd'hui, les hydrogels composites de collagène et d'acide hyaluronique se classent selon trois types de réseaux (Xu et al., 2021).

2.1. Réseaux semi-interpénétrés où seul le collagène est gélifié

Les réseaux semi-interpénétrés où le collagène est gélifié représentent la première forme. Sous cette forme, l'acide hyaluronique peut être ajouté avant ou après gélification du collagène.

Dans le cas où il serait ajouté avant, cela signifie qu'il est ensuite retenu dans le réseau fibrillaire au cours de la fibrillogénèse (Xin et al., 2004). Dans cette première étude, de l'acide hyaluronique en poudre à une concentration finale de 10 mg.mL^{-1} est incorporé dans une solution de collagène à $2,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. La fibrillogénèse est directement induite en présence de PBS et de NaOH à 0,1 M. La gélification du collagène est conduite pendant 1h à 37°C permettant ainsi d'interpénétrer les macromolécules d'HA dans le réseau fibrillaire. Aucun CPI ne semble formé lors du mélangeage, ce qui est peut-être lié à l'incorporation du HA sous forme de poudre et du déclenchement simultanée de la fibrillogénèse du collagène. En effet, afin d'interagir, les deux polymères doivent être en solution. Or, ici, la solubilisation du HA est retardée par rapport à la formation du réseau de collagène. A ce moment-là, selon la masse molaire de l'HA utilisée, les propriétés mécaniques des hydrogels générés seront impactées. Des masses molaires faibles de l'ordre de 155 kDa augmentent le module élastique des hydrogels car l'acide hyaluronique est imprégné de manière à former un revêtement sur les fibres de collagène. Ceci est dû à la grande mobilité des chaînes qui provoque moins d'interactions intermoléculaires entre des chaînes d'acide hyaluronique. Par conséquent, l'acide hyaluronique a interagit directement avec le collagène fibrillé une fois solubilisé. L'ultrastructure du réseau a notamment été étudiée à travers des observations en MEB et en MET. Sur l'image au MEB, le réseau fibrillaire de collagène est

présent à l'image d'une toile mais il semble recouvert d'un film (Figure 46(A)). Afin d'y voir plus clair, des observations de fibrilles de collagène ont été faites au MET (Figure 46(B)).

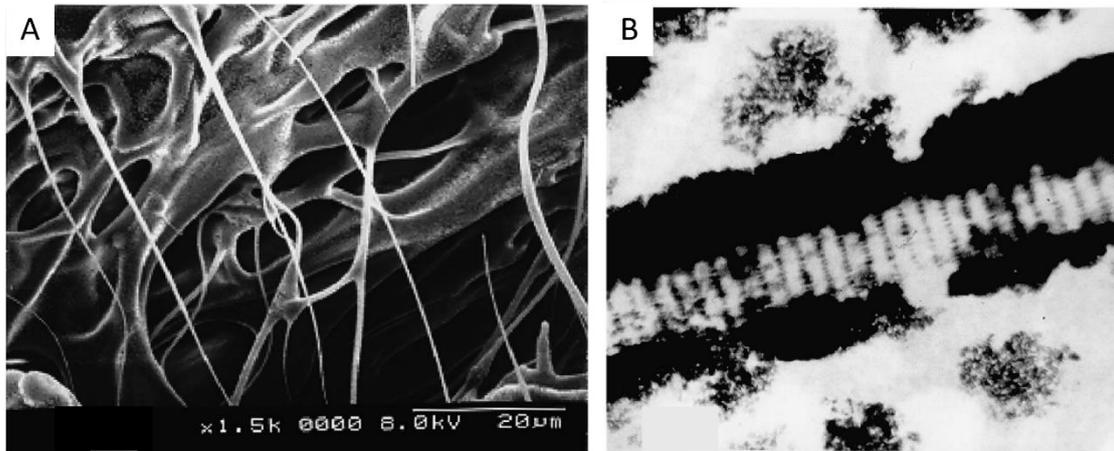


Figure 46 : (A) Observation au microscope électronique à balayage du réseau de collagène/HA et (B) observation au microscope électronique à transmission du recouvrement de HA autour des fibrilles de collagène (Xin et al., 2004).

Des fibrilles sont bien observées par la présence de bandes présentant la striation caractéristique du collagène (Figure 46(B)). Autour de ces bandes un revêtement est observé correspondant à l'HA qui couvre les fibrilles. Cette augmentation du module élastique n'a pas été observée lorsque des masses molaires élevées de l'ordre de 1,2 MDa étaient utilisées. Dans une autre étude, l'utilisation de masse molaire faible de l'ordre 400 kDa se sont révélées avoir un impact sur la structure et la porosité du réseau (Avendano et al., 2020). Dans cette étude, du collagène à 3 mg.mL^{-1} a été pré-neutralisé à 4°C pendant 10 minutes afin d'initier lentement la fibrillogénèse. Dans un second temps, une solution d'HA avec une masse molaire à 400 kDa a été ajoutée pour atteindre une concentration finale de 0, 0,5 ou 1 mg.mL^{-1} . La gélification et la fibrillogénèse du collagène ont ensuite été poursuivies à 37°C pendant 20 minutes. Cette équipe s'est aperçu qu'en utilisant de telles masses molaires, la rigidité du réseau était renforcée puisque le module d'indentation est doublé en ajoutant 1 mg.mL^{-1} de HA. Les modules mesurés sont respectivement de 4 et 10 kPa pour 0 mg.mL^{-1} et 1 mg.mL^{-1} de HA ajouté. De plus, l'ajout de HA semble augmenter la taille moyenne des pores (Figure 47(A)). Le rayon moyen des fibres mesuré augmente lui aussi avec l'ajout d'HA passant de 100 nm sans HA à 130 nm en présence d' 1 mg.mL^{-1} de HA (Figure 47(B)). Contrairement à leur hypothèse initiale, le transport de molécules n'a pas été affecté par le changement de porosité du réseau. Cette augmentation de la taille des pores a été directement attribuée au gonflement supplémentaire induit par la présence d'acide hyaluronique (Lai et al., 2016). L'augmentation du rayon des fibres de collagène a été mise en lien avec le revêtement d'acide hyaluronique autour de celles-ci.

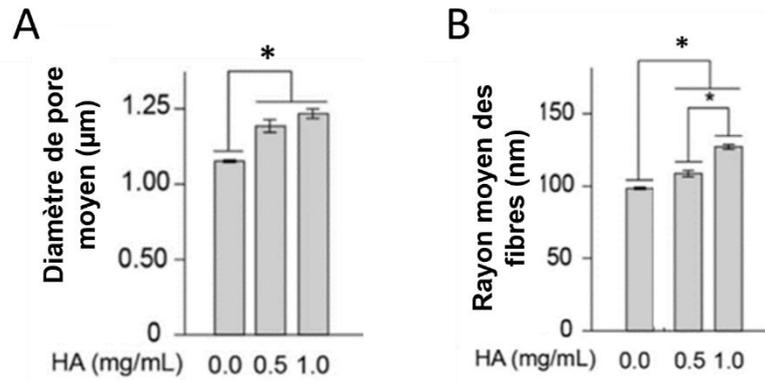


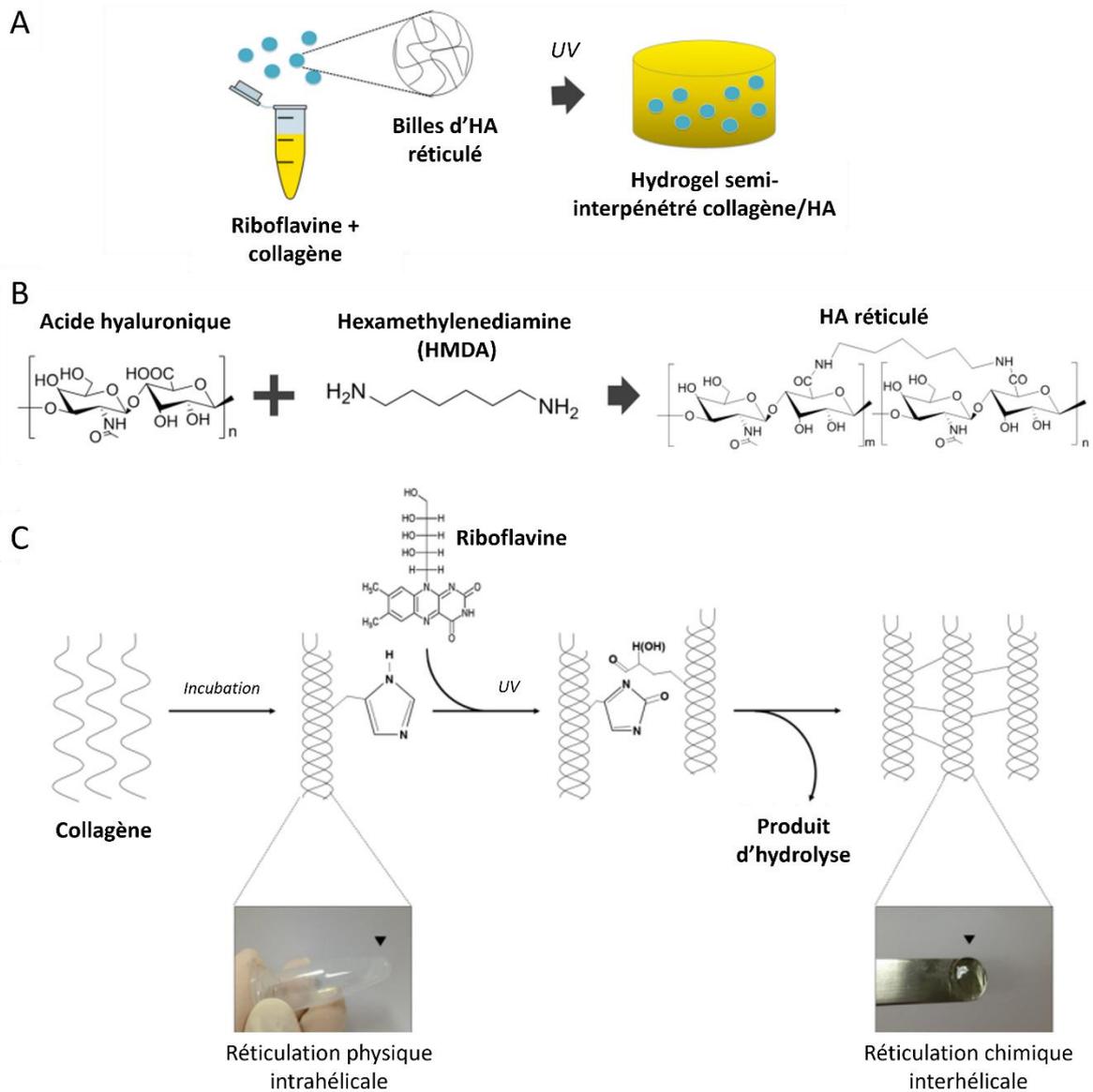
Figure 47 : Impact de l'ajout de HA à différentes concentrations sur (A) le diamètre de pore moyen et (B) le rayon moyen des fibres observées (Avendano et al., 2020).

L'acide hyaluronique peut aussi être imprégné dans le réseau fibrillaire de collagène sous une autre forme afin d'être retenu dans l'ultrastructure fibrillaire du collagène.

Une des stratégies proposées est d'imprégner l'acide hyaluronique sous forme de billes pré-réticulées dans la solution de collagène à gélifier (Figure 48(A)) (Heo et al., 2016). Dans un premier temps les billes d'HA sont formées. Pour cela, l'HA de faible masse molaire (64 kDa) est fonctionnalisé avec une diamine en présence d'un système activateur d'acide carboxylique (Figure 48(B)). Puisqu'il s'agit d'une diamine, la deuxième peut également être lié à un autre acide carboxylique d'une chaîne macromoléculaire de HA. La fonctionnalisation mène alors à la réticulation du HA qui forme un hydrogel. Cet hydrogel est ensuite lyophilisé afin de le sécher puis broyé pour former des billes d'HA.

En parallèle, une solution de collagène et de riboflavine est préparée. Les billes d'HA pré-réticulés sont incorporées dans la solution de collagène et de riboflavine qui est neutralisée avec du PBS et du NaOH 1 M puis la gélification du collagène est faite en deux temps (Figure 48(C)). Dans un premier temps, le mélange est incubé à 37°C pour amorcer la fibrillogénèse pendant 20 minutes. Dans un second temps, le collagène est réticulé sous UV grâce à la riboflavine qui crée des ponts covalents entre les acides aminés en position extérieure des triples hélices.

Ceci a permis de générer des hydrogels composites avec une rigidité renforcée d'un facteur 10 en comparaison avec des hydrogels de collagène uniquement fibrillés. La résistance à la dégradation enzymatique du réseau a également été améliorée en comparaison avec un gel de collagène juste fibrillé de manière physique.



2.2. Réseaux semi-interpénétrés où seul l'acide hyaluronique est réticulé

De la même manière qu'expliquée précédemment, des réseaux semi-interpénétrés où seul l'acide hyaluronique est réticulé peuvent être générés. Cette méthode est néanmoins plus complexe à mettre en place de par la plus grande rigidité structurale du collagène comparé à l'acide hyaluronique. Cependant, l'imprégnation du collagène permet, grâce à cette même rigidité, de changer drastiquement les propriétés des hydrogels (Kadler et al., 1987).

Le collagène est ensuite retenu par la formation de fibrilles dans le réseau d'acide hyaluronique réticulé. Pour former des fibrilles, la concentration critique du collagène doit être à minima de $4.37 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ à 29°C . En utilisant une concentration supérieure à celle-ci, le collagène est apte à former des fibrilles et donc à être retenu dans le réseau d'acide hyaluronique. La viabilité cellulaire de tels réseaux est supérieure à un réseau d'acide hyaluronique pur et génère une meilleure régénération tissulaire.

Zhu *et al* ont par exemple développés des hydrogels d'acide hyaluronique fonctionnalisés avec des méthacrylates par photoréticulation dans lesquels ils ont imprégné 0,5% en masse de collagène dans un second temps (Zhu *et al.*, 2017). Ces hydrogels ont été implantés *in vivo* pour étudier leur biocompatibilité. Après 42 jours d'implantation, la production de GAGs est multipliée par 10 en comparaison avec des hydrogels d'acide hyaluronique pur comme montré en Figure 49(A) avec la quantité de GAGs normalisée par la quantité d'ADN. Ceci est également observé par marquage du collagène avec de la safranine O et celui de l'acide hyaluronique avec du Bleu Alcian en Figure 49(B).

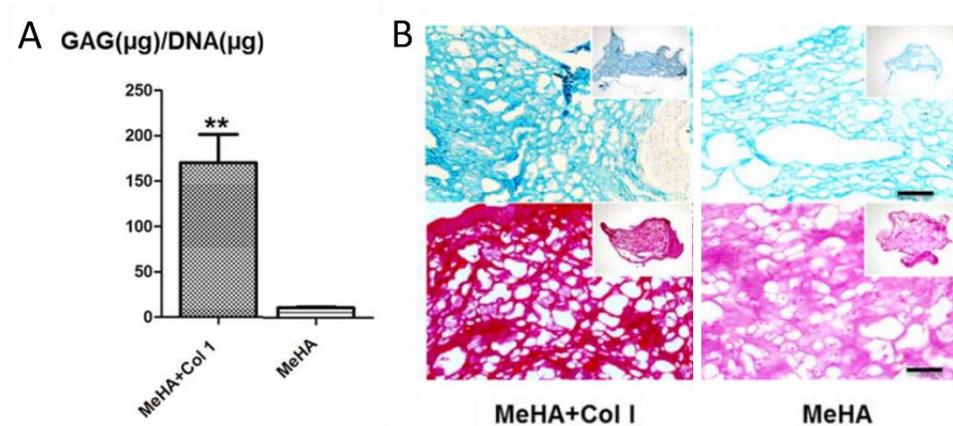


Figure 49 : Quantification par PCR quantitative de la quantité de GAGs produite par rapport à la quantité d'ADN extraite et (B) Marquage de l'acide hyaluronique au Bleu Alcian et du collagène à la Safranine O après 42 jours d'implantation (Zhu *et al.*, 2017).

En plus d'améliorer la bioactivité, l'imprégnation de collagène a un impact sur les propriétés mécaniques du réseau (Kim *et al.*, 2007). Dans une autre étude, l'acide hyaluronique a été modifié avec un PEG diglycidil-éther puis réticulé et imprégné avec du collagène à différents ratio. Plus la quantité de collagène imprégnée est élevée, plus la résistance à la traction est élevée et la porosité du gel faible. De plus, les hydrogels composites générés absorbent plus d'eau et la viabilité cellulaire évaluée avec des chondrocytes est plus élevée.

2.3. Réseaux hybrides où collagène et acide hyaluronique sont réticulés

Enfin, les réseaux de copolymères réticulés sont le dernier type d'hydrogel. Il s'agit alors d'utiliser un système de réticulation commun au collagène et à l'acide hyaluronique afin d'obtenir des hydrogels ultra-performants. Cependant, ce type de réseau ne correspond pas à toutes les applications. Par exemple, il s'agit d'un mauvais choix pour de la délivrance de médicaments puisque la double réticulation résulte en une porosité plus faible rendant l'encapsulation de médicaments difficile (Mohammadi et al., 2018).

Le système de réticulation le plus utilisé pour ce type de réseau est l'EDC/NHS qui permet d'effectuer la réticulation entre les acides carboxyliques de l'acide hyaluronique et les amines primaires du collagène (Network of Excellence in Functional Biomaterials, National University of Ireland, Galway, Ireland et al., 2010). Dans cette étude, plusieurs concentrations d'EDC/NHS ont été étudiées afin de trouver le système optimal de réticulation pour obtenir des hydrogels performants. La pré-neutralisation du collagène a été effectuée en simultané de la réticulation à l'EDC/NHS afin d'éviter la formation des CPI. L'augmentation de la concentration d'agent réticulant provoque plus de nœuds de réticulation et par conséquent un taux de gonflement qui diminue et des contraintes en compression qui augmentent. La concentration d'EDC/NHS la plus élevée (48mM) est celle pour laquelle le plus haut module élastique et la meilleure résistance à la dégradation ont été mesurées. Cependant, il s'agit également de la condition pour laquelle le taux de prolifération cellulaire était le plus bas. En effet, l'inconvénient majeur de l'utilisation d'EDC/NHS est sa cytotoxicité ce qui en fait un choix soumis à condition dans le domaine médical. C'est pourquoi d'autres utilisent des systèmes avec une meilleure biocompatibilité comme la réticulation enzymatique avec le système HRP/H₂O₂ (Ying et al., 2019).

Pour cela, collagène et acide hyaluronique ont été modifiés avec des phénol afin de pouvoir subir le même type de réticulation et engendrer un réseau hybride performant (Figure 50).

D'une part, des phénols ont été greffés sur les triples hélices de collagène (Figure 50(A)). Les phénols greffés proviennent d'un acide P-hydroxy benzoïque qui a été préalablement activé par un système DDC/NHS. Une fois activé, le réactif fonctionnel est mis en présence de collagène de type I. Une attaque nucléophile sur le carbonyle en alpha du cycle aromatique permet finalement d'obtenir les triples hélices de collagène fonctionnalisées avec des phénols.

D'autre part, l'HA est fonctionnalisé de telle sorte qu'il ait lui aussi des fonctions phénol en surface (Figure 50(B)). Pour cela, la fonctionnalisation a été faite en présence de Tyramine. Après activation de l'acide carboxylique du HA à l'EDC/NHS, l'amine présente sur la Tyramine

attaque la position faible en électrons de l'HA. Cette réaction permet de créer un pont covalent entre l'HA et la tyramine en formant un amide.

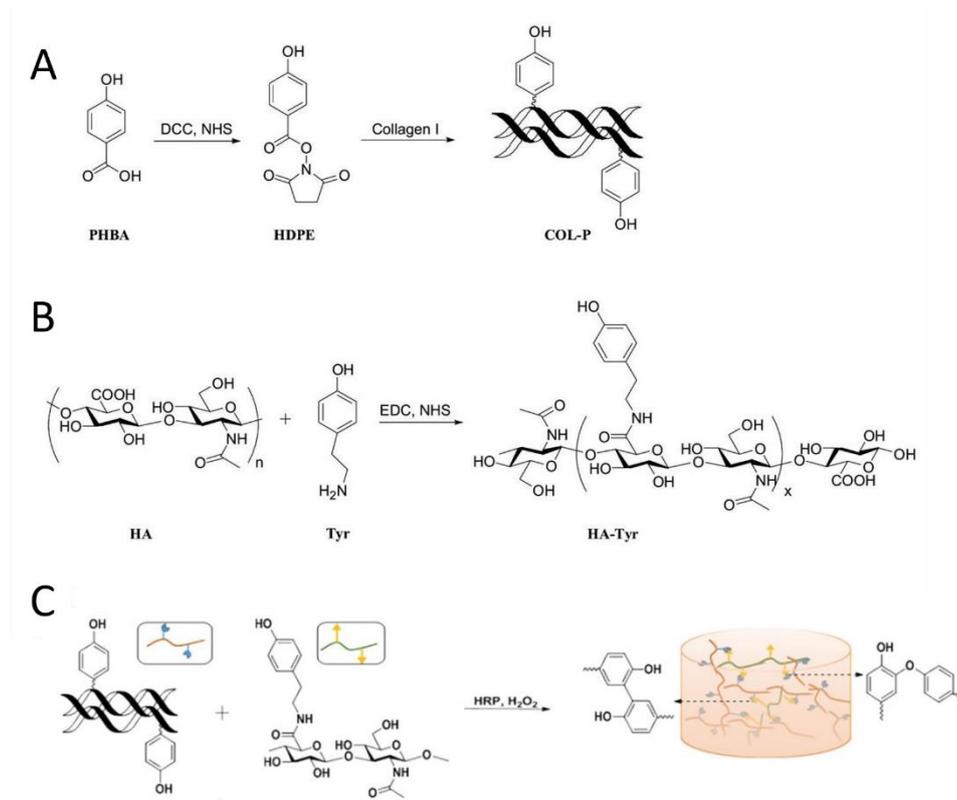


Figure 50 : Réactions de fonctionnalisation (A) du collagène et (B) de l'acide hyaluronique et (C) Réticulation des deux biopolymères par voie enzymatique (Ying et al., 2019).

Une fois les deux biopolymères fonctionnalisés, ceux-ci sont mélangés à un ratio 1 :1 et la réticulation est amorcée avec l'enzyme HRP et du H₂O₂ comme schématisé en Figure 50(C).

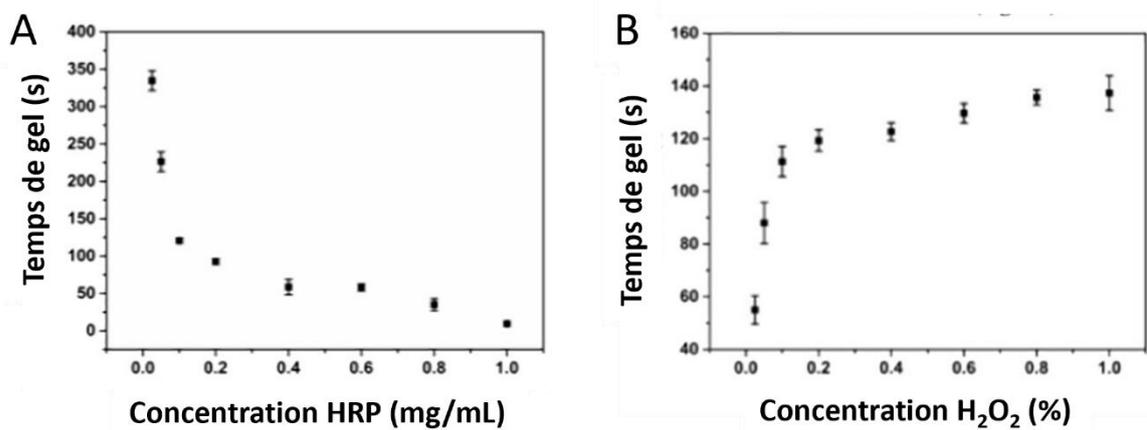


Figure 51 : Cinétique de réticulation des hydrogels hybrides en fonction de (A) la concentration de HRP (H₂O₂ fixé à 0,1%) ou (B) la concentration en H₂O₂ (HRP fixé à 0,1 mg.mL⁻¹) (Ying et al., 2019).

La cinétique réticulation est très rapide puisqu'elle prend entre quelques secondes et quelques minutes selon les concentrations de HRP (Figure 51(A)) et de H_2O_2 (Figure 51(B)). De plus, la prolifération cellulaire et la viabilité cellulaire ont été observées sur 3 jours. Enfin, une implantation *in vivo* sur modèle murin a été faite à l'issue de laquelle la réponse inflammatoire induite était moyenne et la réparation de la plaie générée était complète au bout de 14 jours.

Les réseaux de copolymères réticulés semblent être plus performants que les deux autres types de réseaux semi-interpénétrés. Néanmoins la forme fibrillaire du collagène est perdue et une cytotoxicité plus ou moins importante peut être observée. Il s'agit donc de choisir la voie la plus douce permettant de maintenir les bonnes performances physiques de ces types de réseaux.

Chapitre 5 : L'impression 3D au service de l'ingénierie tissulaire

I. Généralités sur les différentes techniques d'impression 3D

L'impression 3D est un procédé prometteur qui présente une grande diversité de techniques adaptées à des matériaux différents que ce soit des thermoplastiques ou bien des biopolymères. Elle permet de générer des structures modulables en porosité et en forme. Les matériaux générés en ingénierie tissulaire sont principalement des hydrogels qui peuvent être produits par simple impression 3D ou par bioimpression.

Selon le procédé utilisé, la structure de l'hydrogel généré n'est pas la même. L'impact directement observable se fait au niveau de l'ultrastructure et de la densité poreuse. En plus de l'orientation des pores qui peut être spécifique, la taille des pores peut elle aussi changée. Cette porosité a un impact sur la cellularisation des hydrogels. En effet, soit elle se fera selon un mode d'encapsulation soit selon un mode de colonisation (Parisi et al., 2021). Dans le cas de l'Annulus Fibrosus qui est un tissu peu poreux, celle-ci devra être minimale.

L'impression 3D repose sur le dessin d'une géométrie spécifique qui est générée par conception assistée par ordinateur. Après génération de ce modèle, il est « tranché » à l'aide d'un logiciel afin que l'imprimante puisse procéder à l'impression couche par couche. Il existe plusieurs types d'impression : le frittage sélectif par laser (SLS), la modélisation par dépôt de matière fondue (FDM), la stéréolithographie ou encore l'impression par extrusion.

Une fois le modèle généré par les différents logiciels, le type d'impression à utiliser doit être sélectionné en fonction du matériau à imprimer (Fricain et al., 2017).

L'objet peut être imprimé par jet d'encre dans un bac receveur (Hospodiuk et al., 2017). Il s'agit de déposer des petites gouttes entre 1 et 100pL sur une surface qui est stimulée thermiquement ou piézo-électriquement pour amorcer la polymérisation comme illustré en Figure 52(A) (Parisi et al., 2021). L'impression est dirigée par une augmentation de la température dans la tête d'impression permettant l'écoulement de la matière. La cinétique du dépôt de goutte est rapide et peut aller jusqu'à 10 000 gouttes/s. Néanmoins, les inconvénients sont multiples. Des résidus non polymérisés sont souvent présents dans l'objet, le procédé est non cytocompatible puisqu'il chauffe et il y a un risque de boucher l'aiguille lorsque la viscosité est trop importante d'où l'usage de faibles concentrations de polymères.

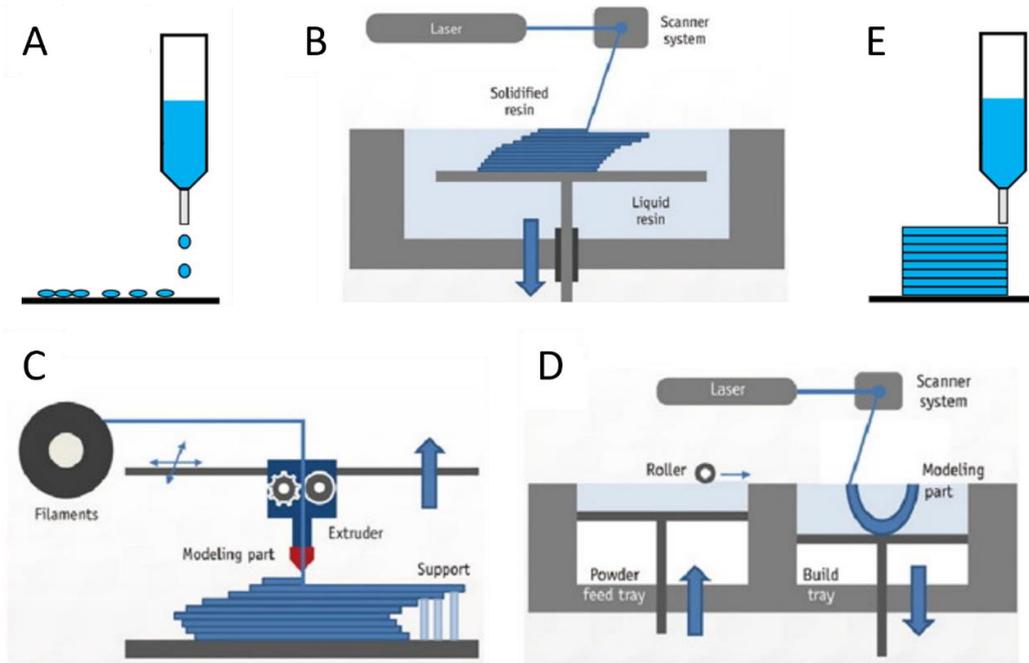


Figure 52 : Principe de (A) l'impression par jet d'encre, (B) de l'impression par stéréolithographie, (C) de l'impression par fusion de dépôt de matière fondue (FDM), (D) de l'impression par Frittage Sélectif par Laser (SLS) et (E) par extrusion ; adaptés de (Cheng et al., 2020; Xu et al., 2021).

La photoimpression est également un procédé très développé s'appuyant sur l'utilisation d'une source de lumière sur des matériaux photosensibles liquides ou solides afin de les polymériser (Hospodiuk et al., 2017).

Parmi tous les types, la stéréolithographie est la plus utilisée grâce à sa haute résolution. En stéréolithographie, une solution de polymères sous forme de résine liquide est photoréticulée dans un bac receveur afin de conduire la polymérisation *in situ* et de générer l'objet final (Figure 52(B)). Cela permet de contrôler l'architecture interne et externe du prototype en imprimant couche par couche. Les polymères utilisés doivent être de viscosité faible, photoréticulable et avec une cinétique de réticulation rapide. Il s'agit notamment de polycaprolactone (PCL), de polyuréthane (PU). Il est également possible d'incorporer des cellules à la suspension à condition que la source lumineuse et l'agent de réticulation soient adaptés. Les UV sont alors à proscrire en faveur de la lumière visible et les agents de réticulation doivent être non cytotoxiques par exemple en utilisant de l'éosine Y ou du lithium phenyl-2,4,6- trimethylbenzoylphosphinate (LAP). L'inconvénient majeur est le temps de process long pour générer un construit épais (Lim et al., 2018; Miri et al., 2018; Moroni et al., 2018).

On distingue aussi la SLS et la FDM qui sont également très développées. Au cours de la FDM, des objets sont générés par extrusion de filaments de polymères thermoplastiques préalablement chauffés au-dessus de leur température de fusion afin de les fondre. Le principe est schématisé en (Figure 52(C)). L'extrusion se fait à l'état liquide au travers d'une aiguille puis les

filaments extrudés sont déposés couche par couche pour former l'objet. On utilise généralement du polycaprolactone ou de l'acide polylactique. La cytocompatibilité peut être améliorée post-impression par incorporation de substances bioactives ou par traitements de surface. La SLS, quant-à-elle, transforme des particules de poudre en solide 3D par application de chaleur localisée par l'application d'un faisceau laser comme illustré en Figure 52(D) (Parisi et al., 2021). Les polymères utilisés sont généralement des polycaprolactones, des poly-acide L lactique ou encore des Poly-éther-éther-cétone. L'inconvénient de la SLS est dû au rétrécissement des matrices et à la haute température utilisée qui n'en fait pas un procédé cytocompatible. De manière similaire à la FDM, ce procédé n'étant pas cytocompatible de par la chauffe, la biocompatibilité de l'objet peut être améliorée par incorporation de substances bioactives. Les résolutions d'impression sont les mêmes pour la SLS et la FDM. Enfin, il existe d'autres types de photoimpression moins connus comme la polymérisation 2-photon (2PP) qui utilise des hydrogels comme précurseurs. La 2PP, en plus d'être biocompatible, permet d'atteindre des résolutions encore plus grandes de l'ordre du nanomètre (Parisi et al., 2021).

Enfin, le dernier type d'impression 3D est l'extrusion (Figure 52(E)) (Hospodiuk et al., 2017). Pour y procéder, des têtes d'impression mobiles se déplacent dans les trois dimensions pour extruder l'encre selon une trajectoire définie couche par couche. Dans ces têtes d'impression, se trouve le système d'extrusion qui peut être soit mécanique avec l'utilisation d'un piston soit pneumatique par utilisation d'une pression d'air comprimé soit par extrusion mécanique à l'aide d'une vis sans fin (Figure 53(B)) (Andrea Schwab et al., 2020). A l'issue de l'impression 3D par extrusion, des morphologies et orientations très variées peuvent être obtenues selon le diamètre de la buse d'extrusion, la viscosité de l'encre et les paramètres d'impression. En fonction de la viscosité de l'encre, la buse d'extrusion peut être de différentes formes. Il peut s'agir d'un cône ou bien d'une aiguille. Les paramètres d'impression regroupent par exemple la vitesse de dépôt de la matière, la température du lit d'impression et de la tête d'impression, la pression exercée pour extruder et le pourcentage de remplissage du modèle. Une fois que tous ces paramètres sont optimisés, la résolution peut aller jusqu'à 100 μm . De manière générale, les polymères utilisés sont plutôt des biopolymères comme l'alginate, le chitosane, le collagène, la cellulose ou encore l'acide hyaluronique. L'avantage majeur de cette technique est dû à l'impression sous pression. En effet, puisque la pression d'extrusion peut être modulée, des encres à haute viscosité et concentration peuvent être mises en forme par ce procédé. Il s'agit également d'un procédé biocompatible c'est pourquoi la bioimpression d'encres cellularisées se fait par extrusion. Enfin, il est possible d'imprimer des objets en utilisant plusieurs têtes d'impression afin d'obtenir des gradients de polymères, des architectures complexes par l'usage d'encres sacrificielles ou encore des alternances de plusieurs encres. Par exemple les encres sacrificielles

comme le Pluronique sont largement utilisées pour générer des canaux après élimination de l'encre. Ces canaux permettent de transporter des nutriments ou d'ensemencer des cellules lorsque l'hydrogel est cellularisé. Ce procédé étant le plus biocompatible et permettant d'atteindre des morphologies et orientations spécifiques dans l'objet final, c'est celui qui a été sélectionné afin de développer notre modèle d'Annulus Fibrosus.

II. L'impression 3D par extrusion

1. Bioimpression vs impression 3D

Lorsque l'objet à développer doit être cellularisé, l'impression 3D par extrusion est le meilleur candidat de par sa bonne biocompatibilité. On parle alors de bioimpression. Deux stratégies peuvent être développées soit en utilisant une bioencre soit une encre formant le biomatériau (Figure 53(A)).

L'encre utilisée peut être cellularisée pré-impression ; dans ce cas, le gradient de pression lors de l'extrusion doit être contrôlé afin de ne pas traumatiser les cellules et les mener vers une mort certaine. Il s'agit d'une bioencre.

Différemment, l'encre peut être non cellularisée, il s'agit de l'encre formant le biomatériau. Dans ce cas, il s'agit d'imprimer l'objet puis de le cellulariser post-impression ce qui génère moins de mort cellulaire car moins de contraintes de cisaillement pour les cellules. Néanmoins, à l'issue de cette stratégie, les cellules ne sont pas encapsulées dans le matériau.

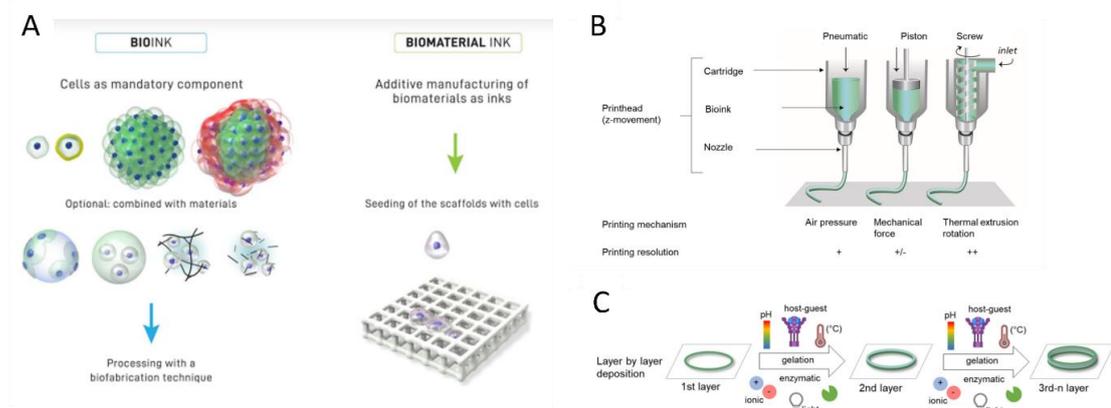


Figure 53 : (A) Définition schématique d'une bioencre et d'une encre de biomatériau, (B) Schéma des 3 modes d'impression 3D par extrusion et (C) Principe de l'impression couche par couche en extrusion (Andrea Schwab et al., 2020).

2. Les différents types d'encres

L'encre utilisée est généralement une formulation de polymères qui peuvent être naturels ou synthétiques et qui forment un hydrogel post-impression (Hospodiuk et al., 2017). L'utilisation d'encres synthétiques a l'avantage d'atteindre de meilleures propriétés mécaniques. Cependant, ne disposant pas de molécules bioactives, ces hydrogels ne permettent pas un bon support et une bonne prolifération des cellules. De l'autre côté, les encres composées de polymères naturels ou biopolymères génèrent des objets aux propriétés mécaniques plus faibles mais ayant une biocompatibilité plus importante. Dans ce cas, les hydrogels générés sont bioactifs et permettent le support et la prolifération cellulaire. Pour l'impression par extrusion, les encres doivent être assez visqueuses et gélifier pour qu'il y ait une rétention de forme permettant d'obtenir un construit cohésif.

Parmi ces polymères naturels, il existe deux classes (Gasperini et al., 2014; Lee and Mooney, 2012). Les biopolymères issus de vertébrés comme le collagène, la fibrine ou encore l'acide hyaluronique possèdent des molécules de signalisation de l'adhérence cellulaire. Ils ont une meilleure compatibilité cellulaire. Les biopolymères provenant d'autres organismes comme l'alginate, l'agarose ou encore le chitosane ne disposent pas de ces molécules. Pour cette raison, on préfère utiliser des biopolymères issus de vertébrés.

Comme dit précédemment ces encres sont utilisées afin de former des hydrogels (Drury and Mooney, 2003; Ye et al., 2000). En effet, les hydrogels sont favorisés de par leur réseau poreux et leur hydratation élevée permettant d'encapsuler des cellules. Ainsi, les cellules sont mobiles à travers le réseau poreux qui est flexible. Ces pores permettent également le bon transport de nutriments, d'oxygène et de composés solubles dans l'eau de manière générale. Les pores peuvent être générés selon les échelles différentes. On distingue les micropores qui sont ceux générés à l'échelle de l'assemblage macromoléculaire des pores macroscopiques. Les pores macroscopiques sont générés au cours de l'impression 3D. Ils peuvent être plus ou moins gros en faisant varier le pourcentage de remplissage de chaque couche imprimée et sont générés lorsque deux couches sont superposées. Leur taille peut également être modulée par la distance intercouche c'est-à-dire la distance entre deux couches puisqu'un écrasement du filament plus ou moins important peut être appliqué.

Néanmoins tous les hydrogels ne sont pas imprimables d'où la notion d'imprimabilité (Hospodiuk et al., 2017). Les propriétés rhéologiques de l'encre sont au cœur de l'imprimabilité.

L'encre utilisée peut être un fluide non newtonien c'est-à-dire que sa viscosité dépend de son taux de cisaillement. Parmi les fluides non newtoniens, plusieurs comportements sont observables. Il existe notamment des comportements rhéofluidifiant ou rhéoépaississant. Les meilleurs candidats ont un comportement rhéofluidifiant comme représenté en Figure 54(A). Ces

derniers sont capables, sous l'action d'une contrainte de cisaillement, de s'écouler puis de redevenir visqueux une fois que le cisaillement cesse (Sun et al., 2020). La forme peut ainsi être maintenue une fois sa viscosité récupérée.

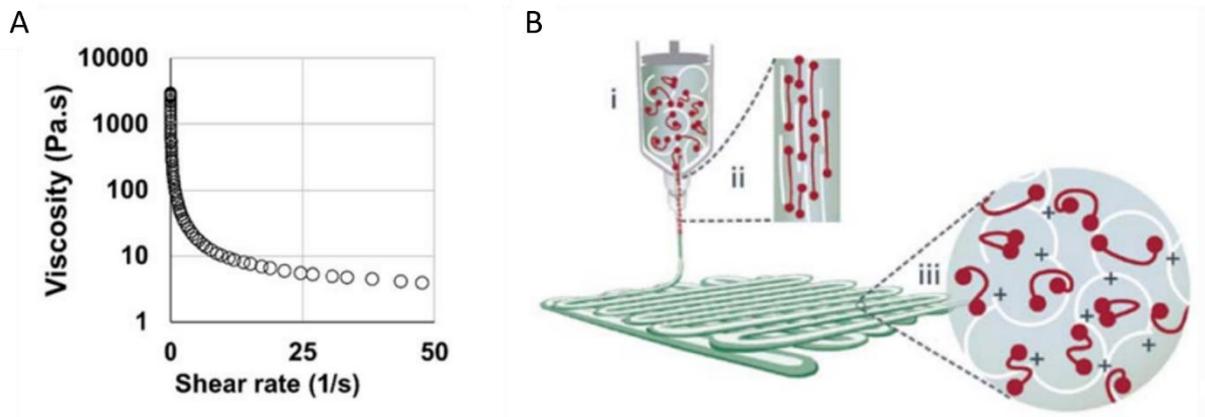


Figure 54 : (A) Courbe de la viscosité en fonction du taux de cisaillement représentatif d'un comportement rhéofluidifiant, (B) Principe de l'écoulement d'un fluide rhéofluidifiant à travers la buse d'extrusion (Sun et al., 2020).

Si l'encre n'est pas assez visqueuse, une deuxième stratégie peut être adoptée. On utilise des bains de biopolymère sacrificiels comme bâtis. Cela consiste à imprimer l'encre dans un bain qui permettra de supporter l'encre peu visqueuse le temps de sa gélification ou sa réticulation. Après cela, l'encre sacrificielle qui peut être par exemple du pluronique ou de la gélatine est éliminée post-impression.

Les propriétés de tension de surface sont également importantes afin que le filament se détache aisément de l'aiguille et que le dépôt se fasse (Hospodiuk et al., 2017). Pour cela, il est important que la force d'adhésion de l'encre sur l'aiguille soit faible. A contrario, celle-ci doit être importante pour le support d'impression afin que le filament préfère se déposer sur le support plutôt que de rester au contact de l'aiguille. Pour cela, la rugosité de surface du support peut avoir un rôle à jouer. Les meilleurs supports disposent d'une grande rugosité de surface ainsi que d'une faible mouillabilité comme c'est le cas pour le verre et le plastique par exemple. Une fois le filament déposé, la cinétique de gélification doit être rapide afin qu'il y ait rétention de forme. Si celle-ci était trop longue, la forme et l'orientation données se perdraient par affaissement ou par diffusion du filament. Il n'y aurait donc plus aucun sens d'utiliser de l'extrusion. En bioimpression par extrusion, il existe quelques limitations liées à l'encre (Hospodiuk et al., 2017). La première est liée à l'encapsulation des cellules dans le réseau poreux des hydrogels. En effet, la densité poreuse post-impression limite les interactions entre cellules ce qui ne permet pas d'atteindre des densités cellulaires aussi élevées que dans les tissus natifs. De plus, pour mimer les tissus qui sont denses, il faut développer des matériaux denses donc très concentrés. Cependant, plus la densité de l'encre est élevée plus il est difficile d'imprimer puisque la pression à exercer est

bien plus importante. Une densité du réseau élevée entraîne également une réduction de la mobilité cellulaire et de l'étalement s'accompagnant d'une diminution de la prolifération cellulaire et de la production de MEC. Il s'agit donc de compromis à faire afin de développer des encres denses dont la cytotoxicité serait la plus faible possible. Enfin, la dernière limitation est liée à la présence de zones transitoires dans les tissus natifs (Sun et al., 2020). Ces zones, comme celle présente entre le NP et l'AF, présentent des gradients complexes difficilement reproductibles par impression 3D à moins d'utiliser plusieurs têtes d'impression avec différentes encres. Il s'agirait alors d'optimiser les paramètres d'impression de chaque encre afin de les imprimer en alternance pour former une zone transitoire présentant différentes interfaces.

III. L'impression 3D du collagène

Le collagène a souvent été utilisé en impression 3D par extrusion pour sa biocompatibilité et sa bioactivité. Le problème majeur rencontré concerne sa cinétique de gélification qui est lente (Ferreira et al., 2012). A 37°C, sa gélification peut prendre jusqu'à 30 minutes, il est alors difficile de conserver la forme du filament post-extrusion.

Deux stratégies sont majoritairement utilisées afin de pallier à cet inconvénient.

La première est d'utiliser une encre de polymères dite sacrificielle. Cette encre sacrificielle est imprimée et gélifiée par impression 3D pour servir de support au matériau visé. Dans un second temps la deuxième encre est extrudée afin de former le biomatériau désiré. L'hydrogel sacrificiel a la particularité de pouvoir être éliminé aisément une fois que le biomatériau d'intérêt a été gélifié. Il s'agit donc d'un support qui maintient l'encre principal le temps qu'elle gélifie.

La seconde possibilité est d'accélérer la cinétique de gélification à travers l'utilisation de bains de fibrillogénèse et gélification. Cette seconde voie a fait l'objet de nombreuses investigations poussées au sein du Laboratoire de Chimie de la Matière Condensée. Le maintien du filament extrudé de collagène est permis par l'utilisation de bains de tampons phosphates à pH neutre ayant une force ionique plus ou moins élevée. Ainsi, les triples hélices de collagène sont contraintes à précipiter en déclenchant directement la fibrillogénèse ce qui fige le système. La force ionique du bain peut être modulée en fonction des sels utilisés et de leur concentration. Selon le bain utilisé, il a été démontré que les filaments extrudés de collagène gonflent ou se contractent (Picaut et al., 2018).

Lorsque du PBS 1X avec une force ionique finale de 166mM a été utilisé, celle-ci n'était pas suffisante pour conserver la taille du filament ce qui a mené à un gonflement de $1,53 \pm 0,05$ (comparaison à la taille du filament extrudé, valeur de référence égale 1). En augmentant la concentration du PBS à 5X, ce qui correspond à une force ionique de 825mM, le rapport est diminué pour atteindre une rétention de forme à $0,98 \pm 0,05$. Il s'agit donc de la force ionique nécessaire pour conserver la taille du filament extrudé comme observé en Figure 55(A). Enfin, en utilisant du PBS10X, la force ionique devient tellement importante (1650mM) que le filament se contracte (Figure 55(A)). Ceci se traduit par un rapport de $0,82 \pm 0,04$.

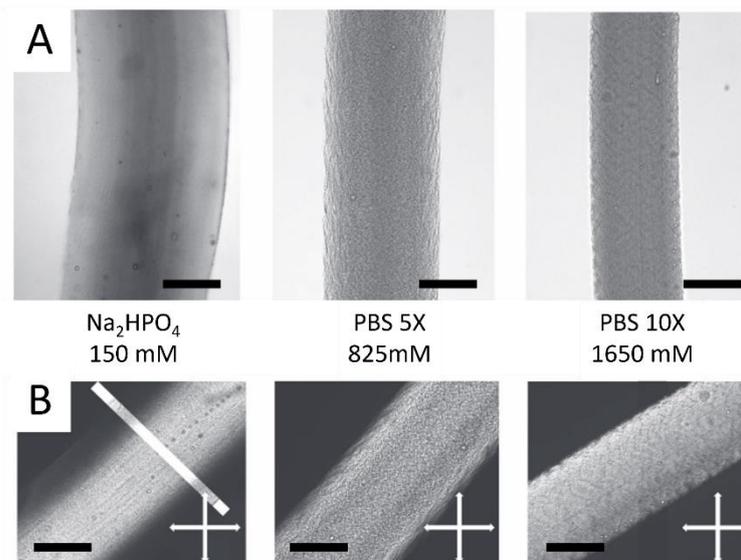


Figure 55 : Observation au Microscope Optique à Lumière Polarisée (A) du diamètre des filaments extrudés dans trois bains de force ionique différentes et (B) de leur biréfringence sous polariseurs croisés, échelle = 200 µm (Picaut et al., 2018).

L'extrusion d'une solution concentrées à 30 mg.mL^{-1} à travers l'aiguille a conduit à l'alignement des molécules de collagène. Le cisaillement a été suffisant pour générer une anisotropie des triples hélices de collagène. A cette concentration, le collagène devrait relaxer au cours du temps et on devrait perdre l'anisotropie. Par contre, si un bain de gélification qui permet une fibrillogénèse rapide des filaments extrudés est utilisé, cet alignement pourrait être « figé » entre les fibrilles de collagène au lieu des triples hélices. L'alignement des molécules de collagène dans les filaments gélifiés a été étudié par microscopie optique à lumière polarisée. Lorsque la force ionique est la plus élevée (PBS 10X), les fibrilles sont toutes orientées le long du filament alors que si elle n'est pas suffisante, par exemple à 150 mM dans du Na₂HPO₄, il n'y a que le centre du filament qui est orienté comme illustré en Figure 55(B). Le diamètre du filament peut être amené à évoluer dans le temps si la force ionique n'est pas suffisante menant à un peu de diffusion de matière. Cependant, pour les forces ioniques les plus élevées, celui-ci reste stable sur deux semaines.

Les fibrilles de collagène ont également été observées par microscopie électronique à transmission. Il semble que la force ionique ait aussi un impact sur celles-ci. En effet, une force ionique élevée permet d'obtenir des fibrilles courtes et homogènes en taille alors qu'une force ionique faible ne donne pas systématiquement des fibrilles et celles obtenues ne sont pas monodisperses et de même taille. Les propriétés mécaniques par traction des filaments extrudés ont également été mesurées et comparées entre elles. Il s'est avéré que le module d'Young et la contrainte à la rupture était plus important lorsque le bain de PBS 5X était utilisé, c'est-à-dire la condition pour laquelle ni gonflement ni contraction du filament n'ont été observés. Ces deux paramètres sont plus faibles pour les autres conditions qu'il s'agisse d'un gonflement ou d'une contraction du filament.

A l'issue de cette étude, le bain de PBS 5X s'est avéré être le meilleur pour obtenir des filaments extrudés anisotropes où toutes les molécules de collagène sont alignées le long de celui-ci avec des propriétés mécaniques optimales et des fibrilles bien présentes tout en gardant le diamètre du filament intact

Sur cette base, Camman et *al* ont étendu cette étude à l'impression 3D par extrusion pour développer des construits épais anisotropes aux propriétés améliorées mimant le muscle (Camman et al., 2023).

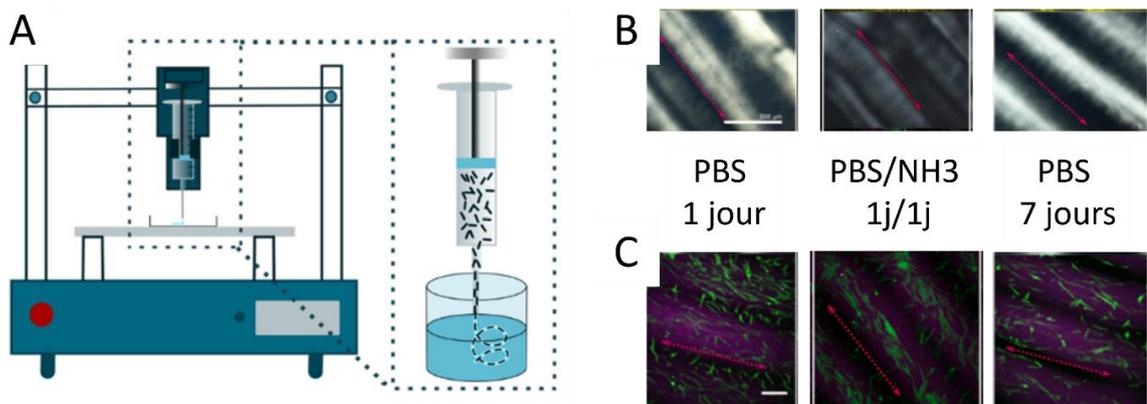


Figure 56 : (A) Schéma du montage d'impression 3D du collagène par extrusion dans un bain de fibrillation contenant du PBS 5X et observation (B) de l'anisotropie des construits par MOLP (échelle = 500µm) et (C) de l'alignement des fibroblastes le long des filaments au microscope confocal (échelle = 250 µm) (Camman et al., 2023).

Dans cette étude, la fibrillogénèse du collagène et sa gélification sont effectives. A travers l'aiguille, l'encre constituée d'une solution de collagène dense à 30 mg.mL⁻¹ est cisailée, forçant les triples hélices à s'aligner le long de l'aiguille avant d'être extrudées. La force ionique élevée dans le bain d'impression (PBS 5X) permet de contraindre les filaments et de les figer afin de former des fibrilles orientées (Figure 56(A)). Le temps de gélification rapide des filaments

(inférieur à 2min) par une force ionique élevée permet une gélification, un maintien de l'alignement des molécules et leur auto assemblage en fibrilles (Figure 56(B)). A la fin on a un hydrogel anisotrope constitué de fibrille de collagène au lieu de triple hélice. Cette technique évite que la solution relaxe (prévisible à cette concentration de collagène) et que l'alignement soit perdu. Ensuite les hydrogels de collagène sont placés sous vapeurs d'ammoniaques pour augmenter leurs propriétés mécaniques en augmentant les interactions entre les molécules de collagène. Enfin pour vérifier l'anisotropie des construits, des fibroblastes ont été ensemencés sur ces hydrogels et se sont alignés le long des fibrilles de collagène (Figure 56(C)). Ainsi le PBS 5X, comme l'avait démontré Lise Picaut précédemment s'avère donc être un bon candidat pour générer des hydrogels de collagène anisotropes avec de bonnes propriétés mécaniques.

Dans un second temps, une macroporosité a été générée à l'aide d'aiguilles pour permettre la colonisation des cellules musculaires dans l'hydrogels imprimés en 3D (Figure 57(A)). Ceux-ci ont pour but de permettre la génération de faisceaux de muscles à travers ces canaux après ensemencement. Pour cela, des myoblastes ont été ensemencés à travers ces canaux puis les hydrogels cellularisés ont été cultivés soit dans du milieu de culture soit dans du milieu de différenciation. Il a été observé que des faisceaux de muscles étaient pleinement développés au bout de 4 jours et que ces faisceaux s'alignaient le long de l'axe d'impression comme observé en Figure 57(B).

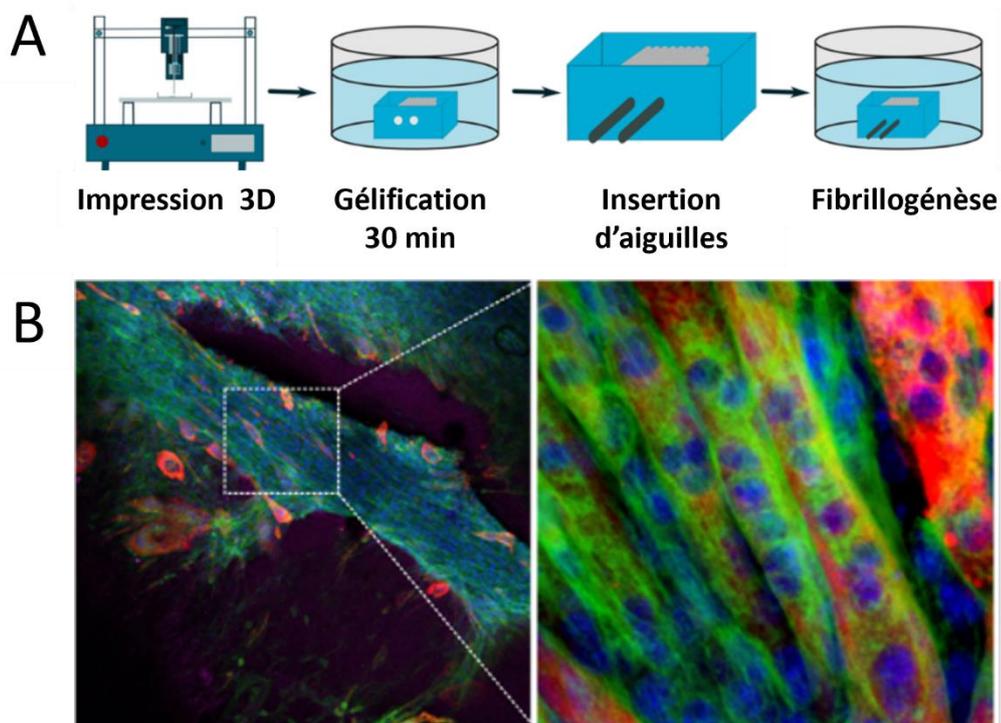


Figure 57 : (A) Schéma du procédé développé pour générer un second niveau de porosité et (B) Observation au confocal des myotubes générés après 4 jours de culture dans du milieu de différenciation (vert=filaments d'actine ; bleu = noyaux ; rouge=myosine) (Camman et al., 2023).

IV. L'impression 3D de l'acide hyaluronique

L'impression 3D de l'acide hyaluronique peut être conduite par stéréolithographie, jet d'encre ou extrusion en vue de sa stabilité thermique (Collins and Birkinshaw, 2013). L'acide hyaluronique étant un fluide rhéofluidifiant avec une prédominance visqueuse, il n'y a pas de rétention de forme après cisaillement. C'est pourquoi, pour être mis en forme, il doit systématiquement être fonctionnalisé afin de permettre sa réticulation post impression ou *in situ* et la génération d'un hydrogel. De plus, il est généralement combiné à d'autres polymères pour améliorer son imprimabilité. Il peut être majoritaire mais un polymère porteur comme le PCL ou un polymère sacrificiel doit être présent pour maintenir une forme le temps de la polymérisation. La deuxième stratégie, la plus répandue, est de le combiner à d'autres biopolymères afin de gagner en cytocompatibilité ainsi qu'en rétention de forme.

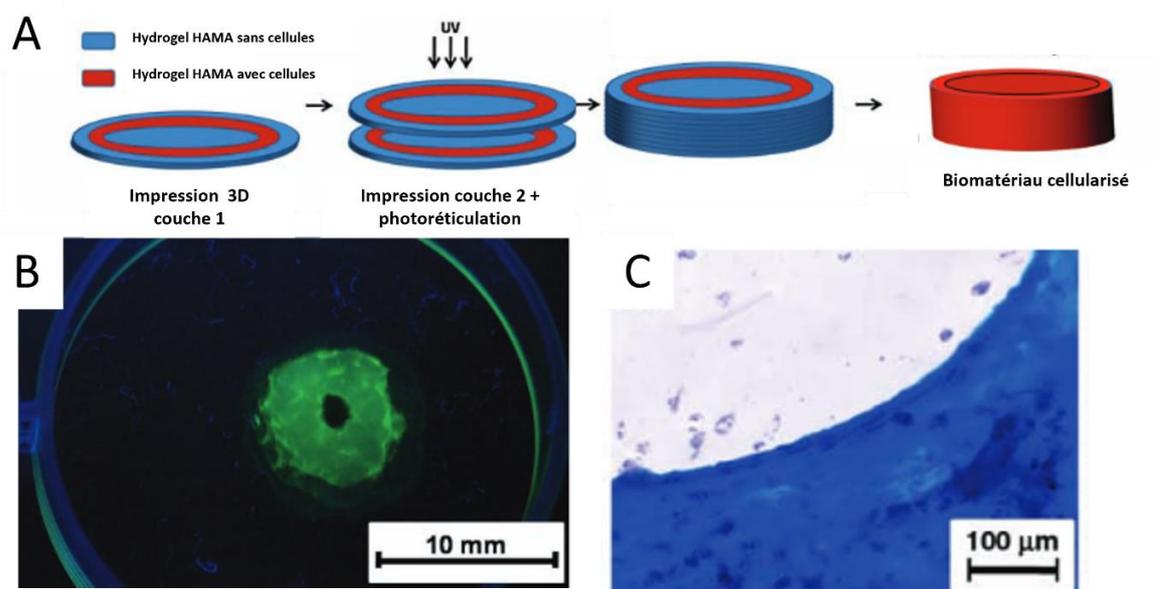


Figure 58 : (A) Principe de la génération couche par couche adapté au modèle à suivre, (B) Observation par fluorescence du traceur BODIPY attestant de la présence de cellules dans la tubulure et (C) Marquage du collagène au Trichrome de Masson après trois semaines de culture (Skardal et al., 2010).

Les propriétés additionnelles recherchées orientent le choix du biopolymère utilisé en combinaison avec l'HA. Par exemple, pour améliorer l'adhérence cellulaire des hydrogels d'acide hyaluronique, il faut utiliser un biopolymère ayant cette propriété comme la gélatine (Skardal et al., 2010). Dans l'étude présentée ici, la gélatine et l'acide hyaluronique ont été fonctionnalisés avec des méthacrylates pour générer un construit tubulaire par extrusion.

Une fois fonctionnalisés, les deux biopolymères sont mélangés puis des cellules de différents types (fibroblastes, cellules d'hépatome humain et cellules épithéliales intestinales) sont

incorporées avec un traceur fluorescent type BODIPY pour obtenir la bioencre. Une seconde encre ne contenant que de l'acide hyaluronique est développé pour créer des murs limitant la cellularisation pour avoir la forme tubulaire. Une fois les encres formulées, l'impression 3D est conduite en quatre étapes. La première est d'imprimer un cercle avec l'encre de HA pour créer la partie intérieure de la tubulure. Puis un anneau est imprimé avec la bioencre. Enfin, la partie extérieure de la tubulure est imprimée avec l'encre de HA puis la réticulation se fait sous UV pendant 60s couche après couche pour rendre la matrice cohésive. L'hydrogel généré est décrit en Figure 58(A).

Pendant 21 jours, les cellules ont été observées par fluorescence à 365nm grâce au traceur incorporé plus tôt. Les cellules ont bien été maintenues dans la section tubulaire comme visualisé en Figure 58(B) puisque l'anneau composé de gélatine et de HA est cellularisé alors que l'hydrogel composé seulement de HA ne l'est pas. Au jour 21, les cellules étaient toujours présentes seulement dans la partie tubulaire et de la matrice extracellulaire a été créée. Ceci a été mis en évidence par le marquage du collagène sécrété au trichrome de masson (Figure 58(C)). De plus, les propriétés mécaniques de cet hydrogel ont augmenté suite à cette production de MEC. Ici, l'acide hyaluronique a été montré comme étant un mauvais support d'adhésion cellulaire peu importe le type cellulaire. Néanmoins en ajoutant de la gélatine qui possède des séquences RGD favorisant l'adhérence cellulaire, celui-ci a pu être cellularisé et a démontré une bonne bioactivité sur 21 jours.

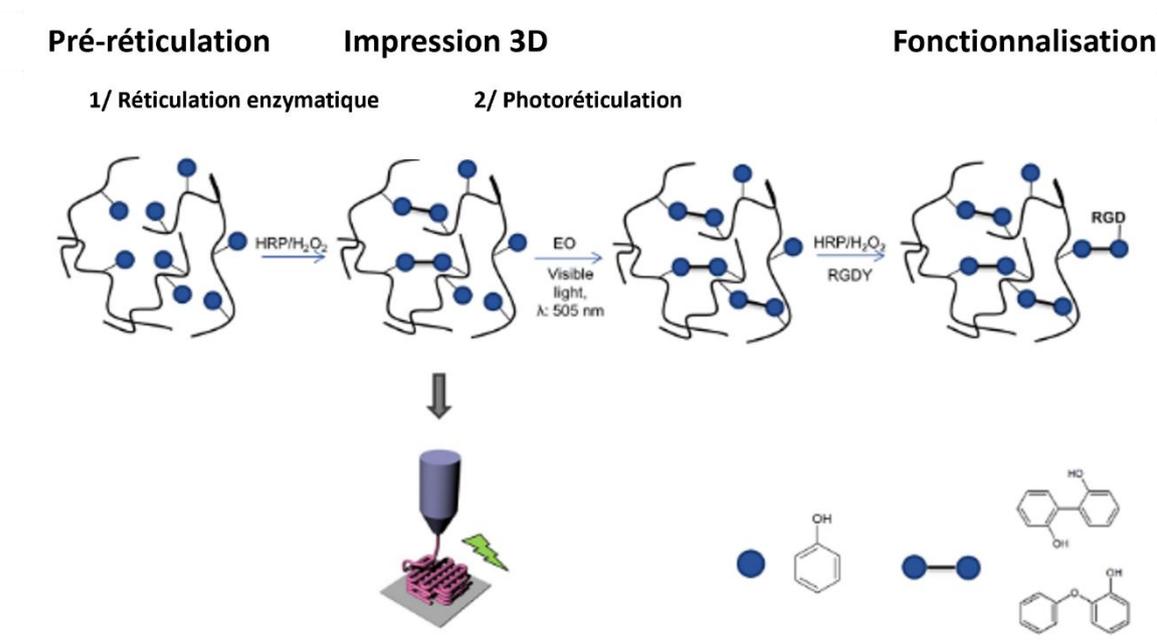


Figure 59 : Stratégie d'impression d'une encre composée seulement d'acide hyaluronique (Petta et al., 2018).

Il existe quelques exemples de systèmes optimisés où des encres d'acide hyaluronique sont imprimées sans être combiné à d'autres polymères. Ces hydrogels sont bioactifs à condition

de les fonctionnaliser post-impression avec des séquences bioactives. Petta et al ont développé un système à double réticulation leur permettant d'imprimer l'acide hyaluronique tout en ayant une bonne cytocompatibilité et une bonne rétention de forme (Petta et al., 2018).

Ici l'acide hyaluronique est fonctionnalisé avec de la Tyramine puis l'encre est formulée en incorporant de l'éosine Y comme agent de photoréticulation et de la HRP et du H₂O₂ comme agent de réticulation enzymatique (Figure 59). Ainsi, l'encre est pré-réticulée par voie enzymatique juste avant l'impression. L'encre pré-réticulée est alors imprimée par extrusion et photopolymérisée *in situ* pour figer le réseau et avoir une rétention de forme immédiate.

L'hydrogel obtenu a été observé par microCT et est présenté en Figure 60(A). Selon la couleur détectée, on observe que les nœuds d'impression ont une épaisseur plus importante que les filaments individuels.

Une fois produit, l'hydrogel est fonctionnalisé par le biais du greffage de séquences RGD par voie enzymatique sur les phénols des tyramines. Le greffage de ces séquences a pour objectif d'augmenter l'adhésion cellulaire sur l'acide hyaluronique et donc lui permettre de devenir un bon support cellulaire.

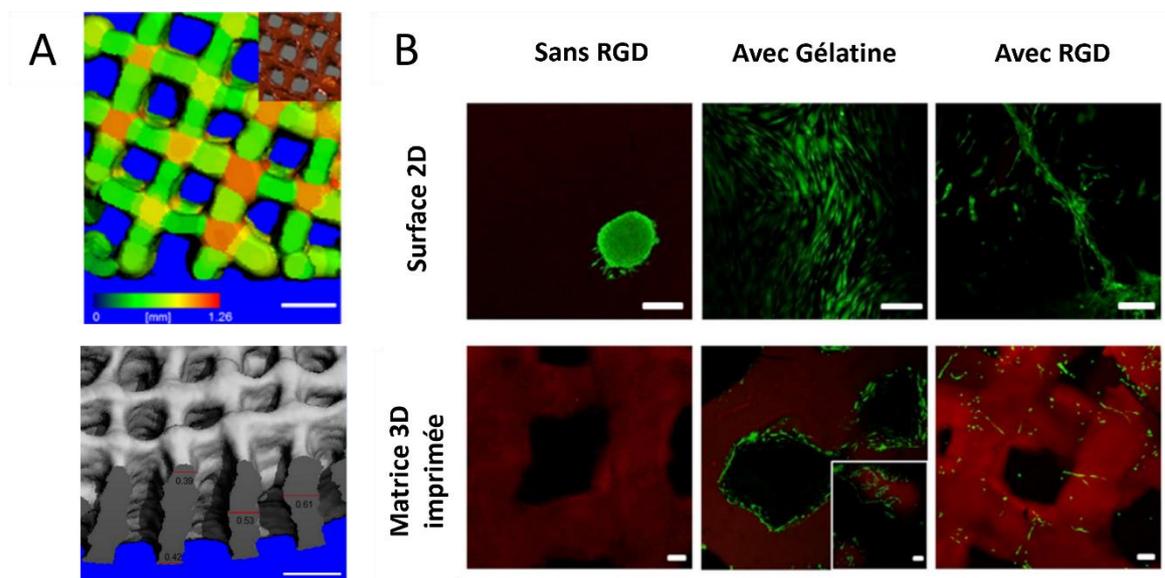


Figure 60 : (A) Observation 3D des hydrogels imprimés par micro-CT (échelle=1mm) et (B) LIVE/DEAD observé par fluorescence sur les surfaces 2D et 3D après 7 jours de culture avec une fonctionnalisation avec de la gélatine comme contrôle positif (Petta et al., 2018).

Enfin la biocompatibilité de ce construit élaboré sur 20 couches a été étudiée avec des cellules mésenchymateuses. Celles-ci ont étéensemencées post-impression par dépôt de $1,5 \times 10^6$ cellules dans 80 μ L de milieu de culture. Puis, les construits cellularisés ont été cultivés pendant 7

jours. Les résultats au 7^{ème} jour sont présentés en Figure 60(B). Même si la viabilité cellulaire n'est pas aussi élevée que pour le contrôle de gélatine, une augmentation de celle-ci par rapport à de l'acide hyaluronique pur est bien visible. Ceci confirme bien la nécessité d'ajouter des composés bioactifs au HA pour obtenir des systèmes biomimétiques plus performants.

V. L'impression 3D de composites collagène/acide hyaluronique

Des hydrogels hybrides collagène/HA ont déjà été développés avec plus ou moins de succès et des applications variées. Par exemple, Bavaresco et al se sont focalisés sur l'impact du procédé de génération de ces hydrogels sur leur structure (Bavaresco et al., 2020). Ils sont parvenus à imprimer des hydrogels hybrides de 6x6mm sur 6 couches avec une épaisseur de couche comprise entre 650 et 700 μm comme présenté en Figure 61(A).

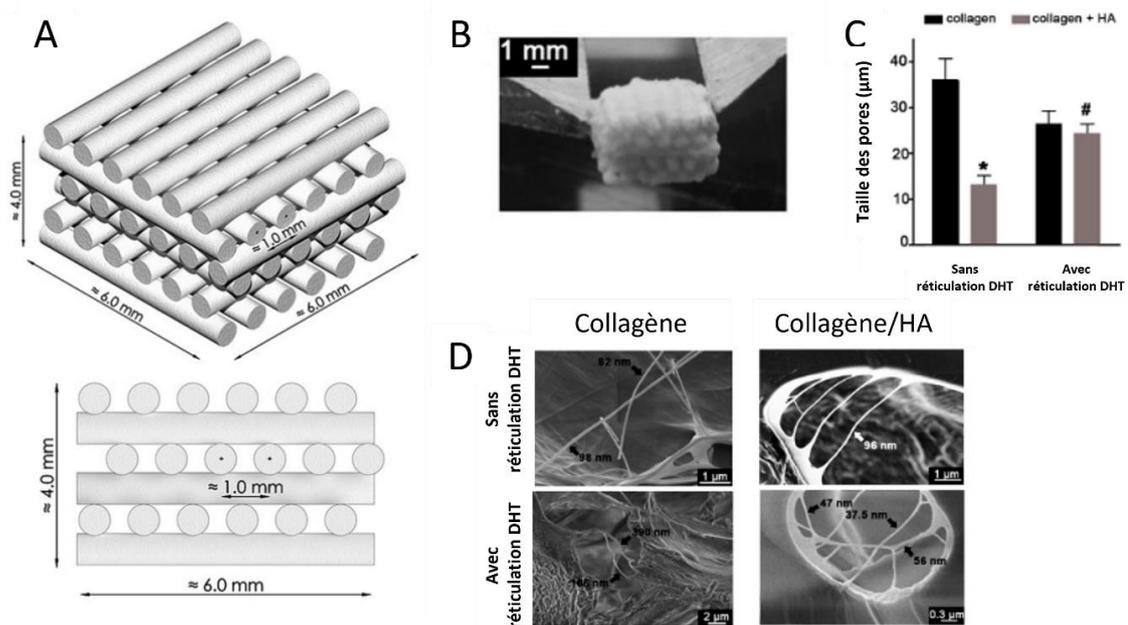


Figure 61 : (A) Modélisation de la succession des couches à imprimer et des dimensions de l'hydrogels, (B) Photo macroscopique de l'hydrogel sur 6 couches, (C) Distribution en taille des pores en fonction de la composition de l'encre et du procédé utilisé, (D) Images de MEB des réseaux fibrillaires générés (Bavaresco et al., 2020).

Pour cela, une encre de collagène (60 mg.mL^{-1}) et d'acide hyaluronique (6 mg.mL^{-1}) avec un ratio 10 pour 1 à pH 4 a été formulée puis imprimée. A la suite de l'impression, ils ont procédé à la lyophilisation de ces hydrogels pour générer des éponges. Enfin, les hydrogels ont subi une réticulation déshydrothermale (DHT) afin d'étudier son impact sur leur structure. La réticulation

déshydrothermale est un procédé lors duquel l'hydrogel est chauffé à une certaine température dans le vide afin de retirer des molécules d'eau. Il est beaucoup utilisé sur le collagène car il permet d'augmenter les réticulations physiques dans le réseau. En le déshydratant, des réactions de condensations entre résidus basiques et acides du collagène ont lieu laissant apparaître de nouvelles liaisons amide-amide. Cela permet de renforcer les hydrogels de collagène via des conditions moins cytotoxiques pour les cellules. Les construits obtenus sont présentés en Figure 61(B).

Comme observé en Figure 61(C), les hydrogels contenant de l'acide hyaluronique avaient des pores plus petits que ceux ne contenant que du collagène. Ceci s'explique par le recouvrement du réseau fibrillaire de collagène par ce dernier. De plus, l'aspect fibrillaire était présent pour chaque condition comme visualisé en MEB (Figure 61(D)).

Enfin l'adhérence cellulaire a pu être étudiée par marquage au DAPI et à la phalloïdine. Les construits générés par réticulation déshydrothermale se sont avérés avoir une bonne bioactivité. En effet, l'adhérence cellulaire ainsi que la prolifération étaient bonnes même si elles sont tout de même affectées par le procédé de réticulation déshydrothermale. Enfin ce procédé permet également d'améliorer les propriétés élastiques des construits cellularisés.

Différemment, Schwab et *al* ont cherché à développer des construits hybrides orientés par remontée de pH et réticulation enzymatique (A. Schwab et al., 2020). Pour cela, l'acide hyaluronique est fonctionnalisé avec de la tyramine et mélangé avec des cellules souches mésenchymateuses, de la HRP et du H₂O₂ pour pré-réticuler l'HA et encapsuler les cellules. En parallèle du collagène de type I est neutralisé à pH7 pour le pré-fibriller. Une fois ces deux pré-réticulation effectuées à froid pour ralentir les cinétiques de gélification, les deux encres sont mélangées afin de donner la bioencre imprimable.

La formulation est faite à un ratio collagène/THA de 1/5 et le diamètre de l'aiguille utilisé est de 1,36mm. La photoréticulation a été conduite à 515 nm. En parallèle, la même bioencre a été mise en forme par moulage sans extrusion afin d'étudier l'impact de l'extrusion sur l'orientation et la cytotoxicité des construits. Ceux imprimés par extrusion se sont avérés être orientés le long des filaments d'extrusion comme montré par génération de seconde harmonique (SHG) sans cellules en Figure 62(A).

De plus, par un marquage d'immunofluorescence avec du DAPI et de la phalloïdine à jour 6, il a été démontré que pour les construits imprimés en 3D et orientés, les cellules étaient également alignées au bout de 6 jours de culture (Figure 62(C)). Enfin le LIVE/DEAD montre que la cytotoxicité de ces hydrogels est moindre même si elle est légèrement plus importante pour

les hydrogels mixtes (Figure 62(B)). En conclusion, ils sont parvenus à générer des construits orientés par pré-neutralisation à froid des deux biopolymères pré-impression tout en ayant une adhérence, un alignement et une viabilité cellulaires bonnes.

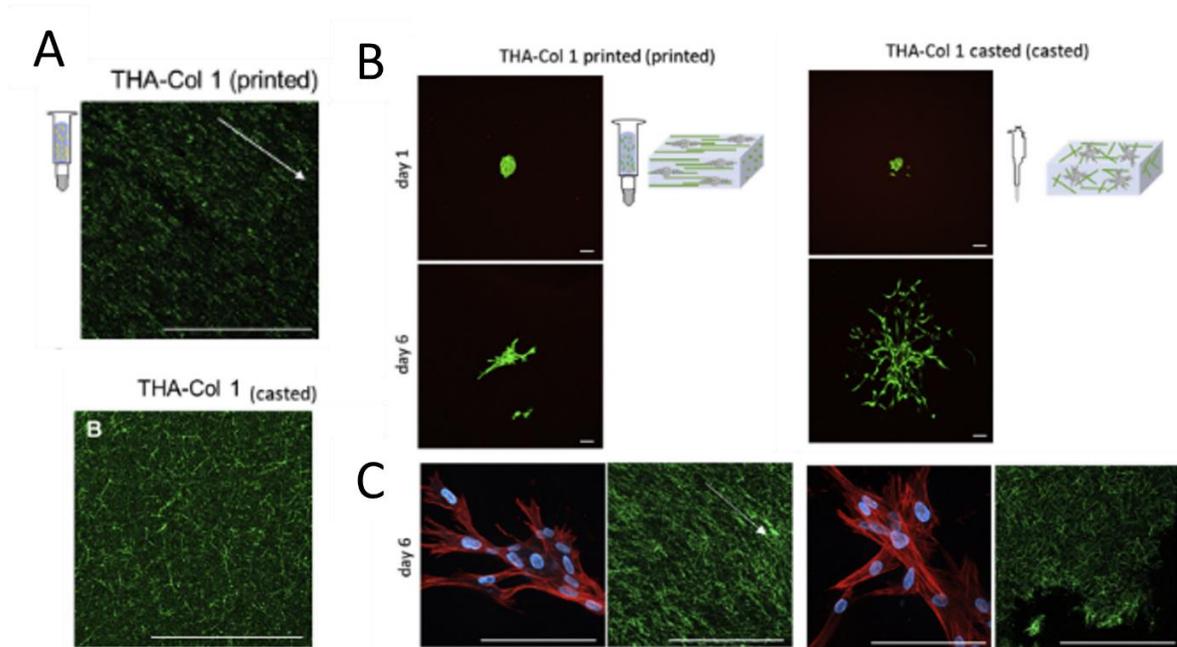


Figure 62 : (A) Observation de l'alignement du collagène par SHG pour les hydrogels moulés et imprimés, (B) Live/Dead à jour 1 et 6 pour les deux types de mise en forme et (C) Morphologie et alignement des cellules observés à jour 6 selon le procédé (A. Schwab et al., 2020).

Objectifs de thèse

L'Annulus Fibrosus est un tissu méconnu dont l'architecture est complexe. A ce jour, aucun modèle n'arrive à mimer à la fois ses propriétés physiques et biochimiques. Pourtant de nombreux modèles ont vu le jour. Les polymères synthétiques permettent de mimer les propriétés physiques du tissu natif mais pas l'environnement biochimique. A contrario, les biopolymères permettent de reproduire les interactions biochimiques du tissu mais les propriétés physiques atteintes sont bien en dessous de celles du tissu natif. Il y a donc nécessité de développer un modèle qui puisse reproduire l'ensemble des propriétés de l'Annulus Fibrosus. Ce travail de thèse a donc pour problématique :

« Est-il possible de développer un modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus reproduisant à la fois les propriétés physiques et biochimiques du tissu natif ? »

Afin de répondre à cette problématique, nous avons défini les critères principaux qui devront être rassemblés dans ce nouveau modèle *in vitro*. L'environnement biochimique créé doit ressembler à celui de l'AF c'est-à-dire composé à la fois de collagène de type I et de glycosaminoglycanes comme l'acide hyaluronique. Ainsi, les cellules ressentiront des signaux similaires à ceux de l'AF. Notre matériau devra également être constitué de lamelles anisotropes de 300 μm d'épaisseur tout comme c'est le cas dans l'AF. Les propriétés physiques du tissu devront être mimées. Parmi celles-ci, on considère à la fois les propriétés mécaniques mais également les propriétés d'hydratation. L'hydratation est à la fois assurée par la présence d'acide hyaluronique et par le ratio collagène : acide hyaluronique de 4 :1. Enfin, ce matériau devra permettre à des cellules d'AF de survivre confinées entre deux lamelles. Si tous ces critères sont atteints, ce matériau pourra être validés comme nouveau modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus.

Pour développer un tel matériau, trois objectifs devront être atteints (Figure 63).

Le premier objectif de cette thèse consistera à combiner l'acide hyaluronique et le collagène pour obtenir des formulations homogènes. En effet, l'un des problèmes lorsque ces deux biopolymères sont mélangés est leur forte interaction. Le collagène étant chargé positivement et l'acide hyaluronique négativement, des interactions électrostatiques sont responsables de la formation de complexes polyioniques lorsqu'ils sont mélangés. La présence de ces complexes ne permet pas d'obtenir des formulations homogènes en termes de propriétés

structurales, mécaniques et thermiques. C'est pourquoi une étude physicochimique sera conduite afin de trouver des conditions physico chimiques adéquates pour lesquelles un mélange homogène peut être obtenu avec inhibition des phénomènes de complexation. De plus, ces conditions devront permettre de générer des hydrogels collagène/acide hyaluroniques homogènes avec des propriétés physiques optimales.

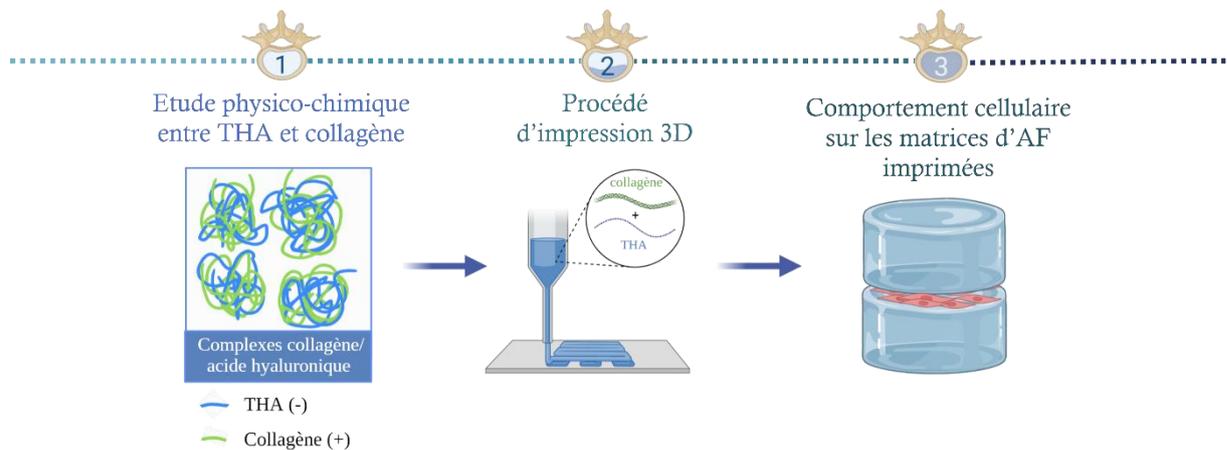


Figure 63 : Les trois objectifs à atteindre pour développer un nouveau modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus, créé à l'aide de BioRender.

Le second objectif sera de générer des hydrogels collagène/acide hyaluronique non cellularisés anisotropes. Plusieurs techniques peuvent être utilisées en ingénierie tissulaire pour générer de l'anisotropie dans des hydrogels. L'impression 3D par extrusion sera utilisée pour sa capacité à produire des structures anisotropes avec une bonne résolution et ceci sans porosité. Une encre dense mimant les caractéristiques biochimiques de l'AF devra donc être formulée dans un premier temps. Cette encre devra être composée de collagène et d'acide hyaluronique à un ratio 4 :1 et devra présenter une bonne imprimabilité. Celle-ci pourra alors être mise en forme par impression 3D pour produire des lamelles de collagène fibrillaire dense d'environ 300 μm d'épaisseur et anisotropes comme dans le tissu natif.

Enfin, le dernier objectif de cette thèse sera d'étudier la bioactivité de ce matériau sur les cellules. Les cellules d'AF étant une ressource rare, des fibroblastes seront utilisés puisqu'il s'agit des cellules qui leur sont similaires. La survie et le comportement cellulaire seront évalués dans un premier temps au-dessus d'une lamelle puis dans un second temps en confinement entre deux lamelles. Si les cellules sont adhérentes, survivent, sont allongées et prolifèrent, cela signifiera que notre matériau est un bon support cellulaire. Par conséquent, le modèle d'Annulus Fibrosus pourra être validé.

Matériel & Méthodes

Résumé

Ce chapitre s'intéressera aux techniques expérimentales mises en œuvre lors de cette thèse.

Dans un premier temps, la production des deux biopolymères, collagène et acide hyaluronique, sera décrite. Leurs conditions d'assemblage seront ensuite explicitées ainsi que leur mise en œuvre par impression 3D.

Dans un second temps, les outils de caractérisation utilisés seront scindés en deux catégories :

- Méthodes pour l'analyse des propriétés physicochimiques des matériaux générés. Celles-ci seront réparties entre évaluation structurale, mécanique et thermique des matériaux.
 - Méthodes pour évaluer la viabilité cellulaire de fibroblastes au contact des matériaux synthétisés. L'activité métabolique, la prolifération ainsi que la morphologie des cellules seront étudiées.
-

I. Le collagène de Type I

1. Extraction et purification du collagène

Le collagène commercial étant cher, nous l'avons extrait au laboratoire à partir de queues de rats. Les queues proviennent de jeunes rats Wistar n'ayant subi aucun traitement. De ces queues sont extraits les tendons riches en collagène de type I. Avec l'âge, les tendons sont de plus en plus réticulés empêchant ainsi l'extraction du collagène. Pour cette raison, les queues utilisées proviennent de jeunes rats âgés de moins de 4 mois. Ainsi, il est assez facile de dissocier les tendons en conditions acides pour en libérer les triples hélices de collagène. De manière générale, suite à une extraction à partir de 50 queues de rats, on obtient environ 2 L de collagène à 5 mg.mL⁻¹.

Afin d'obtenir un collagène pur et stérile, l'extraction est conduite sous un poste de sécurité microbiologique (PSM). De plus, le collagène se dénaturant autour de 37°C en solution, il faut impérativement contrôler la température notamment lors des agitations afin de ne pas le dénaturer en gélatine. La dénaturation du collagène en gélatine étant irréversible, elle est synonyme d'extraction raté.

Plusieurs techniques d'extraction du collagène ont été développées (Blidi et al., 2021; "Collagen extraction process - ProQuest," n.d.; Coppola et al., 2020; Matinong et al., 2022). Celle que nous utilisons au LCMCP se base sur la solubilisation du collagène puis sa purification par précipitation (Gobeaux, n.d.). Pour cela, une fois décongelées, les queues sont découpées par tronçons de 1cm en fracturant les vertèbres caudales afin d'en extraire les tendons depuis le bout de la queue (Figure 64). Les faisceaux de tendons sont collectés et lavés dans du PBS 1X afin d'éliminer les impuretés comme les poils restants et le sang. Ensuite, une alternance de courtes centrifugations (5500 rpm à 4°C pendant 5 min) et de lavages au PBS est effectué jusqu'à ce que le surnageant soit transparent.

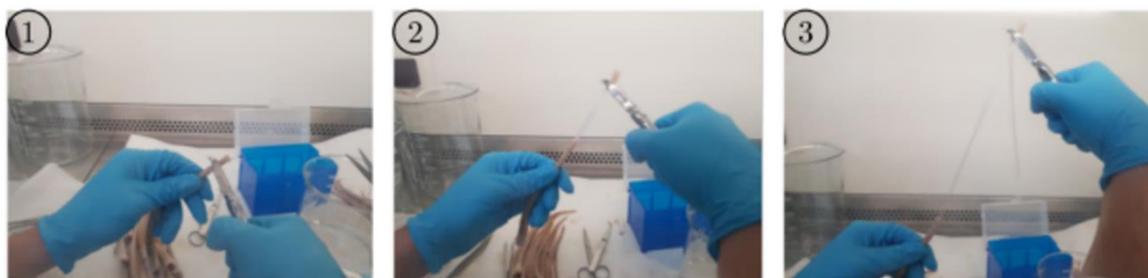


Figure 64 : Extraction des tendons depuis la queue de rat.

A ce stade, il peut rester des cellules et de l'albumine. C'est pourquoi un lavage au NaCl 4 M est effectué. Celui-ci a pour but de lyser les cellules résiduelles par choc osmotique et de faire

précipiter l'albumine. Une fois centrifugés, les tendons sont une nouvelle fois lavés au PBS 1X trois fois 5 min intercalées par des courtes centrifugations afin d'éliminer tous les sels et les résidus cellulaires restants.

Il s'en suit l'étape de la solubilisation des tendons. Pour cela, les tendons sont immergés dans 1L d'acide acétique à 0,5 M (pH de 2,5) et sont mis à agiter pendant 24h pour obtenir une complète solubilisation. Après 24 h, la solution obtenue est centrifugée pendant 20 min à 5500 rpm à 4°C dans le but d'éliminer les gros agrégats résiduels. Ces agrégats peuvent être des débris résiduels et majoritairement des faisceaux de fibres de collagène non dissout en raison de leur degré de réticulation trop élevé. La solution récupérée est ensuite purifiée par précipitation du collagène en présence de sels. Il existe une concentration critique autour de 0,7 M en sel pour laquelle le collagène précipite. C'est pourquoi du NaCl à 4 M est ajouté goutte à goutte sous agitation jusqu'à atteindre une concentration finale de 0,7 M. Cette concentration permet de précipiter le collagène spécifiquement puisque les protéines globulaires précipitent elles à 1 M NaCl. Enfin, les précipités de collagène (culots) sont collectés à l'issue d'une centrifugation à 4°C pendant 20 min avec une vitesse de 5500 rpm.

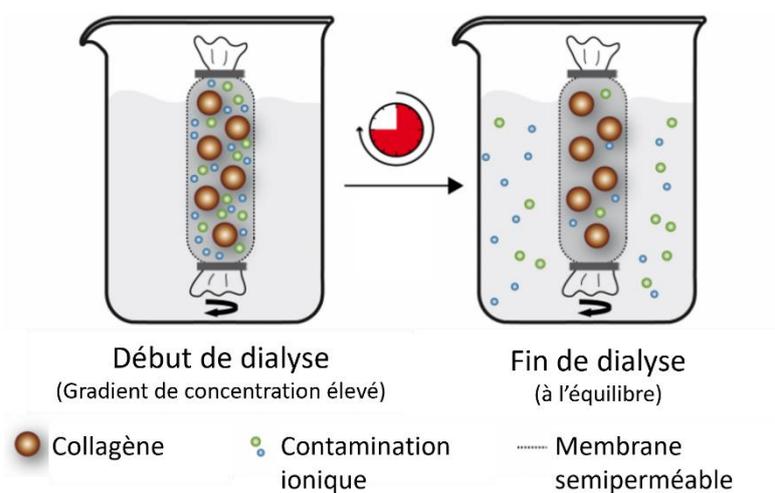


Figure 65 : Schéma expliquant le principe d'équilibre osmotique durant la dialyse traduit de (Scienova, n.d.).

Les culots sont dissouts dans de l'acide acétique à 0,5 M pendant 24 h jusqu'à l'obtention d'une solution homogène. Ensuite une dialyse est effectuée sur 3 jours contre de l'acide acétique 0,5 M pour éliminer la présence de NaCl dans la solution. Les membranes de dialyse utilisées ont un cut-off de 14 kDa. Le solvant de dialyse doit être changé deux fois par jours pour forcer les échanges et éliminer tout le sel. En effet, la dialyse repose sur le phénomène d'équilibre osmotique. Des échanges se font à travers la membrane afin que la concentration en sel à l'extérieur du boudin de dialyse s'équilibre pour être la même qu'à l'intérieur de celui-ci (Figure 65). Ainsi, à force de changer le bain de dialyse, la concentration en sel devient nulle. A l'issue de la dialyse, pour éliminer les derniers agrégats de la solution, des centrifugations à haute vitesse

(55000 rpm) sont effectuées à 10°C, pendant 4 h. La solution de collagène obtenue peut être conservée à long terme à 4°C sans dénaturer celui-ci.

2. Electrophorèse du collagène

Afin de s'assurer de la qualité du collagène extrait, sa pureté est évaluée par électrophorèse sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes et réductrices-(SDS-PAGE). Le principe repose sur la capacité des chaînes polypeptidiques liées au SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) à migrer dans un gel de polyacrylamide sous l'action d'un champ électrique. Les molécules de SDS vont dénaturer les protéines et vont s'associer à leurs parties hydrophobes. Plus la chaîne polypeptidique est grande, plus il y a de molécules de SDS qui s'y associent. La dénaturation des protéines dont le collagène fait partie est effectuée dans du tampon d'échantillon contenant du SDS et du β -mercaptoéthanol afin de réduire les ponts disulfures. En chauffant à 90°C pendant 5min puis en refroidissant brusquement dans la glace, la dénaturation est totale. Ceci a aussi pour conséquence de supprimer toutes les structures tertiaires des protéines. Les protéines sont sous forme de chaînes polypeptidiques.

Le gel utilisé dispose de deux zones : une zone avec des puits où les échantillons sont déposés (gel de concentration, pH 6, gel 2,5%) qui permet de concentrer les polypeptides et un gel de migration (pH 8,8 gel 10%) permettant la séparation en fonction de leur poids moléculaire apparent (Figure 66). Les protéines dénaturées sont chargées dans des puits du gel de concentration. Ensuite les gels sont positionnés dans du tampon Laemmli.

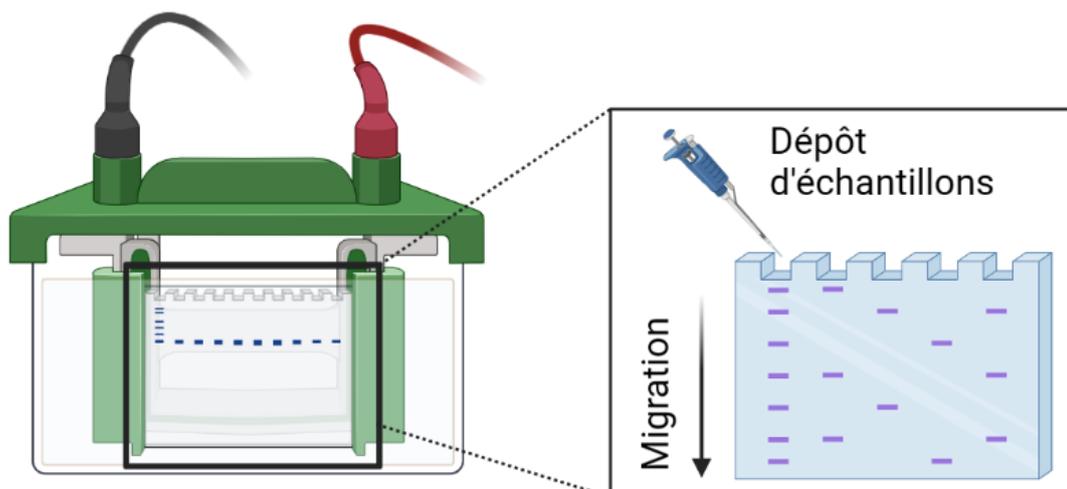


Figure 66 : Schéma d'un gel d'électrophorèse avec la zone de dépôt des échantillons dans les puits et la zone de migration, dessiné à l'aide de BioRender.

Généralement, un marqueur de poids moléculaire protéique et un contrôle de collagène commercial sont déposés afin de les faire migrer en simultanée du collagène.

La première étape qui permet de concentrer les échantillons dans le gel de concentration se fait à 70V. Une fois la migration dans le gel de concentration effectuée, la tension électrique est augmentée à 160V afin d'amorcer la migration. Au cours de la migration, les protéines sont séparées en fonction de leur poids moléculaire apparent. Les protéines les plus grosses sont retenues par le gel et restent par conséquent en haut de celui-ci alors que les plus petites ne sont pas retenues et migrent plus bas. Lors de l'électrophorèse, quatre bandes caractéristiques du collagène I doivent apparaître afin qu'il soit considéré comme de bonne qualité : deux bandes correspondant aux chaînes α_1 et α_2 (entre 100 et 150 kDa) composant la triple hélice et deux bandes β_1 et β_2 correspondant à leurs dimères (supérieur à 225 kDa), c'est-à-dire la triple hélice partiellement dénaturée. Si d'autres bandes venaient à apparaître, cela signifierait qu'il reste des impuretés dans le collagène extrait. Après migration, les gels sont colorés pendant une heure au bleu de Comassie afin de marquer les polypeptides puis ils sont décolorés avec un mélange éthanol 40 % (v/v) suivi de 10 % (v/v) pendant 4 heures pour révéler les bandes protéiques. Enfin, les gels décolorés sont réhydratés dans de l'eau stérile. Les différentes bandes sont détectées et leur poids moléculaire déterminé par comparaison au marqueur de poids moléculaire.

3. Dosage d'hydroxyproline

La concentration en collagène dans les solutions obtenues après extraction doit être déterminée. Celle-ci est effectuée par dosage de l'hydroxyproline présente dans le collagène (Bergman and Loxley, 1963). D'après la littérature, les triples hélices de collagène de type I sont composées de 13% en masse d'hydroxyproline (Gobeaux, n.d.). L'hydroxyproline peut être extraite du collagène par hydrolyse acide de celui-ci. Il s'agit donc d'extraire l'hydroxyproline puis de la quantifier pour remonter à la concentration du collagène en solution.

Pour cela, 50 μ L de collagène pesé avec une balance de précision sont hydrolysés dans 50 μ L d'acide chlorhydrique à 37% en incubant le tout à 108°C toute la nuit. Il peut être judicieux d'effectuer un contrôle avec du collagène commercial dont la concentration est connue et renseignée par le fournisseur. Dans notre cas, il s'agit d'une solution de collagène à 5 mg.mL⁻¹ fourni par Symatèse. A l'issue de cette nuit d'hydrolyse, les chaînes polypeptidiques sont hydrolysées en un pool d'acides aminés. Afin d'évaporer l'acide chlorhydrique, les tubes sont laissés ouverts pendant 2 h dans l'étuve. Une fois sec, le culot est resuspendu dans 1mL d'eau

milliQ et le dosage est réalisé avec trois prise d'essais correspondant aux dilutions : 1/10, 1/20 et 1/40.

Tableau 2 : Différentes étapes du dosage de l'hydroxyproline dans le collagène.

	Gamme étalon						Echantillon			Contrôle de collagène		
Hydroxyproline ou échantillon (µL)	0	40	80	100	140	280	10	20	40	10	20	40
Eau milliQ	400	360	320	300	260	120	390	380	360	390	380	360
Concentration (µg/mL)	0	0,8	1,6	2	2,8	5,6						
Facteur de dilution	0	1/10	1/5	1/3	7/20	7/10	1/40	1/20	1/10	1/40	1/20	1/10
Chloramine T	200 µL à température ambiante pendant 20 min											
Acide perchlorique	200 µL à température ambiante pendant 20 min											
DMBA	200 µL à 60° pendant 20 min											

En parallèle, une courbe d'étalonnage est réalisée en utilisant une solution mère d'hydroxyproline à 20 µg.mL⁻¹. Les dilutions effectuées pour la courbes d'étalonnage figurent sur le Tableau 2. La première étape est d'oxyder l'hydroxyproline à l'aide de Chloramine-T pendant 20 minutes. Ensuite, l'oxydation est stoppée par l'ajout d'acide perchlorique à 3,15 mol.L⁻¹. Une fois oxydée, l'hydroxyproline peut former un complexe coloré rose avec le 2,4-diméthoxybenzaldéhyde (DMBA). Une fois ce dernier ajouté, le tout est incubé à 60°C afin d'accélérer la cinétique de complexation. Après 20 minutes d'incubation, un refroidissement est effectué dans un bain de glace et l'absorbance de chaque échantillon est mesurée à 557 nm grâce à un spectrophotomètre multiplaques (Varioskan LUX, Thermofisher). Grâce à l'absorbance mesurée pour chaque prise d'essai et la courbe étalon, la quantité d'hydroxyproline contenue dans chaque prise d'essai est déterminée, ce qui nous permet de remonter à la concentration du collagène de la solution initiale à l'aide de la formule ci-dessous.

$$[\text{collagène}] \left(\frac{\text{mg}}{\text{mL}} \right) = \frac{\text{hydroxyproline mesurée}}{\text{volume de prise d'essai}} \times \frac{\text{Facteur de dilution}}{\text{Masse de l'échantillon}} \times \frac{100}{13}$$

In fine, on obtient une concentration en mg.mL⁻¹. Le rapport 100/13 correspond au pourcentage d'hydroxyproline présent dans les triples hélices de collagène et la masse de collagène pesée initialement intervient afin de prendre en compte le volume initial.

4. Fibrillogénèse et gélification du collagène

La fibrillogénèse et la gélification du collagène est effectuée par neutralisation d'une solution de triples hélices de collagène comme vu précédemment. Pour cela, deux procédés sont

utilisés dans ce projet. Soit la fibrillogénèse a été conduite sous vapeurs d'ammoniaque soit elle a été conduite dans un bain de PBS 2X avec de la soude.

4.1. Fibrillogénèse et gélification du collagène lors de l'étude physicochimique

L'ammoniaque a été utilisé dans l'étude physicochimique pour sa cinétique rapide de gélification. Pour cela, la solution de collagène est déposée dans un moule et le tout est placé dans un dessiccateur fermé où un cristalliseur contenant une solution d'hydroxyde d'ammonium concentrée à 28% est mis dans sa partie basse. Le montage est présenté ci-dessous en Figure 67. La solution concentrée diffuse des vapeurs d'ammoniaque dans le dessiccateur jusqu'à atteindre un équilibre de concentration entre la phase gaz et la phase liquide. Au contact de la solution de collagène, les vapeurs d'ammoniaque se dissolvent et la fibrillogénèse et la gélification du collagène sont amorcées. Le blanchiment de la solution intervient au bout de 2h de mise en contact montrant sa gélification. Le temps de fibrillation par les vapeurs d'ammoniaque a été fixé à 24h dans le cadre du projet. Après 24h, les gels ont un pH autour de 11. Il suffit alors de les transférer dans un bécher de 1L et de les rincer abondamment au PBS 1X jusqu'à ce que le pH soit stabilisé à 7.

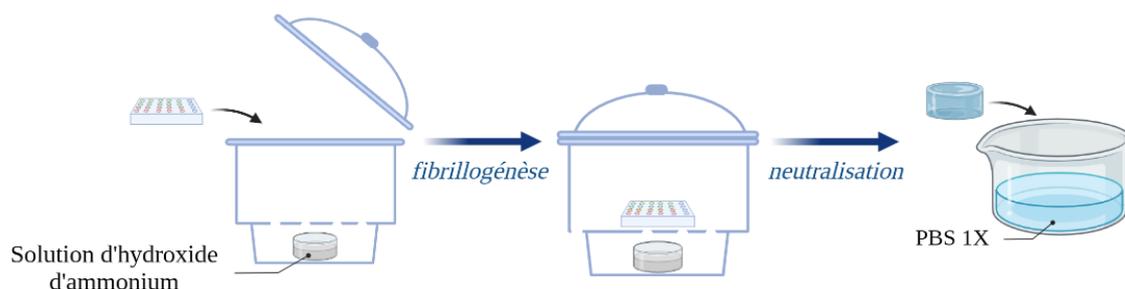


Figure 67 : Schéma du procédé de gélification des solutions de collagène sous vapeurs d'ammoniaque dans un dessiccateur, dessiné à l'aide de BioRender.

4.2. Fibrillogénèse et gélification du collagène lors de l'impression 3D

Pour l'impression 3D et la cellularisation des hydrogels, il a fallu utiliser un autre procédé en raison du pH trop basique des vapeurs d'ammoniaque. C'est pourquoi les hydrogels de collagène ont été imprimés dans un bain de PBS avec de la soude. Plusieurs concentrations ont été testées mais la solution optimale était faite dans du PBS 2X avec du NaOH à une concentration finale de 10^{-3} mol.L⁻¹. Pour un tel bain utilisé en impression 3D, les filaments de collagène commencent à blanchir au bout de 3 minutes ce qui permet d'obtenir une bonne rétention de forme.

5. Préparation des solutions stocks de collagène par dialyse

Afin d'obtenir des solutions stock de collagène au pH désirés, une dialyse est nécessaire. Ainsi des dialyses avec la solution extraite ont été effectués contre des solutions d'HCl ou d'acide acétique selon l'expérience entreprise. De manière générale, la dialyse est conduite contre le solvant à la concentration désirée pendant 4 jours. Le bain de dialyse est changé deux fois par jour. Pour l'étude physicochimique, le collagène a été dialysé contre du HCl dans une gamme de concentration comprise entre 10^{-1} et 10^{-5} M. Les pH étaient compris entre 1 et 5. Pour l'impression 3D et la cellularisation, la dialyse a été faite contre de l'acide acétique à 17 mM pour atteindre un pH 4,5.

6. Concentration du collagène par évaporation

Afin de produire des hydrogels denses pour l'impression 3D, il faut au préalable concentrer la solution stock de collagène au pH précédemment fixé. En effet, si la dialyse était faite après concentration, le collagène pourrait être dilué ne conduisant pas à la bonne concentration finale.

Concernant la concentration, on procède par évaporation. Pour cela, un cristalliseur est préalablement stérilisé sous un poste de sécurité microbiologique. Après avoir été pesé à vide, le collagène y est ajouté puis la masse du cristalliseur rempli de collagène est notée. La masse totale du cristalliseur est évaluée deux fois par jour et le collagène doit être remué régulièrement afin que la concentration soit homogène. La concentration du collagène est suivie grâce à la formule suivante qui permet de la calculer à l'instant t par rapport au moment initial appelé t_0 :

$$[\text{collagène}]_t = \frac{(\text{masse cristalliseur plein}_{t_0} - \text{masse cristalliseur vide})}{\text{masse cristalliseur plein}_t - \text{masse cristalliseur vide}} \times [\text{collagène}]_{t_0}$$

L'évaporation du collagène est effectuée jusqu'à ce que la concentration de 40 mg.mL^{-1} soit atteinte. Cette solution servira de solution stock et interviendra dans la formulation de l'encre à imprimer pour former des hydrogels denses.

II. L'acide hyaluronique fonctionnalisé à la Tyramine (THA)

1. Fonctionnalisation de l'acide hyaluronique

Du chlorhydrate de Tyramine (Sigma Aldrich, St Louis, USA) a été greffé sur du hyaluronate de sodium (318kDa $\text{Đ}=\text{Mw}/\text{Mn}= 1,86$) provenant de Streptococcus equi (Contipro

Biotech s.r.o, République tchèque). La fonctionnalisation a été conduite par réaction d'amidation entre l'acide carboxylique du HA et les amines du chlorhydrate de Tyramine. L'activateur des acides carboxyliques du HA est le chlorure de 4-(4,6-diméthoxy-1,3,5-triazine-2-yl)-4-méthylmorpholinium (DMTMM) (TCI Europe N.V, Tokyo, Japon).

Après dissolution du hyaluronate de sodium (2 g) dans de l'eau milliQ (200 mL) à 37°C dans un bain-marie, le DMTM (1.384 g) est ajouté. En parallèle, le chlorhydrate de tyramine (868 mg) est dissout dans de l'eau milliQ (5 mL). Une fois dissout, le chlorhydrate de tyramine est ajouté dans le milieu réactionnel. L'agitation est maintenue pendant 24h à 37°C.

A la fin de la réaction, la purification de l'HA-Tyramine (THA) se fait par précipitation avec du NaCl. Tout d'abord, le THA brut est précipité en ajoutant 32 mL d'une solution de NaCl saturée et en agitant vigoureusement avec une spatule pour éviter la formation de gros agglomérats. Des lavages successifs à l'éthanol (600 mL) sont ensuite conduits. Le premier est fait avec de l'éthanol à 96% puis deux autres lavages à l'éthanol absolu. Afin de sécher la poudre de THA, le précipité est filtré sur filtre de Gooch de porosité 3 (16-40 µm) puis séché pendant 48h à 40°C.

Pour détecter la présence de sels résiduels, un test aux nitrates d'argent à 0,1 M est effectué. Le HA est fonctionnalisé avec la tyramine de manière reproductible à un degré de substitution de 6%. Ce dernier est calculé suite à une mesure de spectroscopie UV-visible d'une solution de THA diluée à 0,1% en masse lue à 275 nm. Pour cela, 10 mg de THA sont dissouts dans 1mL d'eau milliQ. Une seconde dilution au 1/10 de 500 µL de la solution de THA dans 4,5 mL d'eau est effectuée. Enfin l'absorbance de la solution est mesurée avec un spectrophotomètre UV-vis-NIR Cary 500 (Agilent Technologies) à 275 nm. Les formules présentées ci-dessous permettent de calculer le degré de substitution molaire du THA (DS_{mol}) en quantifiant tout d'abord la concentration de tyramine contenue dans l'échantillon dissout.

$$(1) \quad [Tyramine](\mu g. mL^{-1}) = \frac{(A_{\text{échantillon}} - A_{\text{étalonnage 0}})}{\text{pente}_{\text{courbe étalonnage}}}$$

$$(2) \quad [Tyramine](mM) = \frac{[Tyramine](\mu g. mL^{-1})}{M_w \text{ Tyramine}}$$

$$(3) \quad DS_{mol}(\%) = \frac{[Tyramine](mM) \times M_w \text{ HA}}{[\text{échantillon dissout}]_{\text{massique}} - [Tyramine](mM) \times (M_w \text{ 100\%} - M_w \text{ HA})} \times 100$$

Avec la masse molaire du chlorure de tyramine $M_w \text{ Tyramine} = 173,64 \text{ g/mol}$

la masse molaire du HA non substitué $M_{w\text{HA}} = 401,3 \text{ g/mol}$

la masse molaire du HA complètement substitué $M_{w\text{100\%}} = 498,44 \text{ g/mol}$

la concentration massique d'échantillon dissout [échantillon dissout] $_{\text{massique}} = 1 \text{ mg.mL}^{-1}$

Enfin la pureté du THA est validée par RMN ^1H où les protons du cycle aromatique de la tyramine peuvent être clairement identifiés comme présenté en Figure 68.

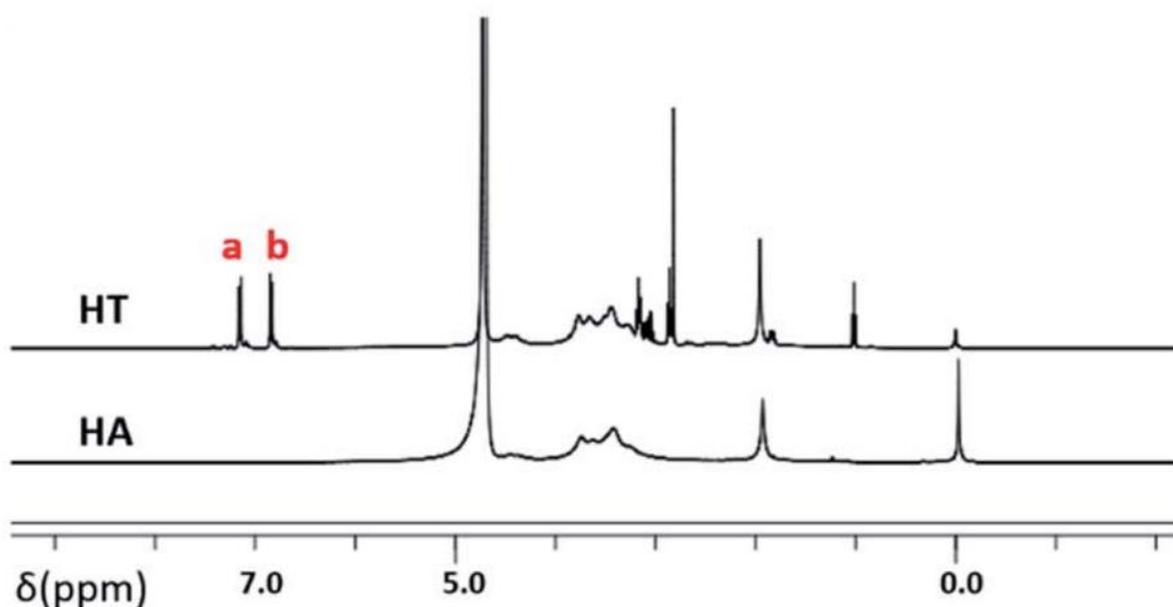


Figure 68 : Spectre RMN ^1H du THA et du contrôle de HA pur pour contrôler l'efficacité du greffage et la pureté du produit (Wang et al., 2020).

Le THA est ensuite conservé à 4°C à l'abri de la lumière sous la forme d'une poudre blanche. Pour l'étude physicochimique, des solutions stocks de THA à 3% en masse dans de l'eau sont préparées. Pour l'impression 3D et la cellularisation, des solutions stock à 3% en masse sont préparées dans du DMEM avec ou sans éosine selon l'expérience conduite.

2. Réticulations chimiques de l'acide hyaluronique

La réticulation chimique de l'acide hyaluronique a été conduite par photoréticulation ou par voie enzymatique. Trois types de réticulation ont été envisagés : les systèmes HRP/ H_2O_2 , éosine Y/lumière verte et riboflavine/UV.

2.1. Réticulation enzymatique avec la peroxydase de Raifort (HRP) et le peroxyde d'hydrogène

Dans le cadre du système HRP/H₂O₂, la HRP (250 U/mg de chez Sigma Aldrich) est préparée à partir d'une solution stock à 50 U.mL⁻¹ et le H₂O₂ (stabilisé à 30% dans l'eau de chez Sigma Aldrich) à une concentration de 3%. Pour des gels de 1mL en volume, 30 µL de HRP ont été ajoutés post-fibrillation du collagène. La réticulation est activée par l'ajout de H₂O₂ à une concentration finale de 1,1 mM. Le H₂O₂ permet d'activer le cycle catalytique de la HRP selon le mécanisme expliqué en 1^{ère} partie du manuscrit. Après 40min de réticulation pour atteindre le plateau, les gels sont rincés puis analysés.

2.2. Photoréticulation en présence de riboflavine sous UV

Concernant la photoréticulation à la riboflavine, une solution stock de riboflavine à 2,5 mg.mL⁻¹ dans du PBS 1X a été préparée. Plusieurs concentrations et temps d'exposition aux UV ont été testés. Finalement, la riboflavine a été ajoutée à une concentration finale de 25 µg.mL⁻¹ aux hydrogels collagène/THA préalablement gélifiés puis ceux-ci ont été réticulés avec une lampe UV pendant 2h à une distance de 10cm. Une fois réticulés, les hydrogels sont lavés à l'eau avant leur analyse.

2.3. Photoréticulation en présence d'éosine Y et de lumière visible

Pour la photoréticulation à l'éosine Y, une solution stock d'éosine Y à 200 mg.mL⁻¹ diluée dans du DMSO est préparée. Une seconde dilution dans du PBS ou du DMEM selon l'expérience est effectuée pour atteindre une concentration finale de 20 mg.mL⁻¹.

Lors de l'étude physicochimique, l'éosine Y est ajoutée à une concentration finale de 0,2 mg.mL⁻¹ puis la photoréticulation est conduite pendant 40 minutes avec une source de lumière verte externe (lampe Eurolite LED IP FL-30 SMD) positionnée à 10cm en hauteur au-dessus de la surface du gel.

Lors de la synthèse d'hydrogels de collagène/THA par impression 3D, l'éosine Y est utilisée à une concentration finale de 0,1 mg.mL⁻¹ soit via un bain d'imprégnation soit directement dans l'encre collagène/THA formulée. La photoréticulation est conduite avec le module interne de l'imprimante 3D correspondant à une longueur d'onde de 520 nm.

Une fois réticulés, les hydrogels sont lavés à l'eau puis analysés.

III. Fabrication d'hydrogels collagène/THA

Pour chaque étude, les conditions de formation des composites ont été optimisées paramètre par paramètre. Toute l'optimisation est détaillée dans la partie résultats et discussion. Ici, nous ne considérons que les conditions optimales de formulation.

1. Préparation des hydrogels en phase diluée

Durant l'étude physicochimique, des interactions entre le THA et le collagène, les deux biopolymères ont été utilisés à une concentration de 4 mg.mL^{-1} et mélangés au ratio massique 1 :1. Le but étant d'étudier leurs interactions, le ratio 1 :1 s'avère être celui pour lequel les contacts entre THA et collagène sont les plus nombreux.

1.1. Les mélanges en solution

Les mélanges ont été réalisés à partir de solutions stock de collagène et de THA à des concentrations en HCl de 10^{-1} M , 10^{-2} M , 10^{-3} M , 10^{-4} M et 10^{-5} M . Les solutions collagène/THA ont été préparés en mélangeant $666 \mu\text{L}$ de collagène à une concentration de $6,6 \text{ mg.mL}^{-1}$ à $133 \mu\text{L}$ de THA à 3 % (w/v) en masse à l'aide d'une pipette à déplacement positif pour chaque concentration en HCl. Une seconde série d'échantillons a été préparée selon les mêmes conditions mais en ajoutant du NaCl à une concentration finale de 400 mM afin de faire varier la force ionique.

1.2. La fibrillogénèse et gélification du collagène dans les mélanges

Dans un second temps, $250 \mu\text{L}$ de ces solutions collagène/THA ont été versés dans des moules en ABS (acrylonitrile butadiène styrène) cylindriques de 8 mm de diamètre fabriqués grâce à une imprimante plastique Zortrax M200 Plus. Les hydrogels ont été produits en triplicats pour chaque condition afin d'évaluer la répétabilité du procédé. Une fois les moules remplis, ceux-ci sont mis dans un dessiccateur contenant des vapeurs d'ammoniaque et la fibrillogénèse du collagène est déclenchée pendant 24 h . Les gels sont ensuite lavés abondamment à l'eau milliQ jusqu'à retrouver un pH neutre puis la réticulation chimique du THA est effectuée soit avec de l'éosine Y soit avec de la HRP soit avec de la riboflavine comme vu précédemment.

2. Formulation de l'encre dense collagène/THA pour l'impression 3D

Pour générer un modèle cellularisé d'Annulus Fibrosus, des hydrogels denses ont été produits par impression 3D. Pour cela, il a fallu mélanger l'acide hyaluronique et le collagène en phase dense en présence de sel pour inhiber tout phénomène de complexation polyionique.

Après avoir dialysé la solution de collagène à 4 mg.mL^{-1} pour ajuster la concentration en acide acétique à 17 mM , du NaCl est ajouté et agité pendant 2 h pour obtenir une concentration finale de 20 mM . Une fois le sel mélangé de manière homogène, la solution de collagène est évaporée jusqu'à ce qu'une concentration de 40 mg.mL^{-1} en collagène et 200 mM en NaCl soient atteintes. Parallèlement, du NaCl est ajouté à une solution de THA à 30 mg.mL^{-1} pour obtenir une concentration en sel de 200 mM . Le collagène ($750 \text{ }\mu\text{L}$) et le THA ($250 \text{ }\mu\text{L}$) sont ensuite mélangés à un ratio collagène/THA de 4 :1 à l'aide d'une pipette à déplacement positif afin de mimer la composition de l'AF. Les concentrations en collagène et en THA finales sont respectivement de 30 mg.mL^{-1} et $7,5 \text{ mg.mL}^{-1}$. Selon l'expérience, de l'éosine est ajoutée directement dans l'encre ou dans le bain de fibrillation systématiquement à une concentration de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. L'encre formulée est finalement stockée dans des cartouches d'impression photorésistantes anti-UV à 4°C jusqu'à l'impression 3D.

IV. Impression 3D par extrusion

Afin d'imprimer des hydrogels collagène/THA adéquats, un modèle informatisé a été conçu via le logiciel Autodesk Fusion 360 (Figure 69(A)). Après avoir été exporté en fichier stl, ce modèle est directement utilisé par l'imprimante 3D afin de le trancher (Figure 69(B)). Le modèle développé dans ce projet est un carré de $1 \times 1 \text{ cm}$.

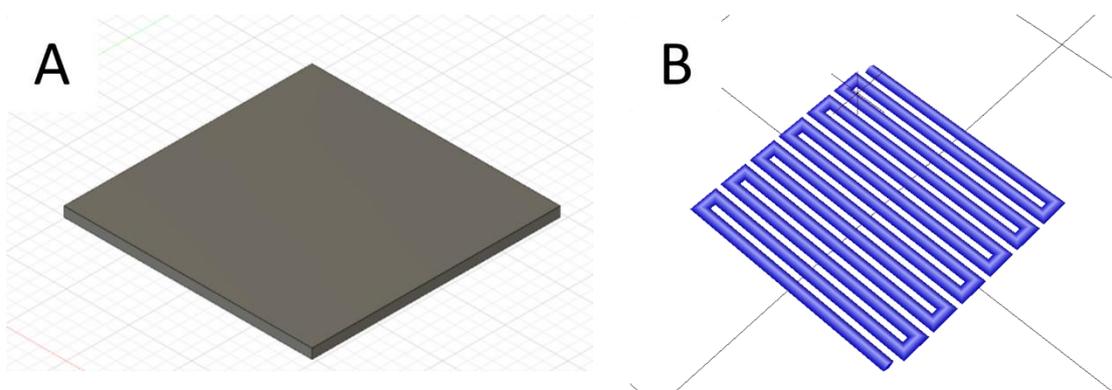


Figure 69 : Modèle d'impression de la première couche (A) généré sur Autodesk Fusion 360 puis (B) tranché à l'aide de Slic3r selon les mêmes paramètres que l'imprimante BioX CellInk.

Les hydrogels collagène/THA ont été imprimés selon le modèle présenté ci-dessus par extrusion avec l'imprimante 3D BioX de CellInk pour former des couches d'hydrogel (Figure 70(A)). Cette imprimante 3D est une extrudeuse capable de déposer de la matière en se déplaçant en x, en y et en z afin de générer un objet en trois dimensions. (Figure 70(B)).

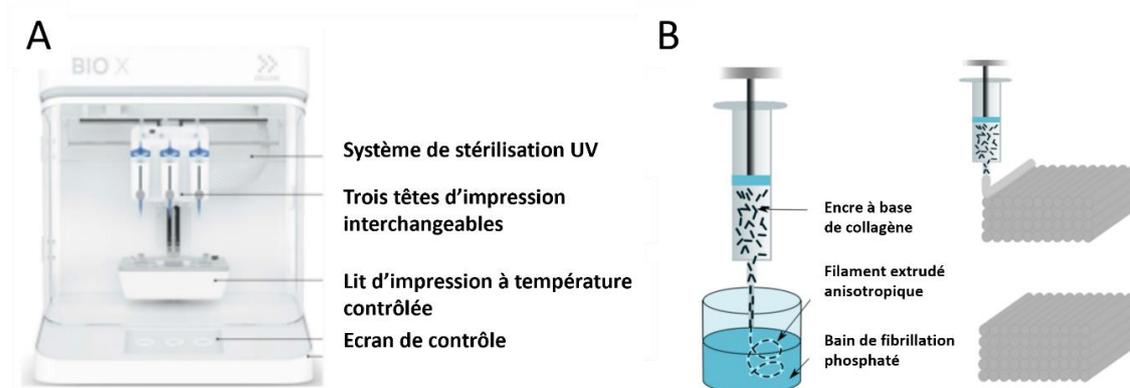


Figure 70 : (A) Photo de l'imprimante 3D BioX de CellInk et (B) Schéma montrant l'extrusion d'une encre de collagène dans un bain de PBS 5X pour gélifier instantanément post-impression (Camman, 2022).

Pour cela, une buse pneumatique contrôlée en température a été utilisée afin d'imprimer à froid sans dénaturer le collagène. La buse a été refroidie à 8°C alors que le plateau d'impression était à 11°C ; Une aiguille de 23 G a été utilisée équivalant à un diamètre interne de 0,33 mm. La calibration a été effectuée selon les recommandations du fournisseur et une stérilisation de la chambre aux UV a été effectuée avant chaque session d'impression sous une hotte à flux laminaire stérile.

Les paramètres d'impression ont été optimisés un à un que ce soit pour l'encre faite de pur collagène ou du mélange collagène/THA avec NaCl 200 mM. La vitesse d'impression a été optimisée en la faisant varier dans une gamme allant de 2 à 8 mm/s. La pression d'extrusion a été modifiée entre 70 et 100 kPa. Le bain de gélification a été modulé en force ionique allant d'une concentration en PBS de 1X à 5X. Enfin, le pourcentage de remplissage a été modulé entre 50 et 100% afin de sélectionner la condition pour laquelle les filaments se touchent sans se superposer pour former un hydrogel cohésif.

Une fois les paramètres d'impression des deux encres optimisés, la photoréticulation a également été optimisée en utilisant un module de photo-irradiation à 520 nm interne à l'imprimante 3D. L'utilisation de bain d'éosine ou d'éosine directement incluse dans l'encre a notamment été comparé. Pour l'encre de collagène et de THA, des cartouches anti-UV ont été requises afin d'incorporer un agent de photoréticulation, l'éosine Y, sans l'activer avant irradiation.

Afin de générer un sandwich cellularisé par impression 3D, c'est-à-dire des cellules cultivées entre deux couches collagène/THA imprimées, un second modèle informatique a été généré. Le problème principal de l'impression des sandwichs en deux temps est que la calibration de l'imprimante change entre les deux étapes d'impression. C'est pourquoi le modèle de la seconde couche est retranché de 1 mm de chaque côté du carré. Ainsi, malgré le décalage en x et y dû au changement de calibration, les deux couches se superposeront de manière effective. Le décalage en z est compensé par la re-calibration dans le puits en bas à gauche de la plaque prévue à cet effet. Le modèle a été pensé pour que la superposition des deux couches permette de générer un sandwich comme représenté en Figure 71. Pour cela, le centre de calibration doit être préalablement annoté au feutre par un point fin. Finalement, l'impression de la seconde couche se fait avec les mêmes paramètres d'impression que pour la première mais avec un décalage en z de 0,25 mm équivalant à la hauteur de la première couche. Le tapis cellulaire est négligeable d'où l'intercouche ajusté à la hauteur de la première couche.

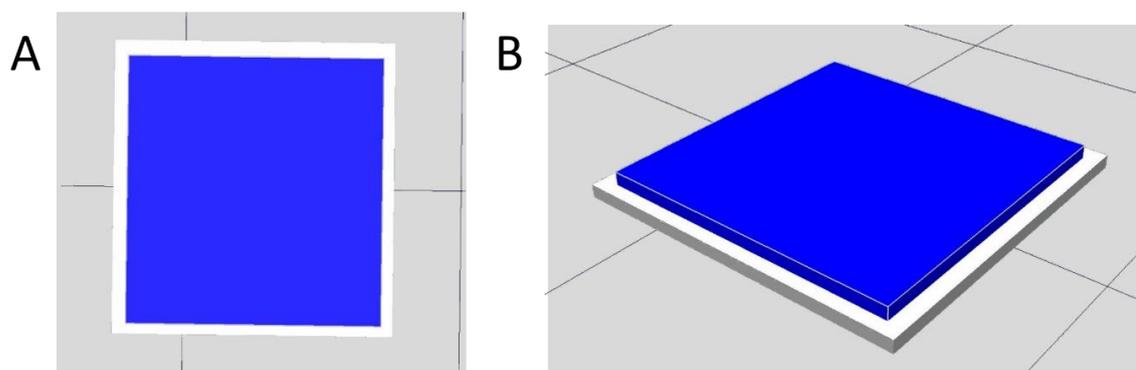


Figure 71 : Modèle généré via Autodesk pour imprimer la 2nde couche (A) vu d'en haut ou (B) vu en perspective.

V. Imprégnation post-impression 3D des hydrogels de collagène avec du THA

Une seconde stratégie pour générer des hydrogels collagène/THA a été d'imprimer du collagène pur en suivant la même procédure, suivi d'une imprégnation du gel de collagène avec du THA. Pour cela, l'encre de collagène à 30 mg.mL^{-1} dans 17mM d'acide acétique a été imprimée directement dans un bain de PBS 2X et $\text{NaOH } 10^{-3} \text{ M}$ dans une plaque de 12 puits. La gélification et fibrillogénèse du collagène ont été conduites pendant 30 minutes puis les hydrogels de collagène ont été imprégnés avec un bain composé d'éosine et de THA. Pour cela, $250 \mu\text{L}$ d'éosine à 20 mg.mL^{-1} ont été dilués dans la solution stock de THA (50mL) dans du DMEM à $3\% \text{ w/v}$. Une fois le bain bien mélangé, les hydrogels sont incubés dans le bain dans chaque puits

de la plaque. Des temps d'imprégnation allant de 30min à 24h ont été testés ainsi que des temps de photoexposition allant de 5min à 30min. Les conditions optimales de réticulation du THA sont celles pour lesquelles l'hydrogel a été imprégné pendant 2h et photo-réticulé pendant 15 minutes. Avant d'amorcer la photoréticulation, le surnageant est retiré et les hydrogels sont rincés 3 fois 2 minutes avec de l'eau milliQ afin de retirer le surplus de THA et d'éosine. La photoréticulation est amorcée avec une lumière verte à 520nm située à 10 cm de la surface des gels interne à l'imprimante 3D.

VI. La culture cellulaire

Les hydrogels générés par impression 3D ont été cellularisés avec des fibroblastes dermiques normaux humains (NHDF). Il s'agit de cellules commerciales provenant de chez PromoCell à passage 1. Toutes les expérimentations utilisant ces cellules ont été conduites sous un poste de sécurité microbiologique de classe 2.

1. Décongélation et mise en culture

Avant de débiter la culture, une décongélation rapide des cellules à température ambiante est effectuée. Un tube de 1mL de cellules décongelées est ajouté dans une boîte de culture cellulaire T75 contenant 10mL de milieu de culture complet (Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) avec du glucose à 1g/L, des acides aminés, du rouge phénol, supplémenté avec 10% de sérum bovin fœtal (FBS), 100U.mL⁻¹ de streptomycine et pénicilline et enfin 100 U.mL⁻¹ d'amphotéricine B. Le rouge phénol est un indicateur de pH permettant de suivre la bonne santé des cellules. A pH physiologique il est rouge et devient jaune lorsque le milieu s'acidifie. Ceci est souvent synonyme de contamination. S'il devient violet, le pH est basique ce qui indique une pénurie de CO₂ dans l'incubateur. Le FBS est un cocktail de facteurs de croissance permettant de stimuler la prolifération cellulaire. La streptomycine et la pénicilline sont des antibiotiques et l'amphotéricine B un antifongique permettant de préserver les cellules des champignons et bactéries potentiels. Une fois dans la flasque, les cellules sont laissées une nuit à incuber à 37°C en présence de 5% de CO₂. L'adhérence cellulaire est vérifiée le jour suivant à l'aide d'un microscope optique inversé. Les cellules vivantes qui ont adhéré sont fusiformes, forme caractéristique des fibroblastes (Figure 72).

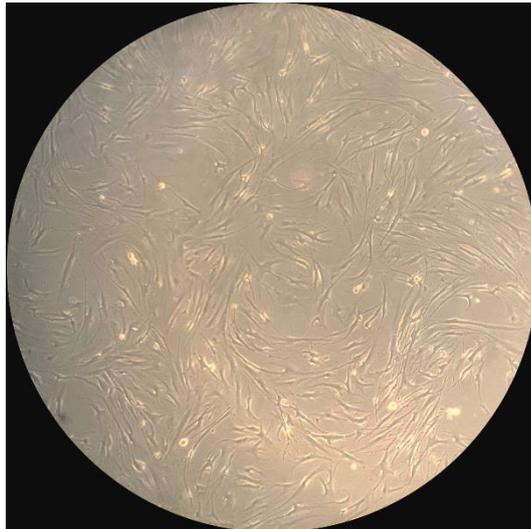


Figure 72 : Photo de fibroblastes ayant adhéré 24h après mise en culture dans une flasque T75.

Lorsque les cellules sont à confluence, c'est-à-dire qu'elles n'ont plus d'espace pour proliférer, un passage est nécessaire. Pour cela, celles-ci sont lavées 5 minutes au contact de PBS 1X. Puis le PBS est retiré et 1mL de trypsine à 0,1% est ajouté pour décoller les cellules. La trypsine permet de cliver les liaisons entre les cellules et leur matrices extracellulaires produites pour adhérer sur le support plastique de la flasque. Les cellules sont incubées en présence de trypsine pendant 5 minutes. Leur détachement de la boîte est vérifié au microscope inversé. Les cellules sont resuspendues dans 9 mL de milieu de culture pour inactiver la trypsine par dilution puis ajoutés dans deux flasques T75 à part égale (5 mL dans chaque) contenant 5 mL de milieu de culture. A chaque fois qu'un passage est fait, le nombre de cellules est doublé.

Le but de la culture cellulaire est de faire proliférer des cellules afin de constituer un stock qui sera utilisé pour les mettre en contact des biomatériaux collagène/THA générés par impression 3D.

La cellularisation des matériaux requiert un comptage préalable des cellules afin de contrôler la concentration utilisée. Pour cela, après avoir trypsinisé les cellules, 20 μ L de la suspension diluée dans du milieu de culture sont injectés dans une cellule de Malassez. Cette cellule permet de compter les cellules grâce au quadrillage qui la compose. Le nombre de cellules par carré est compté sur 5 carrés différents puis une moyenne est calculée. Connaissant le volume que représente un carré de la cellule de Malassez, il est possible de remonter à la concentration de la suspension d'après le calcul suivant.

$$(1) \quad N_{\text{cellules moyen/carré}} = \frac{\sum_1^5 N_{\text{cellules/carré}}}{5}$$

$$(2) \text{ [cellules]} \left(\frac{\text{cellules}}{\text{mL}} \right) = N_{\text{cellules moyen/carré}} \times 10^5$$

Une fois la concentration cellulaire déterminée, une dilution ou une concentration par centrifugation peut être faite pour atteindre la concentration désirée.

2. Culture 2D et 3D sur les hydrogels imprimés en 3D

Puisque dans l'AF natif, les cellules sont présentes entre deux lamelles, notre modèle repose sur un dépôt de cellules entre les couches d'hydrogel collagène/THA imprimés. La cellularisation se fait donc par dépôt au-dessus de chaque couche (Figure 73). Pour cela, plusieurs essais ont été effectués en termes de concentrations cellulaires et de volumes déposés afin d'optimiser les conditions de dépôt. Des volumes de suspension cellulaires de 200 μL et de 20 μL et des quantités finales de cellules déposées de 50.000, 100.000, 500.000 et 1.000.000 ont été utilisées pour les dépôts cellulaires sur des hydrogels carrés de 1 cm x 1 cm x 330 μm (1xLxh).

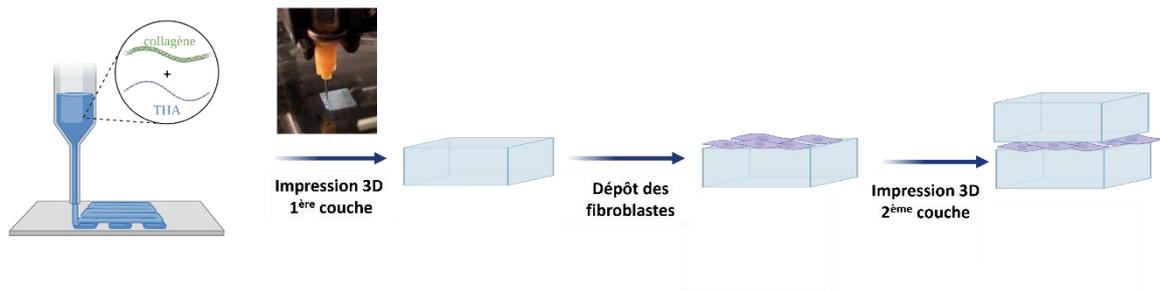


Figure 73 : Stratégie d'élaboration du modèle d'Annulus Fibrosus avec dépôt de fibroblastes entre chaque couche d'hydrogel collagène/THA imprimé, dessiné sur BioRender.

Les hydrogels cellularisés sont ensuite incubés à 37°C avec 5% de CO₂ pendant 30 minutes pour absorber le milieu et permettre aux cellules d'adhérer à la surface. Après 30 minutes, du milieu de culture est ajouté délicatement dans les puits de manière à ce que les cellules soient recouvertes de milieu. Finalement, le milieu est changé tous les 3 jours. Pour la cellularisation des hydrogels, des NHDF à passage compris entre 5 et 8 ont été utilisés.

La culture en 3D, qui sera le modèle d'Annulus Fibrosus, est générée couche par couche de manière à confiner les fibroblastes comme c'est le cas dans le tissu natif (Figure 73). Pour cela, après avoirensemencé les cellules sur la première couche comme vu au-dessus, une deuxième couche de collagène/THA sera imprimée sur les fibroblastes au contact de la première couche (Figure 73).

VII. Caractérisations physicochimiques des matériaux

1. Spectroscopie Infrarouge à Transformée de Fourier (FT-IR)

Le spectre de la lumière est divisé en trois parties : l'infrarouge avec des longueurs d'onde comprises entre 800 nm et 1mm, la lumière visible entre 400 et 800 nm et l'ultraviolet entre 10 et 400 nm. L'infrarouge ou FTIR une fois le signal transformé, permet de caractériser des liaisons chimiques et donc les fonctions chimiques composant le produit (Noreen, 2011). Quand un échantillon est soumis à un rayon IR, il l'absorbe. Dépendant de la capacité d'absorption de chaque matériau un signal différent sera mesuré comme le montre la loi de Beer Lambert (1).

$$(1) A_{\lambda} = \varepsilon_{\lambda}bc$$

Où A est l'absorbance pour une longueur d'onde λ spécifique

ε est le coefficient d'absorption pour une longueur d'onde spécifique (spécifique au matériau étudié)

b est la longueur du trajet optique de la lumière

c est la concentration de l'échantillon

Afin de comparer les mesures, les échantillons doivent donc avoir les mêmes concentrations et épaisseurs et être de mêmes natures.

Une fois absorbée le rayon IR provoque la vibration des liaisons de la molécule. Ceci provoque un changement de moment dipolaire et donc une énergie de liaison spécifique à chaque fonction à une longueur d'onde spécifique. Le rayonnement est ensuite transmis vers un détecteur qui le transforme en signal. Ce dernier subit une transformée de Fourier (FT) qui permet d'obtenir un spectre en transmittance.

En FTIR, deux paramètres sont importants : l'intensité des bandes et la fréquence à laquelle elles sortent. L'intensité donne des informations quantitatives sur le composé alors que les fréquences de résonance donnent des informations sur la nature des liaisons chimiques et donc la structure atomique de l'échantillon.

Les matériaux biologiques sont assez complexes à étudier par FTIR. La complexité de l'analyse de spectres FTIR réside en la superposition de certaines bandes de vibration. De manière générale, des tables existent pour analyser les différentes fonctions chimiques qui résonnent sur un spectre FTIR selon leur fréquence de vibration. De plus, quelques références sont établies pour les matériaux dits biologiques. Pour des protéines comme le collagène, on s'intéressera plutôt à la zone comprise entre 1480 et 1750 cm^{-1} . Enfin, la zone d'intérêt des

saccharides et polysaccharides se trouve plutôt entre 900 et 1200 cm^{-1} . Pour que l'analyse soit moins complexe et surtout plus fiable, il est nécessaire de sonder des échantillons contrôlés issus du matériau pur intervenant dans nos mélanges, c'est-à-dire le collagène et l'acide hyaluronique.

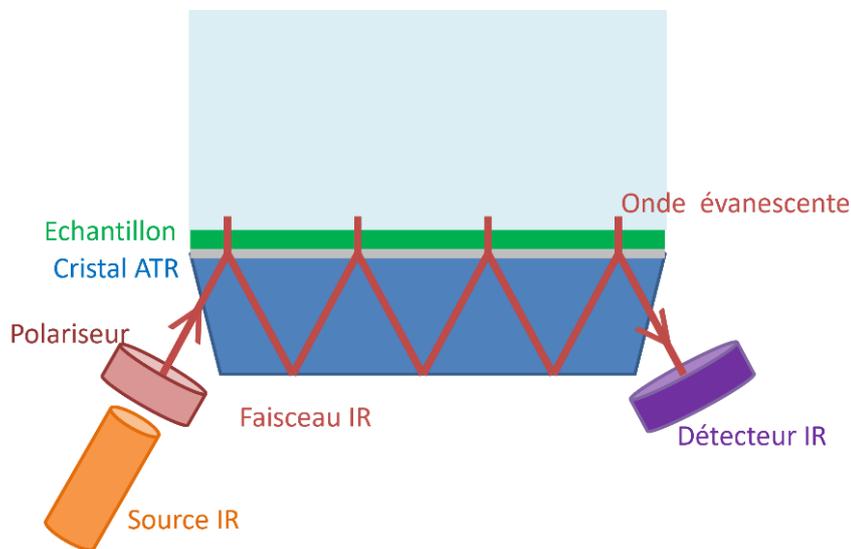


Figure 74 : Principe d'une analyse FTIR en mode ATR ; adapté de (Bieberle-Hütter et al., 2021).

En pratique, il existe plusieurs manières de mettre en forme les échantillons pour l'analyse en FTIR. Généralement, les échantillons doivent être moulus, compressés ou chauffés. Cependant le mode ATR pour Réflectance Totale Atténuée permet de simplifier la préparation de ceux-ci. Les échantillons peuvent être solide ou liquide et n'ont pas besoin d'être particulièrement mis en forme comme cela peut-être le cas avec les pastilles de KBr par exemple. Il n'y a donc pas de changement de structure de l'échantillon induit. En effet, dans le cadre de protéines comme le collagène qui dispose de structures primaires, secondaires et tertiaires assurant l'assemblage des triples hélices, une mise en forme lourde pourrait altérer sa structure et donc les vibrations observables en FTIR.

De plus, l'ATR est également prolifique car il repose sur l'utilisation d'un diamant permettant d'atteindre une résolution de spectre supérieure ("Techniques d'échantillonnage par FTIR," n.d.). Le diamant est utilisé pour atténuer la réflectance des échantillons sur la zone où ils absorbent de l'énergie comme illustré en Figure 74. En effet, la réflectance produit une onde évanescente qui peut perturber le signal.

Afin d'analyser nos hydrogels composites et contrôlés, ceux-ci ont été séchés au lyophilisateur pendant une nuit. Une fois secs, ils sont écrasés un à un entre le cristal et la plateforme supérieure puis le rayonnement IR est émis. L'analyse est effectuée sur 64 scans entre 500 et 4000 cm^{-1} . L'appareil utilisé est un spectromètre FTIR Perkin Elmer Spectrum 65.

2. Ultrastructure observée par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et Cryo-MEB

L'ultrastructure des hydrogels a été observée par Microscopie Electronique à Balayage (MEB) et Microscopie Electronique à Balayage Cryogénique (Cryo-MEB) pour les solutions. En Figure 75 se trouve le schéma d'un microscope électronique à balayage. Celui-ci est composé d'un canon à électrons qui projette un faisceau d'électrons vers l'échantillon à imager dans le vide. Au laboratoire, le MEB utilisé est équipé d'un filament de tungstène qui, après avoir été chauffé, émet des électrons. Les électrons sont ensuite accélérés grâce à un champ électrique puis condensés en passant par des lentilles électromagnétiques. L'une de ces lentilles, la lentille objective, focalise le faisceau sur l'échantillon et est à l'origine de la résolution sub-nanométrique obtenue avec cette technique. Lorsque l'échantillon est irradié d'électrons, les atomes le composant sont excités. Finalement ils sont capables de retourner à leur état fondamental selon des voies de relaxation différentes par exemple par émission d'électrons primaires ou secondaires ou encore de rayons X.

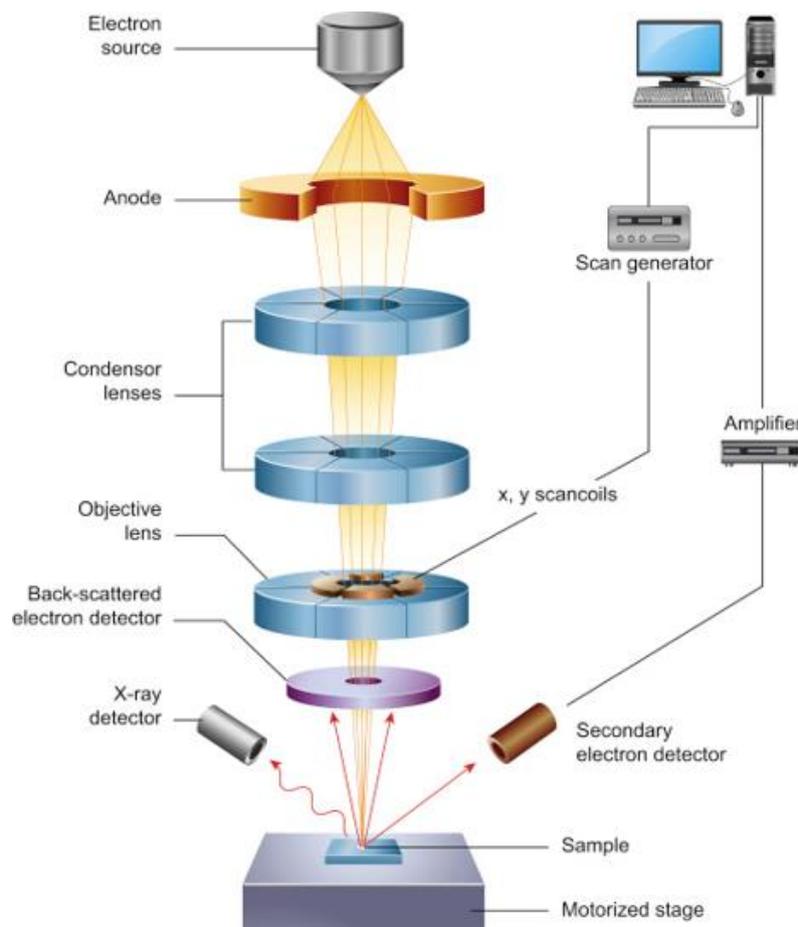


Figure 75 : Schéma explicatif d'un microscope électronique à balayage ("scanning electron microscope," n.d.).

Dans le cadre de nos expériences, ce sont les électrons secondaires qui permettent de former l'image. Les électrons secondaires sont émis lorsque l'énergie transférée lors du choc

électron-matière est supérieur au potentiel d'ionisation de l'atome considéré. Les électrons collectés sont de basse énergie (autour de 5 eV) et n'excèdent pas 10 nm de profondeur. Ceux-ci apportent des informations sur la topographie de surface de l'échantillon. Comme les échantillons biologiques ne sont pas de bons émetteurs d'électrons secondaires et que la conduction ne se fait pas bien, un dépôt de couches minces d'or a été réalisé par métallisation à la surface des échantillons. En effet, plus le numéro atomique est grand plus le signal sera bon. Ainsi, les interactions entre les électrons et l'échantillon sont amplifiées ainsi que le signal tout en conservant la topographie.

Avant d'être transformés en signal, les électrons secondaires sont accélérés par un récepteur Everhart-Thornley. Les électrons secondaires démultipliés peuvent alors être convertis en une image de la surface de l'échantillon.

Les hydrogels doivent subir certains traitements afin de les observer de manière fiable. Pour cela, ces derniers sont fixés au paraformaldéhyde (PFA) à 4 % pendant 24 h. Une fois fixés, ceux-ci sont lavés avec un tampon composé de cacodylate de sodium à 0,1 M et de saccharose à 0,6 M (1 :1 en vol) trois fois. Des bains d'éthanol de concentration croissante sont ensuite effectués comme s'en suit :

- Ethanol 30% pendant 20min
- Ethanol 50% pendant 20 min
- Ethanol 70% toute une nuit
- Ethanol 80% pendant 2h
- Ethanol 90% pendant 2h
- Ethanol 100% toute une nuit

A l'issue du dernier bain, les échantillons sont séchés au sécheur supercritique. Lors de ce séchage, du CO₂ liquide est introduit à haute pression dans la chambre où se trouvent les échantillons. 22 remplissage/vidange en CO₂ sont faites afin d'éliminer tout l'éthanol présent dans l'hydrogel. Une fois ces échanges terminés, l'état supercritique est atteint par l'utilisation d'une pression et d'une température supérieures à celles critiques pour le CO₂. Ainsi, il est possible de sécher l'hydrogel sans franchir la courbe d'équilibre liquide vapeur c'est-à-dire en perturbant le moins possible la structure de l'échantillon.

Une fois secs, les hydrogels sont placés sur des plots et sont recouverts d'une couche de 15 nm d'or lors d'une session de métallisation. Les observations sont effectuées avec un microscope Hitachi S-3400 N avec un voltage de 10 kV.

Dans le cas du Cryo-MEB, qui a été utilisé pour imager les solutions dans l'étude physicochimique, les échantillons ont été préparés à l'aide du système de cryo-préparation

QUORIUM PP3010T (Laughton, Royaume-Uni). Pour cela, une goutte de solution a été placée entre deux rivets fixés sur un porte-échantillon. La congélation des échantillons est faite en plongeant le porte échantillon dans le l'azote refroidit à -206°C sous pression (9×10^{-2} mBar). Les échantillons congelés sont cryo-fracturés dans la chambre de préparation puis sublimés pendant 4 minutes à -100°C . Finalement, un dépôt de couche mince de palladium est effectué pendant 50 s à $10 \mu\text{A}$. L'observation est effectuée sur un microscope Zeiss Gemini SEM 300 (Oberkochen, Allemagne) à 2 kV avec un diaphragme de $30 \mu\text{m}$.

Pour l'étude physicochimique, les photos ont été prises à des grossissements de X20 k pour visualiser le réseau fibrillaire et X5 k pour avoir une vue d'ensemble de l'échantillon. Pour l'impression 3D, la topographie de l'entièreté des gels a été reconstituée en balayant tout l'hydrogel à un grossissement de 40 et le réseau fibrillaire a été observé à X20 k. Finalement, les hydrogels cellularisés ont été observés à X5 k afin de cibler les cellules, leur morphologie ainsi que la production de matrice extracellulaire.

3. Evaluation de l'anisotropie du collagène par Microscopie Optique à Lumière Polarisée (MOLP)

La microscopie optique à lumière polarisée (MOLP) permet de mettre en évidence l'alignement des molécules à travers le phénomène de biréfringence des matériaux. Un matériau biréfringent a la capacité de propager la lumière à travers deux indices de réfraction selon deux directions distinctes de par son anisotropie. On distingue n_o l'indice de réfraction ordinaire de n_e l'indice de réfraction extraordinaire selon une forme ellipsoïdale Figure 76(A). Lorsque $n_e > n_o$, la biréfringence est positive en raison de la vitesse de propagation de la lumière supérieure le long de l'axe extraordinaire. Pour des gels de collagène, ils sont biréfringents lorsque les fibrilles de collagène sont alignées dans la même direction.

Il est possible de démontrer qu'un matériau est biréfringent et donc anisotrope en utilisant une lumière polarisée par des polariseurs croisés à 90° comme montré en Figure 76(B). Les polariseurs sont au nombre de deux. Le premier permet de laisser passer la lumière dans une direction donnée.

Si l'échantillon est isotrope, le second polariseur, appelé analyseur et orienté à 90° par rapport au premier, ne laisse pas passer la lumière se traduisant par une extinction. A contrario, pour un échantillon anisotrope, selon l'angle d'observation, il y aura extinction de lumière ou pas résultant à des images noires puis claires avec une différence d'angles de 45° entre les deux images.

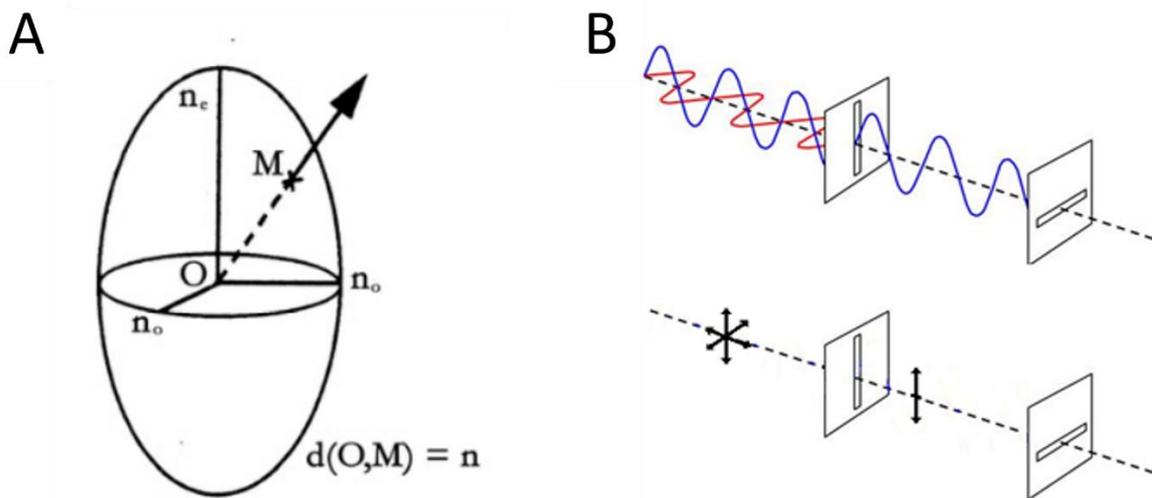


Figure 76 : (A) Schéma de l'ellipsoïde comprenant les deux indices de réfraction n_e et n_o d'un matériau biréfringent et (B) Schéma du principe des polariseurs croisés à 90° (Gobeaux, n.d.).

Le MOLP a été utilisé comme méthode de contrôle de l'optimisation des paramètres d'impression et de l'alignement du collagène post-impression. L'appareil utilisé est un Nikon Eclipse E600 POL équipé d'une caméra Nikon DS-Ri1.

Dans un premier temps, les hydrogels ont été observés sans polariseurs afin de mesurer la taille des filaments extrudés selon les paramètres d'impression. A ce stade, les conditions optimales sont celles pour lesquelles le diamètre des filaments est le plus proche du diamètre interne de l'aiguille. Par la suite l'observation a été conduite avec des polariseurs croisés afin d'observer la biréfringence des filaments extrudés. Les conditions pour lesquelles les échantillons sont les plus biréfringents sont sélectionnées comme étant optimales.

Le microscope optique à lumière polarisée a également été utilisé sans polariseurs croisés afin de mesurer la taille des filaments imprimés grâce au logiciel FIJI. La quantification de la taille des filaments extrudés est un paramètre essentiel lors de l'optimisation des paramètres d'impression d'une bioencre. Plus celle-ci est proche du diamètre interne de la buse d'extrusion, plus le paramètre est optimisé.

4. Détection de la présence d'acide hyaluronique par coloration histologique

Afin d'évaluer l'efficacité de l'imprégnation du THA dans les hydrogels de collagène, des coupes histologiques ont été faites.

Pour cela, après fixation au PFA à 4% pendant 1 nuit, les échantillons sont déshydratés dans des bains d'éthanol comme s'en suit :

- 1 nuit à 70%
- 2h à 80%
- 2h à 90%
- 2h à 100%

La déshydratation est poursuivie sur 3 jours d'incubation avec du butanol-1 à raison d'un changement par jour. Le butanol est un bon candidat de par sa miscibilité avec la paraffine qui est le matériau d'inclusion des hydrogels. Après 3 jours, les échantillons sont incubés 4h à 60°C dans la paraffine liquide pour les imprégner et éviter les bulles d'air dans les coupes. L'inclusion est ensuite effectuée en formant des blocs de paraffine laissés à solidifier pendant 1 nuit à température ambiante. Un microtome manuel est utilisé pour réaliser des coupes d'une épaisseur de 7 µm qui sont déposées sur lames de microscope en verre. Les coupes sont laissées une nuit dans une étuve à 60°C puis directement déparaffinées avec deux bains de toluène de 15 minutes. Elles sont ensuite réhydratées par une série de bain d'éthanol à concentration décroissante (100%, 95% et 70%) pour finir avec un bain d'eau milliQ. Chaque bain dure 5 minutes.

Les coupes sont colorées soit avec du Picrosirius Red soit avec du Bleu Alcian. Le Picrosirius Red (PR) permet de colorer le collagène. Pour cela, un bain de 45 minutes avec une solution commerciale prête à l'emploi de PR (Solution de 500mL de chez Abcam à pH 1 et 1,2 % d'acide picrique) est effectuée. Après 45 minutes, les coupes sont rincées à l'eau du robinet en continu pendant 5 minutes. Le Bleu Alcian (BA) permet de colorer l'acide hyaluronique. Pour cela, un bain de 30 minutes avec une solution de Bleu Alcian (Solution de 500 mL de chez Sigma Aldrich à pH 2,5) est effectué. A l'issue de ces 30 minutes, les lames sont lavées à l'eau du robinet en continu pendant 10 minutes. Une fois colorées, les coupes sont déshydratées par bain d'éthanol de concentration croissante en terminant par deux bains de toluène. Les coupes sont alors montées entre lame et lamelle avec une résine adaptée à l'observation microscopique : l'Eukitt. Les échantillons sont observés au microscope optique (Nikon)

5. Caractérisation de la stabilité thermique du collagène par Calorimétrie Différentielle à Balayage (DSC)

L'impact de la présence d'acide hyaluronique sur la stabilité thermique du collagène a été évalué par DSC. Selon l'arrangement spatial du collagène deux signatures thermiques peuvent être détectées : celle de la dénaturation de la triple hélice de collagène en solution à 37°C et celle du collagène sous forme de fibrilles à 53°C. Dans le cas où de nouvelles interactions stabilisantes

ou déstabilisantes auraient lieu, la température de dénaturation du collagène serait modifiée. Deux facteurs ont été évalués par DSC : l'impact de l'ajout de de THA et l'efficacité de la réticulation par voie enzymatique ou par photoréticulation qui pourrait modifier la stabilité thermique du collagène.

Afin de mesurer cette température de dénaturation, l'échantillon doit être introduit dans une capsule d'aluminium puis pesé précisément. Cette capsule est ensuite scellée grâce à une presse manuelle puis introduite dans la DSC une fois la température d'attente fixée à 20°C. Un schéma d'un four de DSC est joint en Figure 77. Une seconde capsule vide est placée dans le four comme référence.

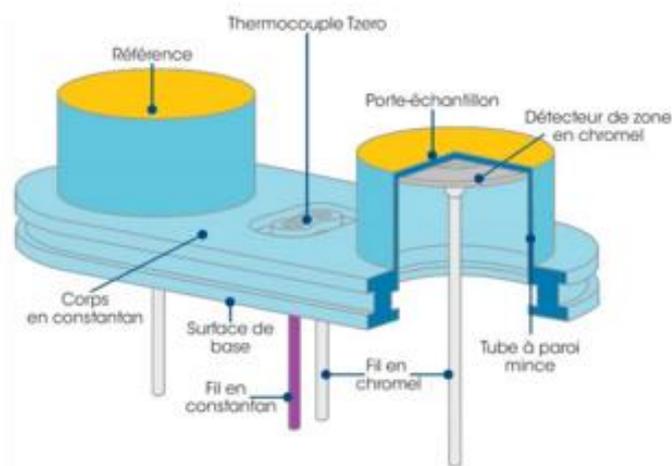


Figure 77 : Schéma organisationnel d'un four de DSC (Frayssinet, 2020).

Une rampe thermique à une vitesse spécifique est appliquée aux deux capsules en simultanée une fois le four fermé pour que le flux thermique traversant les deux capsules soit comparé. Le flux thermique est calculé grâce à la formule ci-dessous.

$$Q = \frac{T - T_f}{R}$$

Avec Q le flux thermique pour lequel on calcule distinctement le flux thermique pour l'échantillon $Q_{\text{échantillon}}$ et pour la référence $Q_{\text{référence}}$

T la température exacte de l'échantillon ou de la référence

T_f la température des plaques chauffantes de l'échantillon ou de la référence qui sont identiques

Et R la résistance thermique qui est la même pour l'échantillon et la référence

Suite à ce calcul, un flux thermique différentiel appelé ΔQ peut être calculé comme s'en suit.

$$\Delta Q = Q_{\text{échantillon}} - Q_{\text{référence}} = \frac{T_{\text{échantillon}} - T_{\text{référence}}}{R}$$

Le flux thermique différentiel permet de détecter les transitions exothermiques et/ou endothermiques spécifiques à l'échantillon analysé. Alors qu'une température de fusion constitue un phénomène endothermique, la température de cristallisation est exothermique par exemple. A l'issue d'une mesure de DSC, un thermogramme est obtenu présentant les transitions observées au sein de l'échantillon. Dans le cadre du collagène, la dénaturation étant un évènement endothermique lié à la rupture des liaisons hydrogène entre les triples hélices, un pic négatif apparaîtra lorsque le thermogramme est représenté selon une convention "Exo up".

En pratique, les hydrogels sont séchés dans des Eppendorf troués sur le bouchon avec un lyophilisateur Labconco FreeZone Triad. Les hydrogels sont réhydratés avec 10 μ L d'eau puis 5 à 20 mg d'échantillon sont pesés et placés dans une capsule. Chaque condition est caractérisée en triplicat. La capsule est ensuite scellée grâce à une presse manuelle puis placée dans le four à une température d'attente fixée à 20°C. Une rampe de température allant de 10 à 90 °C à raison de 10°C/min est appliquée comprenant un cycle de chauffe puis un cycle de refroidissement. La dénaturation du collagène en gélatine étant un phénomène irréversible, il est normal de n'observer aucun phénomène sur le cycle de refroidissement. Les thermogrammes obtenus sont analysés avec le logiciel "TA Universal Analysis" pour remonter aux températures de dénaturation de manière précise.

6. Mesures rhéologiques

Les matériaux générés lors de l'étude physicochimique et de l'impression 3D du modèle d'Annulus Fibrosus ont été caractérisés par rhéologie selon deux modes. Les propriétés mécaniques des hydrogels ont été quantifiées à travers des tests de viscoélasticité en cisaillement. Le comportement rhéofluidifiant de l'encre formulée pour l'impression 3D a été évalué par une mesure de la viscosité en cisaillement.

6.1. Mesures de viscoélasticité des hydrogels par rhéométrie en cisaillement

L'Annulus Fibrosus est un tissu viscoélastique, c'est-à-dire qu'il se comporte à la fois comme un solide élastique et un liquide visqueux. Le comportement mécanique d'un matériau viscoélastique est caractérisé par la combinaison de deux composantes : la composante élastique et la composante visqueuse. La composante élastique décrit la capacité d'un matériau à se

comporter comme un solide élastique et est lié à la mesure du module de stockage G' . La composante visqueuse décrit la capacité du matériau à se comporter comme un liquide visqueux et est définie par la mesure du module de perte G'' . En théorie, la loi de Hooke (1) et la loi de Newton (2) permettent de remonter à ces deux composantes en liant la contrainte de cisaillement appliquée au matériau et la déformation induite. Les relations le permettant sont présentées ci-dessous.

$$(1) \quad \sigma = G\dot{\gamma}$$

$$(2) \quad \sigma = \eta\dot{\gamma}$$

Avec σ la contrainte de cisaillement

G le module en Pa

$\dot{\gamma}$ le gradient de cisaillement mesurée

η la viscosité en Pa.s

Cependant, ces deux lois ne sont valables que dans un régime de très faible déformation appelée régime viscoélastique linéaire (LVE). Pour quantifier la partie visqueuse et la partie élastique d'un matériau, une contrainte ou une déformation sinusoïdale est appliquée en fréquence au matériau dans le régime linéaire. La contrainte de cisaillement appliquée (3) et la déformation de cisaillement mesurée (4) sont alors définies comme s'en suit.

$$(3) \quad \sigma(t) = \sigma_0 \sin(\omega t)$$

$$(4) \quad \gamma(t) = \gamma_0 \sin(\omega t + \delta)$$

Avec σ_0 l'amplitude de la contrainte de cisaillement

γ_0 l'amplitude de la déformation de cisaillement

ω la fréquence sinusoïdale

δ le déphasage

Une réponse mécanique sinusoïdale est mesurée avec un déphasage entre le comportement élastique pur et le comportement visqueux pur Figure 78. Ce déphasage s'explique par le fait que contrairement à la déformation d'un solide élastique pure, la déformation visqueuse suit toujours la contrainte appliquée avec un retard. Un déphasage de 0° est attribué à la réponse élastique pure alors qu'un déphasage de 90° est attribué à un comportement visqueux.

L'assemblage de ces deux réponses forment un module de cisaillement complexe appelé G^* et défini selon la loi de Hooke (5) comme s'en suit.

$$(5) \quad G^*(\omega) = \frac{\sigma^*}{\gamma^*} = G'(\omega) + iG''(\omega)$$

Avec G' le module de stockage associé à la composante élastique et proportionnel à l'énergie stockée dans le matériau. Il s'agit du module caractérisant le comportement de solide élastique du matériau.

Et G'' le module de perte associé à la composante visqueuse et proportionnel à l'énergie dissipée dans le matériau. Il s'agit du module caractérisant le comportement de liquide visqueux du matériau.

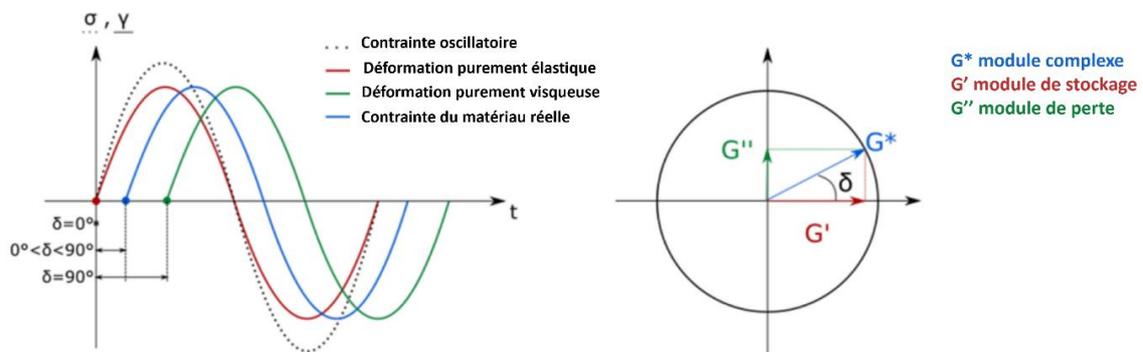


Figure 78 : Profil de la réponse mécanique sinusoïdale de matériaux purement élastique et purement visqueux (Frayssinet, 2020).

Les modules de stockage et de perte sont directement mesurés par le rhéomètre selon la fréquence de cisaillement. De plus, afin de remonter au module d'Young (E) du matériau, la mesure de G' est primordiale. En effet, G' et E sont liés par la formule de Poisson comme s'en suit (6).

$$(6) \quad E = 2(1 + \nu)G'$$

Avec ν le coefficient de Poisson compris entre 0,6 et 1,8 pour l'AF dû à son anisotropie.

Le coefficient de Poisson des hydrogels de collagène est en moyenne de 0,47 et celui des hydrogels de HA de 0,53. Par conséquent en prenant en compte leur quantité dans les hydrogels composites, le coefficient de Poisson de ces derniers est en moyenne de 0,5. Ainsi, le module d'Young peut être déterminé plus simplement comme s'en suit (7).

$$(7) \quad E = 3G'$$

En pratique, les tests rhéologiques ont été réalisés en oscillation sur un rhéomètre Anton Paar MCR 302 (Figure 79(A)) avec une géométrie plan-plan PP08/S de 8 mm de diamètre rugueuse afin que les hydrogels ne glissent pas pendant la mesure. En effet, les hydrogels étant des matériaux hautement hydratés, ils ont tendance à glisser voire à former des couches d'eau lubrifiantes à l'origine d'une mesure faussée. Les modules mesurés sont alors ceux du film d'eau et non plus du matériau.

Afin de faire la même taille que la géométrie, les hydrogels ont été gélifiés dans des moules imprimés au préalable aux dimensions de la géométrie. En effet, afin d'avoir une mesure fiable et reproductible, la surface de la géométrie doit être entièrement en contact avec la surface du matériau à sonder (Figure 79(B)).

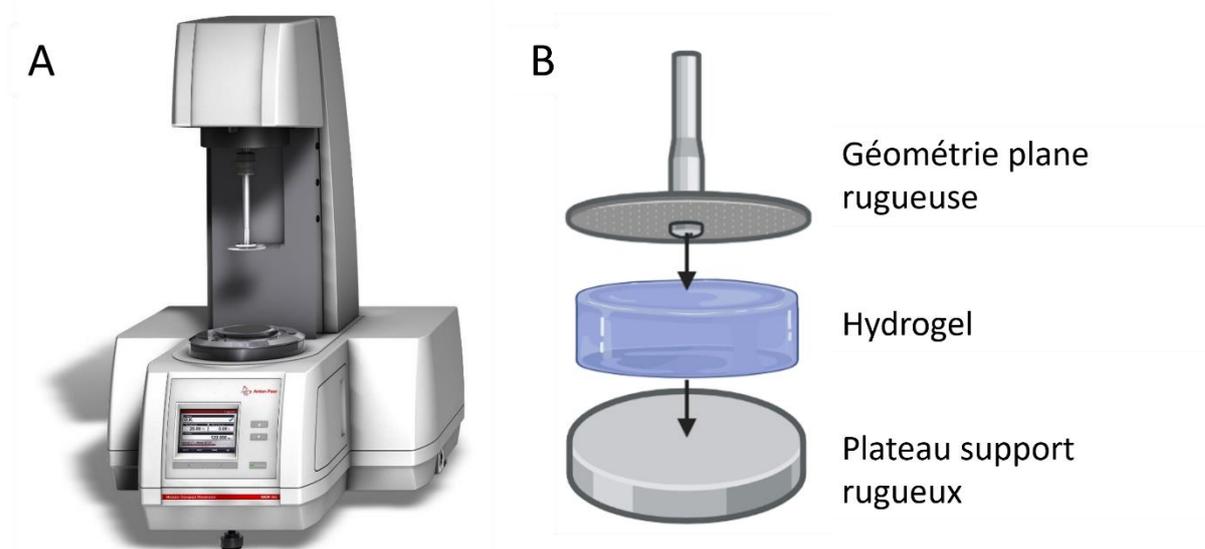


Figure 79 : (A) Photo du rhéomètre Anton Paar MCR302 utilisé au laboratoire (“Rheometry | Rheology,” n.d.) et (B) Schéma de l'agencement de la mesure viscoélastique d'un hydrogel lors d'une conformation plan-plan dessiné à l'aide de BioRender.

Après avoir calibré le rhéomètre selon son moteur, la géométrie utilisée et l'inertie du tout, un entrefer zéro correspondant au moment où la géométrie touche la plaque support est fait. G' et G'' sont mesurés à un taux de déformation $\gamma=1\%$ pour être dans le régime linéaire et dans une gamme de fréquence allant de 0,1 à 10 Hz. Une force normale F_N est fixée à 0,1 N pour chaque mesure afin que la même force soit appliquée sur tous les gels. Les mesures ont été conduites à température ambiante. En plus de se situer dans le régime linéaire, la gamme de fréquence sélectionnée assure des conditions de mesure non destructive et des mesures fiables permettant de réutiliser les échantillons pour d'autres caractérisations. Les modules de stockage, de perte et d'Young sont déterminés à 1 Hz pour chaque échantillon et sont exprimés comme la moyenne sur triplicats.

6.2. Comportement rhéofluidifiant des encres formulées pour l'impression 3D

L'un des facteurs intervenant dans la notion d'imprimabilité d'une encre est sa capacité à s'écouler pendant l'extrusion puis à retenir sa forme post-extrusion. C'est ce qu'on appelle le comportement rhéofluidifiant d'une encre. Ainsi, si un fluide newtonien est rhéofluidifiant, il est capable de s'écouler sous l'action d'un gradient de cisaillement et dès lors que ce gradient cesse, il ne s'écoule plus permettant de maintenir sa forme.

Dans le cadre de notre projet, l'imprimabilité des encres formulées a été validée par rhéologie en mesurant la viscosité de celles-ci en fonction du gradient de cisaillement. Lorsqu'un fluide est rhéofluidifiant, sa viscosité chute avec le gradient de cisaillement. Pour mesurer la viscosité des encres, un rhéomètre Anton Paar MCR302 a été utilisé selon les mêmes modalités que précédemment mais avec une géométrie cône/plan CP25-1 avec un angle de 1° (Figure 80). La présence de l'angle permet d'obtenir un taux de cisaillement constant essentiel à la quantification de la viscosité. La viscosité a été mesurée dans une gamme de gradient de cisaillement comprise entre $0,1$ et 1000 s^{-1} .

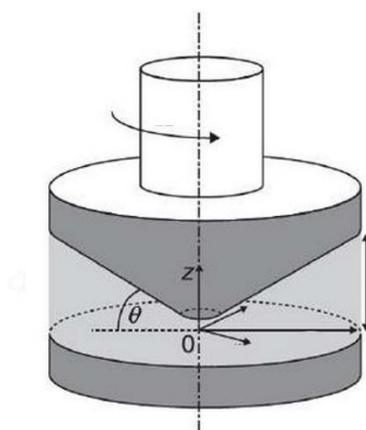


Figure 80 : Mesure de la viscosité via rhéométrie cône-plan (Chuta Caceres, 2018).

7. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été conduites au moins deux fois et les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs moyennes accompagnées de leurs écart-types. Les différences entre les différentes formulations ont été analysées pour chaque point en utilisant le test de Kruskal-Wallis. Puis un test Dunn a été utilisé pour déterminer les différences entre les groupes. Une différence "p" inférieure à $0,05$ est considérée significative.

VIII. Evaluation de la bioactivité du modèle d'Annulus Fibrosus imprimé

1. Mesure de l'activité métabolique par le test Alamar Blue

Ce test permet de mesurer indirectement la viabilité et la prolifération des cellules. Pour cela, une sonde fluorescente bleue appelée résazurine est utilisée. La résazurine est un accepteur d'électrons, c'est-à-dire qu'elle peut être réduite en résorufine qui est fluorescente et colorée en rose sous sa forme réduite. La présence de l'une ou l'autre des formes peut être suivie soit par absorbance soit par fluorescence. Dans ce projet, les résultats seront analysés en absorbance. Par absorbance il suffit de mesurer l'absorbance à une longueur d'onde de 600nm pour détecter la résazurine et 570nm pour la résorufine comme présenté sur le spectre d'absorbance en Figure 81.

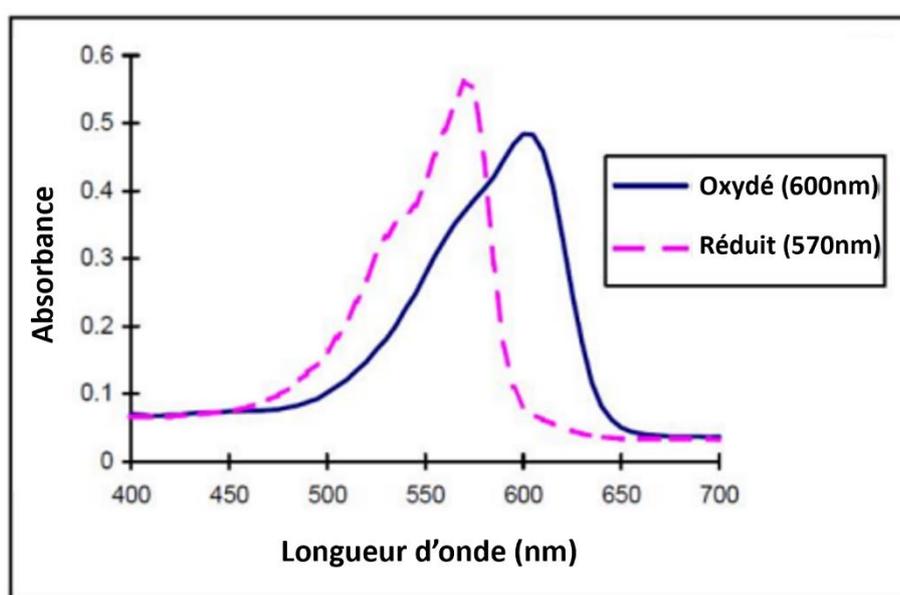


Figure 81 : Spectre d'absorbance de la résazurine et de la résorufine pour l'analyse du Test d'Alamar Blue (Frayssinet et al., 2020).

Lorsqu'elles respirent, les cellules réalisent une cascade de réactions d'oxydo-réductions sur la chaîne respiratoire des mitochondries. Initialement, le pyruvate est oxydé générant deux transporteurs d'électrons : le nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) et la flavine adénine dinucléotide (FADH). Lorsqu'ils sont dans les mitochondries, ces transporteurs sont réoxydés afin de produire des molécules d'adénosine triphosphate (ATP) : principale source d'énergie cellulaire.

Lors du test d'Alamar Blue, la résazurine est capable de capter les électrons produits tout au long de la chaîne respiratoire et du cycle de Krebs. Il s'agit d'un test cinétique puisqu'il dépend directement du temps d'incubation effectué. C'est pourquoi, par soucis de comparaison, le temps d'incubation a été fixé à 3h30 qui est le temps pour lequel le contrôle cellulaire avec 100.000

cellules par puits devient rose sans aboutir à 100% de forme réduite, c'est-à-dire 100% de résosfurine.

Ce test peut être représentatif du nombre de cellules dans un échantillon puisque la résazurine est d'autant plus réduite qu'il y a de cellules. Par contre, on considère que toutes les cellules sont dans le même état métabolique. En effet, une haute activité métabolique peut être à l'origine soit d'un grand nombre de cellules en très bonne santé soit d'un petit nombre de cellules stressées. Cela équivaut à dire que toute source de stress cellulaire peut avoir un impact sur les résultats d'Alamar Blue. Ainsi ce test comporte un certain nombre de biais mais peut être utilisé comme première approche pour la détermination du nombre de cellules dans l'échantillon au cours du temps de culture.

En pratique, une solution stock de résazurine est préparée à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ dans du PBS 1X. Une dilution par 10 est faite dans du DMEM transparent puis 300 μL de cette solution sont mis en contact avec les cellules préalablement préparées dans une plaque de puits. La plaque est laissée à incuber 3h30 à 37°C avec 5% de CO_2 . Après 3h30 d'incubation, les surnageants sont dilués dans 700 μL de DMEM transparent et l'absorbance est mesurée à 570 et 600 nm à l'aide d'un lecteur multiplaque Varioskan LUX (Thermofisher). Un contrôle négatif sans cellules est nécessaire. L'activité métabolique est calculée comme s'en suit.

$$\%r\u00e9duction = \frac{\epsilon_{ox-600} \times A_{570} - \epsilon_{ox-570} \times A_{600}}{\epsilon_{red-570} \times A_{neg-600} - \epsilon_{red-600} \times A_{neg-570}} \times 100$$

Avec $\epsilon_{ox-600} = 117,216$ - le coefficient d'extinction lié à l'oxydation à 600 nm

$\epsilon_{ox-570} = 80,586$ - le coefficient d'extinction lié à l'oxydation à 570 nm

$\epsilon_{red-600} = 14,652$ - le coefficient d'extinction lié à la réduction à 600 nm

$\epsilon_{red-570} = 155,677$ - le coefficient d'extinction lié à la réduction à 570 nm

Pour chaque échantillon un pourcentage de réduction de la résazurine est donc calculé. Ce résultat est comparé au contrôle qui est le pourcentage de réduction de résazurine pour 100.000 cellules cultivées sur une couche de collagène pure. Afin d'évaluer la prolifération cellulaire, des tests d'Alamar Blue ont également été effectués sur les hydrogels cellularisés pendant 21 jours. L'activité métabolique a été mesurée aux jours 1, 3, 7, 14 et 21 et comparée à des hydrogels de collagène pur cellularisés au temps de culture de 1 jour.

2. Mesure de la viabilité cellulaire via le test Live/Dead

Le Live/Dead permet d'évaluer la viabilité cellulaire sur les hydrogels grâce à un marquage différencié des cellules mortes et vivantes.

Les cellules vivantes sont marquées avec de la calcéine acétoxyméthyle (calcéine-AM) en vert. La calcéine est une molécule fluorescente qui possède une longueur d'onde d'excitation à 494 nm et d'émission à 517 nm.

Lorsque les cellules sont vivantes, leur membrane est intacte et ne laisse passer que des molécules spécifiques à travers celle-ci. La calcéine étant chargée négativement, elle ne peut passer la membrane qu'après neutralisation par greffage de l'acétoxyméthyle (calcéine-AM). Ce greffage désactive par la même occasion la fluorescence de la calcéine. Une fois internalisée, la calcéine-AM est hydrolysée par des enzymes intracellulaires en calcéine. Celle-ci reste alors piégée dans la cellule et retrouve sa fluorescence verte.

Les cellules mortes sont marquées par un homodimère d'éthidium en rouge. Il s'agit d'un fluorophore qui possède une longueur d'onde d'excitation à 493 nm et d'émission à 636 nm.

Lorsqu'elles sont mortes, les cellules ont une membrane plasmique endommagée qui peut laisser passer des molécules non spécifiques. Une fois l'homodimère d'éthidium internalisé, il s'intercale dans l'ADN augmentant ainsi sa fluorescence dans le rouge. Les longueurs d'onde caractéristiques sont ainsi décalées. La longueur d'onde d'excitation est à 535 nm et celle d'émission à 617 nm. L'ADN se situant dans le noyau, ces derniers se colorent alors en rouge.

Les cellules vivantes apparaissent comme des cellules de morphologie normale vertes et les cellules mortes comme des cellules rondes (noyau marqué) rouges.

Les essais de Live/Dead ont été faits sur les hydrogels cellularisés collagène/THA en sandwich sur 14 jours avec des contrôles de collagène pur à J1, J7 et J14. Pour cela, 1 μL de calcéine-AM et 4 μL d'homodimère d'éthidium ont été dilués dans 2 mL de PBS 1X (kit Live/Dead Invitrogen pour cellules de mammifères de chez Thermo Fisher Scientific). 200 μL de cette solution sont mis au contact des cellules pendant 30 minutes. Après 30 minutes, les échantillons sont rincés avec du PBS 1X pour retirer l'excès de fluorophores.

L'observation des hydrogels se fait sur un microscope confocal Leica DMI6000 TCS SP5 droit équipé d'un laser infrarouge pulsé Mai Tai à la plateforme Orion du laboratoire CIRB au Collège de France.

Deux lasers ont été utilisés afin de sonder les fluorescences vertes et rouges. Le laser argon permet de sonder la calcéine dans le vert avec une longueur d'onde de 488 nm. Le laser DPSS-561 permet de sonder l'homodimère d'éthidium avec une longueur d'onde de 561 nm. Une

lumière est émise à la longueur d'onde d'émission spécifique à chaque fluorophore permettant de les exciter sur chaque plan focal sondé. L'objectif récupère la lumière émise par les fluorophores pour la transmettre au détecteur à travers des diaphragmes. Le signal détecté permet de construire une image pour chaque plan focal sondé. Les images obtenues sont des Z-stacks où l'on sonde différents niveaux de l'échantillon afin d'avoir un aperçu en 3D.

La reconstruction 3D et l'analyse des images est faites sur FIJI avec différents plugins. Une visualisation en 3D peut être faite en utilisant le plugin 3D viewer. Une projection en Z peut également être faite afin de visualiser le tapis cellulaire en créant une projection en Z. Finalement, des coupes de l'échantillons peuvent également être effectuées avec le plugin « Reslice ».

3. Morphologie et migration cellulaire ciblées par marquage à la phalloïdine Alexa 488 et au DAPI

Ce marquage a été utilisé pour observer la morphologie des cellules dans diverses conditions (au-dessus de la première couche ou en sandwich). Nous nous sommes intéressés au marquage des filaments d'actines montrant le cytosquelette de la cellule et au marquage du noyau. Les filaments d'actine ont été marqués à la phalloïdine couplée à l'Alexa Fluor 488 alors que les noyaux ont été marqués au DAPI.

Le DAPI et la phalloïdine étant des fluorophores, les marquages ont été conduits à l'abri de la lumière. Le DAPI (Invitrogen) est un intercalant de l'ADN dont les longueurs d'excitation et d'émission sont respectivement de 358 et 461 nm. Une fois intercalé dans l'ADN, le DAPI fluoresce en bleu.

La phalloïdine (phalloïdine-Alexa Fluor488 de Invitrogen) est un fluorophore peptidique bicyclique se fixant sélectivement aux filaments d'actine ("Alexa Fluor™ 488 Phalloidin," n.d.). Ses longueurs d'onde d'excitation et d'émission sont respectivement de 495 et de 518 nm. Une fois marqués par la phalloïdine, les filaments d'actine fluorescent en vert de par la présence d'Alexa Fluor 488.

Avant tout, les hydrogels cellularisés sont préalablement fixés au PFA 4% pendant 24 h. Ensuite les cellules ont été perméabilisées avec du PBS- Triton 0,2 % pendant 20 min. Les cellules ont été incubées avec une solution de Phalloïdine diluée au 1/200 dans du PBS pendant 45 min. Après trois rinçages en PBS, les échantillons ont été marqués au DAPI (1/50000) pendant 10 min et rincés 3 fois en PBS. La morphologie des cellules présentes au-dessus de la première couche a été observée sur un microscope à épifluorescence sur 21 jours de culture (Zeiss AX10).

Pour la cellularisation des sandwiches, l'imagerie est conduite au Collège de France sur le microscope confocal utilisé précédemment en Live/Dead. Afin de visualiser l'alignement des

fibroblastes sur les filaments de collagène, seuls les filaments d'actine sont marqués à la phalloïdine et le signal est couplé à une analyse de génération de seconde harmonique (SHG). En effet, le collagène possède un signal en SHG qui permet de pouvoir visualiser son alignement. En superposant le signal SHG au signal fluorescent des cellules, il est possible de quantifier le degré d'orientation des cellules le long des filaments de collagène. Les images sont finalement retravaillées sur FIJI par superposition des deux canaux pour avoir une seule image contenant les deux signaux superposés. L'alignement des cellules le long des filaments imprimés a été déterminé par l'utilisation du plugin Orientation J.

Au terme de ces 21 jours, la migration cellulaire dans les couches a été évaluée en procédant à une coupe histologique (comme vu précédemment) complétée par le marquage des noyaux au DAPI. Celle-ci a également été évaluée au microscope à épifluorescence. Les images ont ensuite été retravaillées grâce au logiciel FIJI en superposant les deux canaux fluorescents.

4. Analyses statistiques

Toutes les expériences ont été conduites au moins deux fois et les résultats ont été exprimés sous forme de valeurs moyennes accompagnées de leurs écart-types. Les différences entre les différentes formulations ont été analysées pour chaque point en utilisant le test de Kruskal-Wallis. Puis un test Dunn a été utilisé pour déterminer les différences entre les groupes. Une différence "p" inférieure à 0,05 est considérée significative.

Etude physicochimique de compatibilité entre collagène et acide hyaluronique (THA)

Résumé

Pour développer un modèle d'Annulus Fibrosus par impression 3D, il faut tout d'abord formuler une encre homogène et imprimable. Notre choix s'est porté sur le collagène et l'acide hyaluronique pour réaliser cette encre. Néanmoins, le collagène étant chargé positivement et l'acide hyaluronique négativement, ils forment instantanément des complexes polyioniques (CPI) lorsqu'ils sont mélangés. Ceci pose problème puisque des mélanges hétérogènes et très visqueux sont alors générés, incompatibles avec l'impression 3D.

Nous avons conduit une étude physicochimique afin de trouver les conditions optimales pour la formulation de l'encre. Pour cela, une étude approfondie des conditions de formation des CPI a été conduite en modulant le pH et la force ionique en utilisant des solutions diluées ($4\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$) de collagène et d'acide hyaluronique en conditions dilués au ratio 1:1. En effet, ces conditions permettent de favoriser les interactions entre les deux biopolymères. En se plaçant dans les conditions les plus défavorables, on pourrait imaginer inhiber les CPI dans des conditions avec des ratios différents.

Dans un premier temps, nous avons effectué des mélanges collagène/acide hyaluronique à différents pH en présence ou non de NaCl à 400 mM pour analyser les conditions qui permettent l'inhibition de la formation des CPI. Une fois les conditions adéquates identifiées, la fibrillogénèse et la gélification du collagène ont été déclenchées par remontée de pH pour former un gel de collagène. L'impact des différentes conditions physicochimiques sur la formation du réseau fibrillaire de collagène a été analysé.

Dans un deuxième temps, la gélification de l'acide hyaluronique a été réalisée par voie enzymatique ou par photo réticulation. La procédure permettant de générer des hydrogels homogènes avec les meilleures propriétés mécaniques, structurales et thermiques a été sélectionnée.

Chapitre 1 : Les interactions entre collagène et THA en solution

Le collagène étant chargé positivement et l'acide hyaluronique négativement, ils forment instantanément des complexes polyioniques (CPI) lorsqu'ils sont mélangés (Taguchi et al., 2002). Pour qu'une encre soit imprimable, elle doit être homogène, c'est pourquoi il est nécessaire d'inhiber la complexation entre collagène et THA. Pour cela, deux facteurs ont été modulés : le pH et la force ionique.

I. Effet du pH sur les interactions entre collagène et THA en solution

Le pH est le premier facteur ayant été modulé pour étudier la formation des CPI en solution. Le pKa des acides carboxyliques présents sur le THA étant autour de 2,5-3 (Brown and Jones, 2005) et le point isoélectrique du collagène autour de 6 (Cassel and Kanagy, 1949; Park et al., 2012), la gamme de pH a été fixée entre 1 et 5,5. Ainsi, les mélanges ont été formulés avec des biopolymères solubilisés dans de l'acide chlorhydrique à des concentrations comprises entre 10^{-1} et 10^{-5} M correspondant à des pH compris entre 1 et 5,5.

Les solutions ont été mélangées avec un ratio 1 :1 de collagène et de THA afin de maximiser les interactions entre les deux biopolymères. Ceci est également assuré par le fait que les deux biopolymères ont à peu près le même poids moléculaire : 280 kDa pour le THA et 300 kDa pour le collagène. Si nous parvenons à inhiber les CPI lorsque les interactions sont maximales, il sera possible de le translater à d'autres ratio où les interactions sont moins nombreuses.

Des complexes polyioniques collagène/THA ont été formés entre les pH 2,5 et 5,5 comme visualisé sur les images macroscopiques de la Figure 82(A). La formation des complexes a été également détectée par mesure de la turbidité des solutions (Figure 82(C)). A pH 1, une solution transparente est obtenue attestant de l'inhibition des complexes et s'accompagnant d'une turbidité nulle. Ainsi, l'utilisation d'une solution à pH très acide (pH 1) permet d'inhiber les interactions entre le THA et le collagène en raison du pKa des acides carboxyliques du THA (Brown and Jones, 2005). En effet, à pH 1, les acides carboxyliques du THA sont sous leur forme protonée rendant neutre le biopolymère. En le neutralisant, les interactions électrostatiques n'existent plus. Par conséquent, la solution est transparente et homogène. L'ultrastructure des solutions de collagène/THA a également été étudiée par Cryo-MEB (Figure 82(A)). A partir d'un

pH 4,5, des autoassemblages locaux sont présents comme observé. A pH 5,5, la formation de fibrilles est clairement observée.

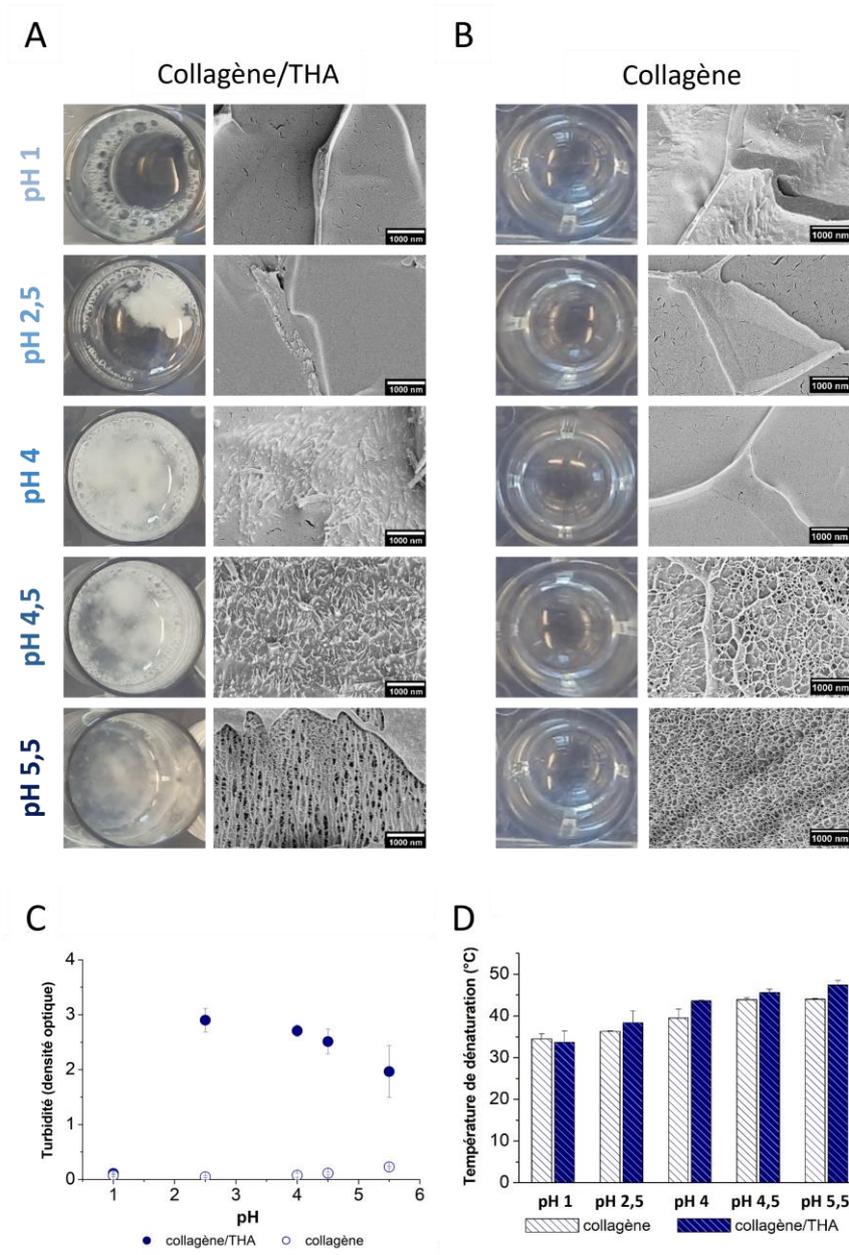


Figure 82 : Observations macroscopiques et par Cryo-MEB (A) des solutions de collagène/THA et (B) des solutions de collagène en fonction du pH et (C) leur turbidité et (D) leurs températures de dénaturation associées.

Afin de mieux comprendre l'apparition de ce réseau fibrillaire, la même étude a été conduite pour les solutions de collagène préparées au même pH. Il a été observé que les solutions de collagène devenaient très légèrement troubles à partir du pH 4,5. L'étude de leur ultrastructure a démontré que lorsque le pH des solutions de collagène pure augmentait, des fibrilles se formaient en solution à partir du pH 4,5. Ces fibrilles deviennent plus nombreuses et épaisses lorsque l'on se rapproche du point isoélectrique du collagène (pH 6) c'est-à-dire à un pH 5,5

(Figure 82(B)). La turbidité des solutions de collagène augmente légèrement à partir du pH 4,5, phénomène plus marqué à pH 5,5 (Figure 82(C)). Par conséquent, ces fibrilles de collagène se forment avant le mélange avec le THA.

La présence de fibrilles en solution influence la stabilité thermique du collagène mesurée par DSC (Figure 82(D)). En effet, la température de dénaturation du collagène augmente progressivement à partir du pH 4 pour atteindre 45 °C à pH 5,5, soit une augmentation de 10°C par rapport aux solutions à pH 1. La température reste similaire qu'il s'agisse des mélanges ou des contrôles de collagène. Il est à noter que la formation des complexes polyioniques ne modifie pas la température de dénaturation du collagène. Néanmoins, la présence de fibrilles de collagène en solution pourrait influencer la complexation entre le collagène et le THA.

II. Effet de la force ionique sur la formation des complexes polyioniques

L'impact de la force ionique sur la formation des CPI a également été étudié. L'ajout de sels est couramment utilisé en formulation pour écranter les charges d'une molécule et de ce fait inhiber les interactions. Ceci a pour but d'obtenir un mélange homogène. Chen et *al.*, dans leurs travaux, ont étudié l'impact des sels monovalents ou divalents sur les interactions entre collagène et acide hyaluronique (Chen et al., 2014). La nature des ions utilisés n'influe pas la performance d'écrantage. C'est pourquoi nous avons utilisé un sel monovalent de type NaCl. Ce sel a été ajouté à 400 mM aux solutions stocks de collagène ou de THA dans la gamme de pH considérée (1 à 5,5) avant toute étape de mélange. Une fois les mélanges effectués, la complexation a été évaluée par des observations macroscopiques, la mesure de la turbidité et la stabilité thermique. Une analyse de l'ultrastructure des solutions a également été effectuée par Cryo-MEB.

Les observations macroscopiques des solutions de collagène/THA en présence de sel ont démontré qu'à pH 1, aucun CPI n'était formé résultant en la formation de solutions homogènes et transparentes (Figure 83(A)). Les observations en Cryo-MEB confirme cela puisqu'aucune trace d'auto-assemblage n'est présente. Ces résultats étaient attendus car aucun CPI ne sont formés déjà sans ajout de sel du fait de la forme neutre du THA à ce pH. A pH 2,5, les complexes semblent plus dispersés en solution et moins nombreux que dans les solutions sans sel. Ceci se confirme avec la mesure de turbidité (Figure 83(C)) puisque cette mesure est divisée par deux lorsque l'on ajoute du NaCl. Cette condition paraît donc être un état transitoire pour lequel les

complexes commencent à se former. Par conséquent, l'ajout de sel permet d'augmenter le pH auquel la complexation débute.

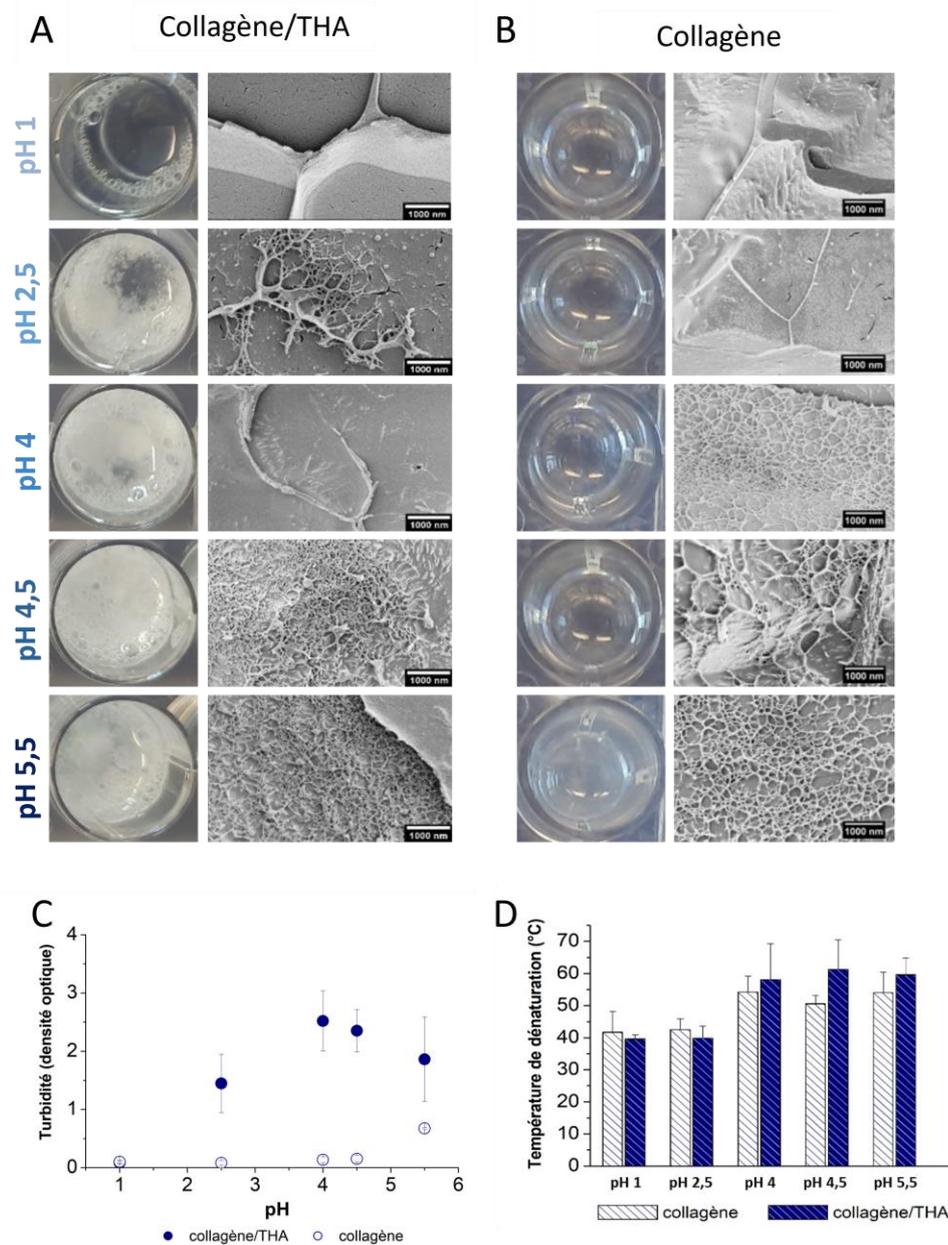


Figure 83 : Observations macroscopique et par Cryo-MEB (A) des solutions de collagène/THA et (B) des contrôles de collagène selon le pH en présence de NaCl à 400 mM et (C) leur turbidité et (D) leurs températures de dénaturation associées.

Au-delà du pH 2,5 les complexes sont formés se traduisant par un plateau sur la mesure de turbidité et l'observation macroscopique de CPI (Figure 83(A) et (C)). Néanmoins, à pH 5,5, il semble que les complexes soient plus petits et dispersés dans une solution blanche laiteuse ne ressemblant pas aux autres conditions où les CPI précipitent en formant de gros blocs. Cette

inhibition de CPI à pH 5,5 est confirmée par une mesure de turbidité inférieure à celle mesurée à pH 4,5.

En comparant ces résultats à ceux obtenus avec les solutions de collagène pur, nous nous sommes aperçus qu'à pH 5,5, la solution stock de collagène contenant du NaCl à 400 mM était trouble (Figure 83(B)). Cette observation a également été confirmée après mesure de la turbidité de ces solutions de collagène pure où la turbidité du collagène à pH 5,5 a été multipliée par 3 en ajoutant des sels (Figure 83(C)). La solution de collagène à pH 5,5 était la seule pour laquelle la turbidité augmente. Lorsqu'une solution de collagène blanchit, ceci peut être attribué à la fibrillogénèse. En effet, les macromolécules qui s'assemblent forment des objets plus gros, les fibrilles. Lorsqu'un faisceau de lumière est appliqué sur ces objets, la diffusion ne se fait pas comme dans une solution composée de plus petits objets qui diffusent complètement la lumière. Ainsi la mesure de la turbidité prend en compte deux phénomènes potentiels : une augmentation due à la présence des fibrilles de collagène et une potentielle inhibition des CPI.

Pour vérifier ce phénomène, les mélanges et les contrôles ont été observés au Cryo-MEB (Figure 83(A) et (B)). En fait, les solutions de collagène se sont avérées former des fibrilles à partir d'un pH 4 lorsque le sel était ajouté. Dans le cas des mélanges, cela débute à un pH 4,5. Les CPI sont formés à partir du pH 2,5 où le THA est chargé déclenchant la complexation. Aux pH compris entre 2,5 et 4,5, la complexation est à son maximum. Les fibrilles qui sont formées localement dans les solutions de collagène à pH 4 en présence de sels ne sont pas assez nombreuses pour prévenir la complexation. En effet, plus il y a de fibrilles de collagène en solution, moins le collagène est disponible pour interagir avec le THA. A pH 4, alors que les solutions de collagène possèdent des fibrilles en solution, elles ne sont pas observées dans le cas du mélange collagène/THA et les complexes sont formés. La température de dénaturation de ces solutions est caractéristique de la présence de fibrilles de collagène (supérieure à 53°C). Néanmoins, dans ce cas, la présence de fibrilles n'est pas suffisante pour inhiber la formation des complexes qui est maximale à ce pH. Les fibrilles sont instables et pourraient être dénaturées partiellement par la complexation avec le THA. En augmentant le pH à 5,5, l'état de charge du collagène devient de plus en plus neutre ce qui favorise les interactions collagène/collagène au détriment des interactions électrostatiques collagène/THA. Un réseau fibrillaire est observé en Cryo-MEB pour les solutions de collagène ainsi que pour les solutions collagène/THA. Ainsi la turbidité pourrait être attribuée principalement à la présence de fibres et non à la formation de CPI.

Le pH 5,5 pourrait donc être une alternative à l'utilisation d'un pH acide pour écranter les charges et former une encre homogène sans complexes. Ceci semble prometteur de par la meilleure cytocompatibilité vis-à-vis des conditions acides. En effet, notre encre ayant pour

objectif d'être mise en contact avec des cellules, il est impératif que celle-ci ne soit pas nocives pour le matériel biologique.

Enfin, la condition à pH 5,5 s'est avérée avoir la meilleure stabilité thermique (environ 60°C), ce qui est supérieur à la signature des fibrilles de collagène (Figure 83(D)). Ceci est cohérent avec l'observation de fibrilles à ces conditions de pH et de force ionique. De plus, cela atteste de la stabilisation des fibrilles de collagène par les phénomènes de complexation présents mais atténués. Il s'agit donc d'un état transitoire lors duquel l'auto-assemblage local de fibrilles de collagène débute et permet d'affaiblir les phénomènes de complexation.

Chapitre 2 : La fibrillogénèse du collagène à partir des mélanges collagène/THA

Une fois les interactions entre le collagène et le THA à différents pH et force ionique étudiées, nous avons souhaité tester l'impact de ces conditions physicochimiques sur la capacité du collagène à former des fibrilles et à gélifier. En effet, les interactions avec le THA pourraient perturber l'auto-assemblage du collagène sous forme de fibrille et sa gélification.

I. Impact de la formation de complexes polyioniques sur la structure fibrillaire du collagène

La gélification et la fibrillogénèse du collagène ont été déclenchées au contact de vapeurs d'ammoniaque pendant 24h jusqu'à atteindre des solutions à pH 11. Au bout d'une heure, les mélanges et les contrôles de collagène commençaient déjà à blanchir synonyme du début de la fibrillogénèse. Après 24h, des bains de neutralisation au PBS 1X ont été effectués. Les échantillons ont été soit fixés et séchés pour observation au microscope électronique à balayage (MEB) soit observés à l'état hydraté soit lyophilisés pour étude de leur stabilité thermique. Après exposition aux vapeurs d'ammoniaque, les échantillons récupérés ont été observés macroscopiquement pour évaluer la formation d'un gel puis au MEB pour observer la présence de réseaux fibrillaires (Figure 84).

Pour les contrôles de collagène, seul l'hydrogel formé à 10^{-1} M avec sel est présenté puisque les résultats sont identiques quel que soit le pH et la force ionique utilisés. Des hydrogels blancs rigides sont systématiquement formés et possèdent une ultrastructure formée de longues fibres monodisperses agencées en un réseau défini (Figure 84(A)).

Selon les conditions, des hydrogels ne sont pas systématiquement formés pour les mélanges collagène/THA (Figure 84(B)). A pH 1 en présence ou non de sels, des hydrogels rigides blancs sont formés. Il s'agit de conditions pour lesquelles les CPI sont inhibés grâce à la neutralisation du THA puisque les acides carboxyliques sont protonés et donc neutres. L'ultrastructure de ces hydrogels est fibrillaire et régulière tout comme le réseau contrôle de collagène. Les solutions entre pH 2,5 et 5,5 sans sel qui présentaient des CPI en solution n'ont pas formé de gel mais les complexes formés en solution ont gonflé. La gélification du collagène des complexes a été notamment observée au MEB à travers l'apparition de réseaux fibrillaires

grossiers et désorganisés. La complexation a par conséquent perturbé la fibrillogénèse du collagène.

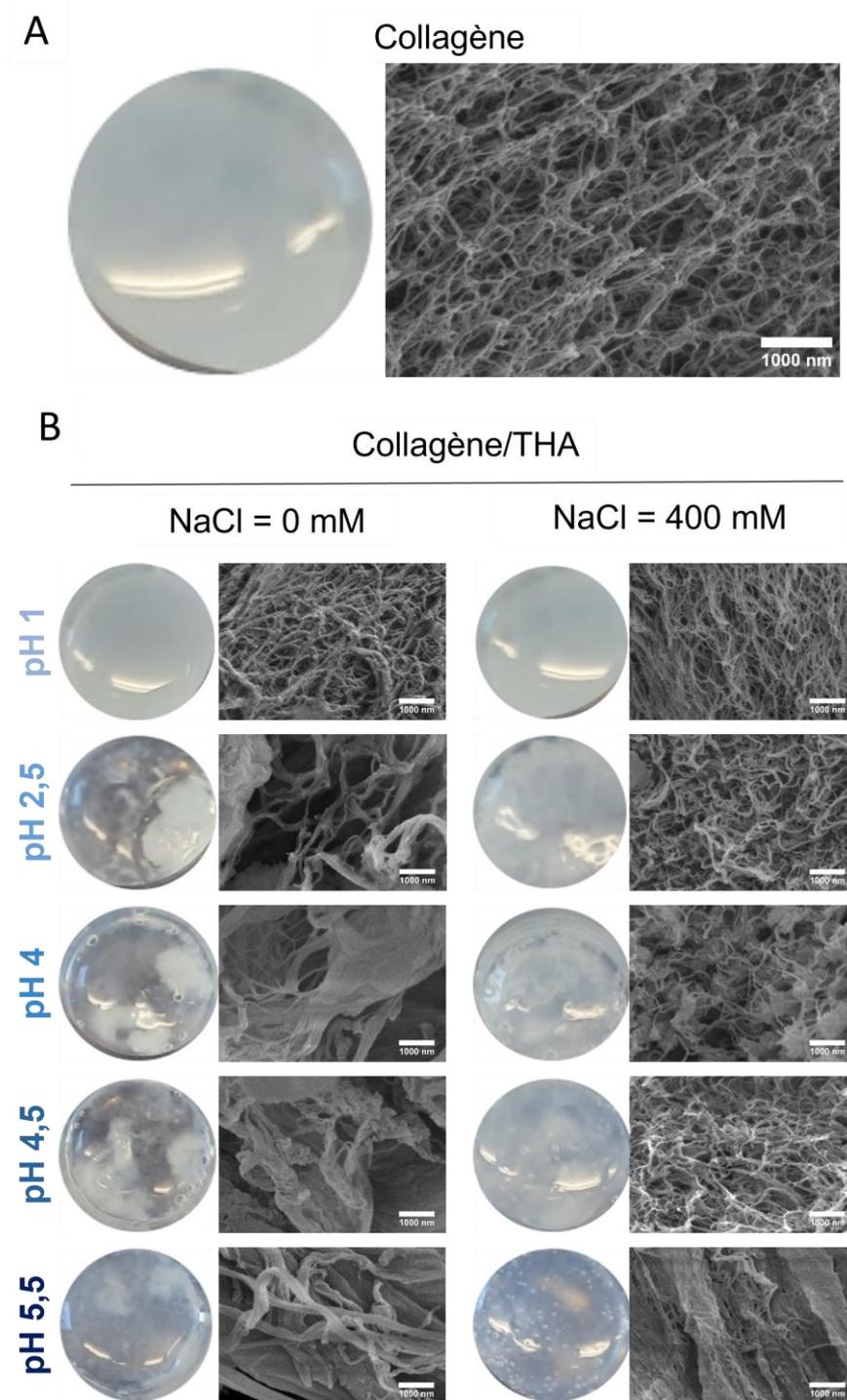


Figure 84 : Ultrastructure du réseau de collagène observé au MEB à x20k des (A) hydrogels collagène/THA et (B) des hydrogels de collagène pur.

En présence de sels, des hydrogels ont été formés pour toutes les conditions de pH (Figure 84(B)). Cela montre que l'auto-assemblage menant à la formation d'hydrogels est rétabli par ajout de sel. Néanmoins, les conditions pour lesquelles la complexation était maximale en solution, à

pH 4, ont formé des hydrogels si fragiles et mous qu'ils peuvent difficilement être manipulés sans rompre. Leur ultrastructure semble fibrillaire et définie même si quelques agrégats moins organisés sont observables au sein du réseau observé en MEB (Figure 84(B)). La condition à pH acide pour laquelle les CPI étaient partiellement inhibés, c'est-à-dire à pH 2.5 en présence de sel, a permis la formation d'hydrogels blancs bien définis et compacts d'aspect rigide tout comme ceux formés à pH 1. L'ultrastructure en ces conditions est similaire au contrôle de collagène puisqu'un réseau de fibrilles de collagène défini et organisé est présent (Figure 84(B)). Un hydrogel blanc et homogène a également été formé à pH 5,5 en présence de sel qui correspond à la condition pour laquelle les CPI étaient affaiblis et dispersés en solution. Un réseau fibrillaire homogène et défini du collagène est formé après gélification sous vapeurs d'ammoniaque. Dans ces conditions, ceci est dû à la formation de fibrilles dans les solutions de collagène qui sont disponibles en nombre suffisant pour pouvoir gélifier une fois mélangés au THA puisque les phénomènes de complexation sont affaiblis.

Finalement, lorsque les CPI sont inhibés (pH acides) ou affaiblis (pH 5,5 avec NaCl), le réseau fibrillaire spécifique au collagène pur est reformé de manière classique. Les fibrilles observées sont monodisperses et bien définies attestant de l'efficacité de la fibrillogénèse à pH 5,5 malgré la présence de THA.

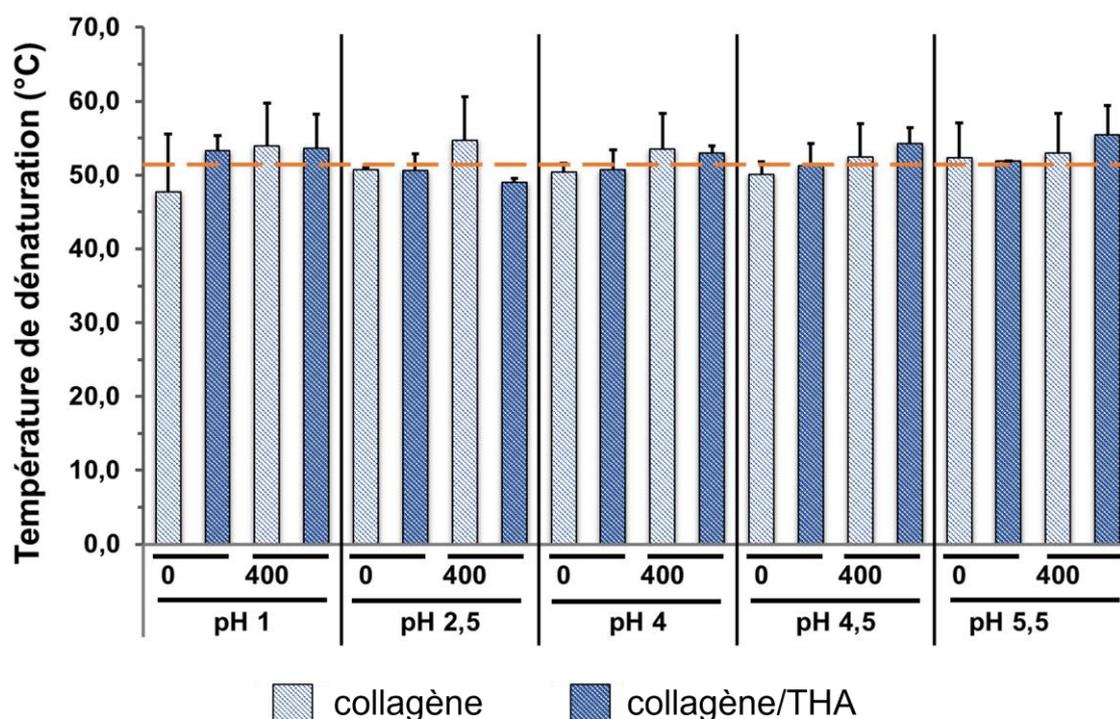


Figure 85 : Température de dénaturation des hydrogels collagène/THA et pures collagène fibrillés au contact de vapeurs d'ammoniaque mesurée par DSC (Les valeurs 0 et 400 correspondent aux concentrations en NaCl pour chacune des conditions).

Dans un second temps, la stabilité thermique des hydrogels collagène/THA et collagène pur a été étudiée. Ceci a pour but d'évaluer si la fibrillogénèse du collagène peut s'opérer dans de bonnes conditions en fonctions des paramètres physico chimiques des solutions. Pour cela les échantillons ont été caractérisés par DSC pour détecter une transition endothermique caractéristique de la température de dénaturation du collagène. Lorsque le collagène est sous forme de fibrilles matures, sa température de dénaturation est de l'ordre de 53°C. Si elle est plus faible, cela signifie que les fibrilles ne sont pas matures et stables alors que si elle est plus élevée, cela est caractéristique d'une stabilisation des fibrilles.

Quelles que soit les conditions de pH et de force ionique, une température de dénaturation autour de 53°C est mesurée pour les hydrogels de collagène pures et les hydrogels collagène/THA (Figure 85). Ceci est significatif de la présence de fibrilles matures dans l'ensemble des hydrogels étudiés.

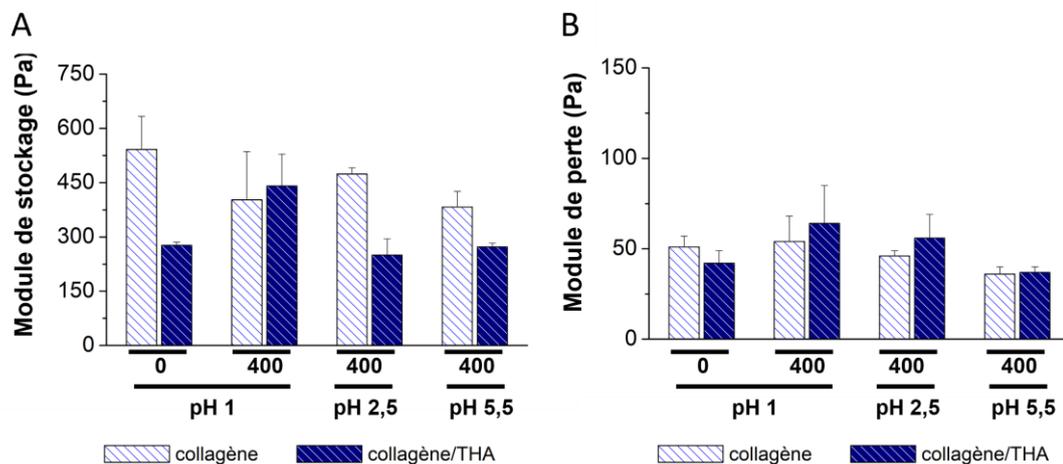


Figure 86 : Propriétés viscoélastiques mesurées en cisaillement avec (A) le module de stockage et (B) le module de perte des hydrogels de collagène et de collagène/THA fibrillés.

Les propriétés mécaniques des hydrogels formés à pH 1 avec ou sans sel et à pH 2,5 et 5,5 avec sel ont été analysées par mesure de la viscoélasticité des gels par rhéométrie. La viscoélasticité se détermine par la mesure de deux modules. Le module de stockage renseigne sur la composante élastique du matériau c'est-à-dire sa capacité à se comporter comme un solide élastique. Le module de perte permet de rendre compte de la partie visqueuse responsable d'une dissipation d'énergie et caractéristique des liquides visqueux. Lorsque le module de stockage est supérieur au module de perte, ce qui est le cas ici, cela signifie que l'on a affaire à un matériau viscoélastique dont la composante élastique est majoritaire. Ceci est le cas des hydrogels. La présence de THA ne semble pas affecter l'élasticité du réseau puisqu'un module de stockage de l'ordre de 300 Pa est obtenu pour les hydrogels formés à partir de solutions avec sel (Figure 86). Le module de perte est également mesuré autour de 50Pa pour toutes les conditions. On a bien

un module de stockage supérieur au module de perte caractéristique des hydrogels. Les propriétés mécaniques restent tout de même assez faibles et mériteraient à être améliorées par la suite.

II. Etude des interactions entre collagène et acide hyaluronique après gélification du collagène

Les interactions intervenant dans le phénomène de complexation ont été étudiées par ATR-FTIR pour un double objectif. Le premier était d'élucider quelles fonctions étaient engagées dans la complexation afin de mieux comprendre les perturbations observées précédemment. Le second objectif était de parvenir à différencier des échantillons avec présence de CPI et ceux où les CPI étaient inhibés.

1. Nature des interactions impliquées dans le phénomène de complexation

Les spectres infrarouges ont été enregistrés dans une large gamme de nombre d'ondes allant de 700 cm^{-1} à 3700 cm^{-1} . Néanmoins, nous savons que la zone d'intérêt des protéines est comprise entre 750 et 1750 cm^{-1} . Dans cette gamme, des vibrations caractéristiques des liaisons amides sont notamment visibles. Par exemple, les amides primaires possèdent une bande de vibration à 1650 cm^{-1} .

L'intérêt d'étudier cette zone est d'autant plus important que le THA possède également des vibrations dans celles-ci. En effet, les acides carboxyliques du THA résonnent à 1620 cm^{-1} , 1420 cm^{-1} ainsi que dans la gamme $1030\text{-}1080\text{ cm}^{-1}$.

Il nous a été possible d'étudier les interactions en comparant les vibrations de quatre échantillons. Les contrôles d'hydrogels de collagène purs ont été analysés après fibrillation et ceux de THA ont été analysés en poudre. En effet, le THA n'étant pas réticulé sur les mélanges à ce stade, il fallait le comparer sous la même forme, c'est-à-dire libre. Finalement, deux conditions de mélanges collagène THA ont été étudiées : l'une correspondant au maximum de complexation observée (pH 4,5 sans sel) et l'autre correspondant au maximum d'inhibition du phénomène (pH 1 sans sel). Cela donne lieu au spectre FTIR présenté en Figure 87.

En FTIR, deux phénomènes sont principalement interprétables : un décalage du nombre d'ondes d'une bande ou un changement d'intensité. Ici, deux pics, visibles sur ce spectre vers 1050 cm^{-1} sont communs aux deux polymères purs. Ils correspondent à des déformations C-O et C-O-C. Néanmoins, s'ils sortent aux mêmes nombres d'ondes, ils diffèrent en intensité selon s'il

s'agit de THA pur (courbe rose) ou de collagène pur (courbe bleu foncé). Alors que cette vibration est d'intensité forte dans le THA, elle est nettement moins intense pour le collagène (Figure 87).

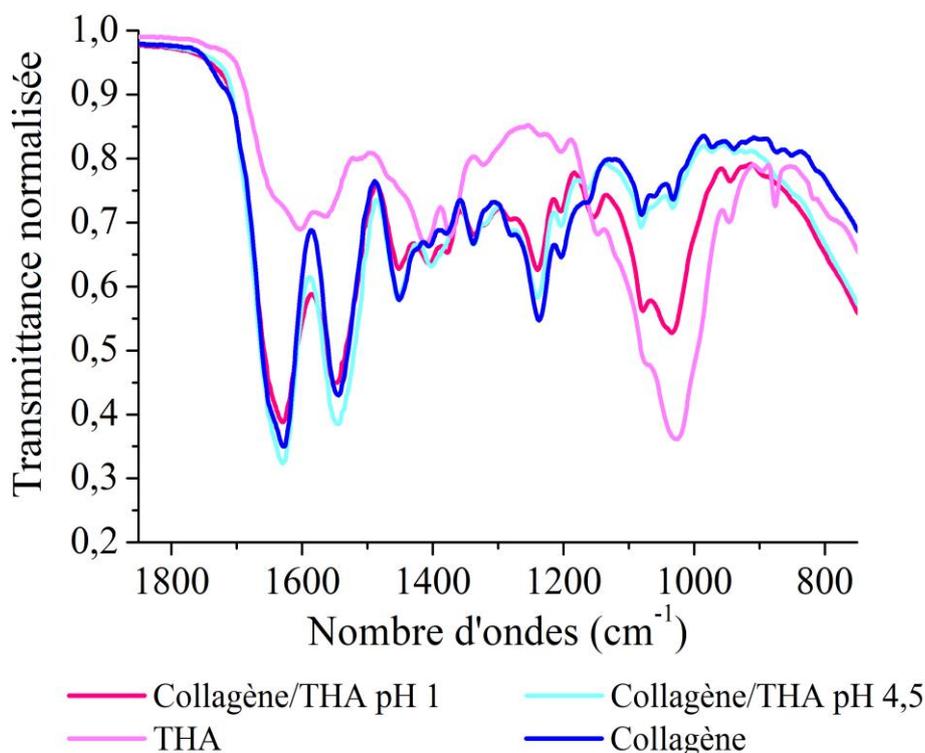


Figure 87 : Spectre ATR-FTIR comparatif des hydrogels collagène/THA avec les hydrogels de collagène et de THA pur.

Cette même bande composée de deux pics est également présente dans les hydrogels de collagène/THA. Néanmoins, selon si l'hydrogel possède des CPI (pH 4,5) ou s'il est homogène sans complexation (pH 1), l'intensité diffère. En présence de complexes, le pic à 1050 cm⁻¹ est de faible intensité s'apparentant au spectre du collagène pur alors qu'en absence de complexes celui-ci est de forte intensité semblable à celle du THA. Ceci signifie que l'interaction entre le collagène et le THA est suffisamment forte pour masquer le pic de forte intensité spécifique aux fonctions carbohydratés du THA (Figure 87).

L'allure des spectres présentant la formation ou l'inhibition des CPI des hydrogels collagène/THA reste tout de même similaire en termes de bandes et de nombres d'ondes correspondant, attestant de la même structure chimique. Cependant, Chen et *al.* ont démontré par analyse IR 2D que la présence des CPI engendrait des changements de conformation. L'auto-pic de la bande amide I à 1655 cm⁻¹ se retrouve décalée dû à la déstabilisation de la conformation des triples hélices de collagène par la présence de CPI (Chen et al., 2014). Ce changement de

conformation peut affecter le phénomène de fibrillogénèse puisque l'auto-assemblage est modifié. Ceci résulte en la formation des réseaux grossiers observés précédemment au MEB.

2. Méthode de différenciation des hydrogels avec ou sans CPI

Précédemment, il a été démontré que l'intensité des deux pics autour de 1050 cm^{-1} étaient directement affectée par le phénomène de complexation polyionique. L'étude de ces mêmes pics a par conséquent été utilisée afin de différencier de manière factuelle les hydrogels contenant des CPI et ceux homogènes sans complexation.

Pour cela, si les deux pics se manifestent par une intensité élevée, comme c'est le cas pour le contrôle de THA, il s'agit d'hydrogels sans CPI. En effet, le THA est sous sa forme libre et les vibrations correspondant aux fonctions carbohydratés ne sont pas masquées. A contrario, si les deux pics possèdent une intensité faible, cela signifie que des CPI ont été formés puisqu'il y a absence de la vibration spécifique au THA libre.

Ainsi, nous avons pu vérifier l'état de complexation des hydrogels mixtes en fonction du pH d'une part puis de la force ionique d'autre part.

2.1. Hydrogels de collagène/THA en fonction du pH

Les hydrogels collagène/THA ont été analysés sans sels dans la gamme de pH précédemment étudiée après fibrillogénèse et gélification du collagène (Figure 88). Au préalable les hydrogels ont été séchés au lyophilisateur afin de ne pas polluer les spectres avec le solvant.

Comme observé en Figure 88, le pH 1 possède la signature du THA avec une forte intensité (Figure 88, courbe bleue foncée). Pour cette condition, les complexes sont inhibés comme vu précédemment. En effet, à pH 1 qui est inférieur au pKa des acides carboxyliques du THA, ces derniers sont sous leur forme protonée. La macromolécule étant neutre, les interactions électrostatiques sont inhibées et l'hydrogel généré est homogène. Le THA est donc sous sa forme libre.

Les quatre autres conditions de pH sont caractérisées par de faibles intensités des pics à 1050 cm^{-1} (courbes cyan, rose foncé, violette et rose clair). Il s'agit des pH 2,5, 4, 4,5 et 5,5 spécifiques aux hydrogels où des CPI ont été observés macroscopiquement ainsi qu'au MEB. Néanmoins l'intensité de cette bande varie selon le pH. Ici, les lignes de base des spectres sont superposés et il existe un pic de référence dont l'intensité ne varie pas ou très peu entre les conditions (Amide I à 1650 cm^{-1}). Dès lors, il est possible de comparer les intensités du pic à 1050

cm⁻¹ entre les conditions. Cela nous permet de comparer la saturation de la complexation selon le pH.

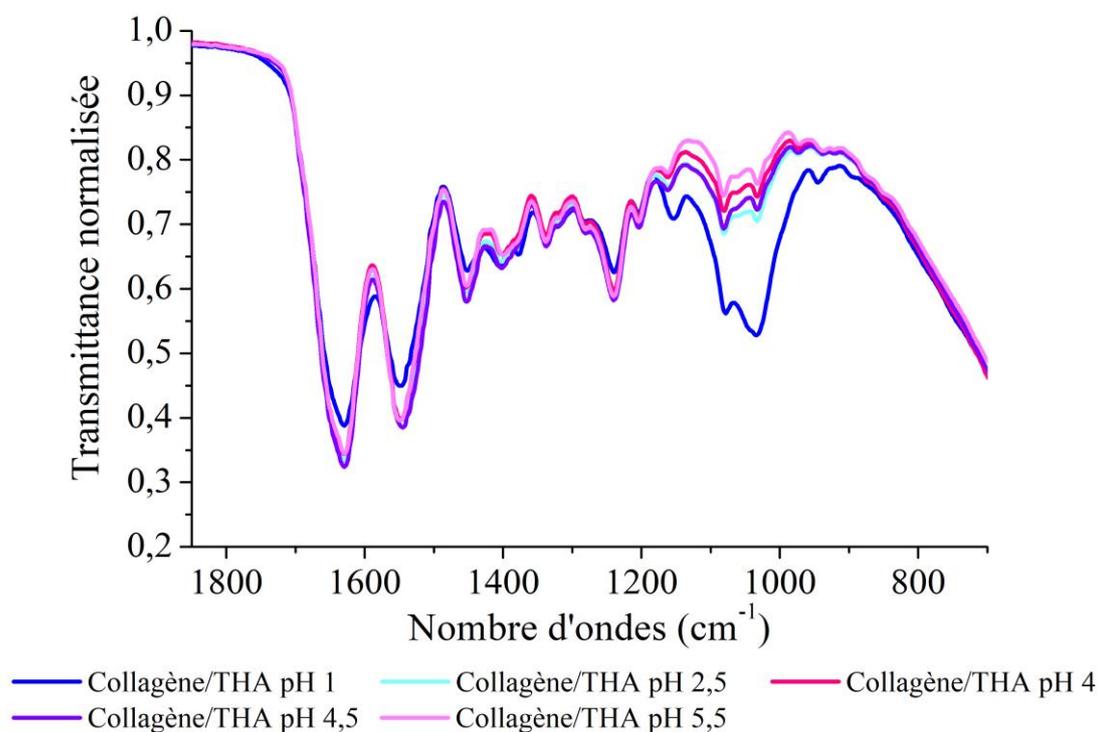


Figure 88 : Effet du pH des hydrogels collagène/THA sur les vibrations du spectre FTIR analysé.

Ici, l'intensité est graduelle en fonction du pH. On observe alors que l'intensité diminue avec l'augmentation du pH attestant d'une plus grande complexation en CPI. Les CPI semblent initier leur formation à pH 2,5 qui correspond au pKa des acides carboxyliques du THA et donc à l'instant où le THA se charge négativement. L'intensité diminue de plus en plus à mesure que le pH augmente de par l'état de charge plus important du THA qui favorise les interactions électrostatiques avec le collagène qui est chargé positivement même à pH 5,5.

2.2. Hydrogels collagène/THA en fonction de la force ionique

Les hydrogels formés en présence de sels dans la gamme de pH 1-5.5 ont été étudiés. L'augmentation de la force ionique grâce à l'addition de NaCl à 400 mM dans les solutions de collagène et de THA semble impacter directement les phénomènes de complexation (Figure 89). Ces derniers sont toujours visibles après la gélification du collagène. Ici, les spectres FTIR révèlent que seulement deux conditions présentent des complexes. Il s'agit des pH 4 et 4,5 pour lesquels l'intensité de la bande à 1050 cm⁻¹ est faible (courbes rose foncé et violette).

Les pH 1 et 2,5 ne présentent pas de phénomène de complexation car le pic à 1050 cm⁻¹ est d'intensité forte comme c'est le cas pour le contrôle de THA (courbes bleu foncé et cyan).

En ce qui concerne le pH 1, ceci est directement lié à l'état de charge neutre du THA.

Pour le pH 2,5, ceci est directement imputable à la présence de sel. En effet, comme vu précédemment, en l'absence de sels, le THA est chargé négativement à pH 2,5 entraînant le début des interactions électrostatiques entre collagène et THA. En ajoutant 400 mM de NaCl, les charges du THA qui sont peu nombreuses ont été écrantées, de ce fait, modulant l'interaction du THA avec le collagène. A 400 mM, la force ionique est suffisante pour écranter les charges du THA et ainsi prévenir la complexation.

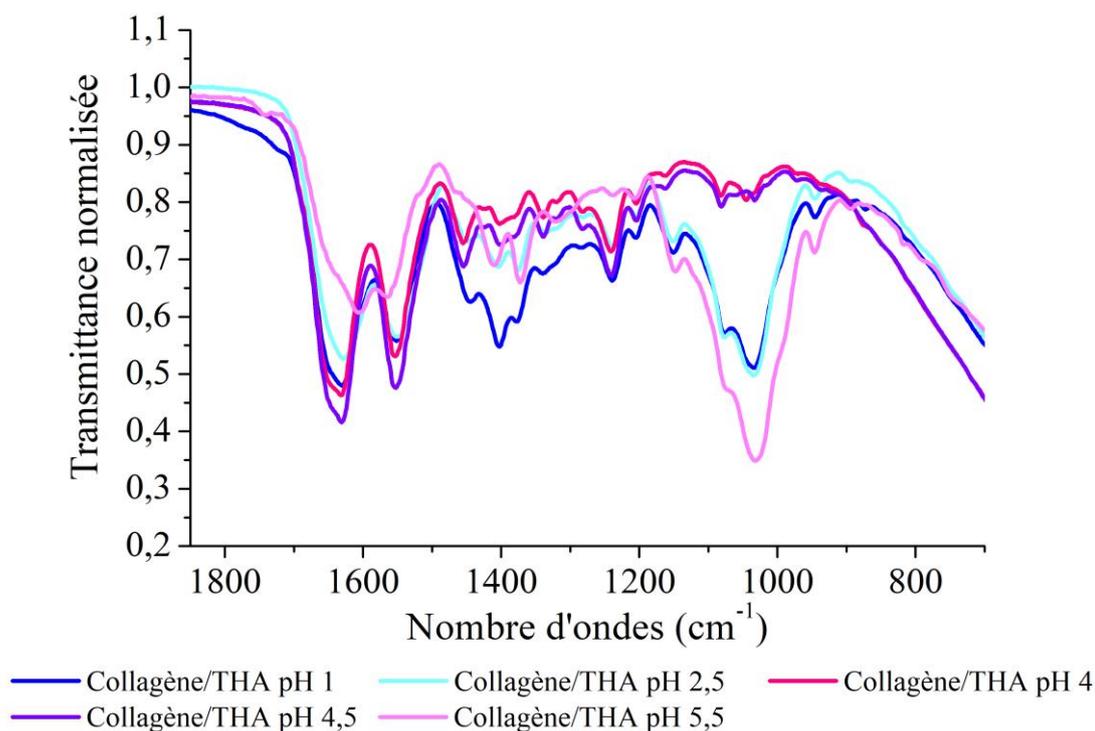


Figure 89 : Impact de la force ionique sur les vibrations FTIR des hydrogels collagène/THA.

Selon le spectre FTIR présenté ici, il semblerait que l'écrantage soit total puisque l'intensité de la bande est la même que pour le pH 1 où les CPI sont totalement inhibés. Néanmoins, en observant les solutions, les solutions n'étaient pas totalement transparentes à pH 2,5. Nous pensons donc que l'ajout de sel permet ici d'affaiblir suffisamment les interactions pour ne pas perturber la fibrillogénèse et la formation du réseau de collagène (résultats du MEB).

Une troisième condition s'est avérée être efficace dans la prévention des CPI. A pH 5,5 en présence de sel, l'intensité de la bande à 1050 cm^{-1} est maximale puisqu'elle dépasse même celle de la condition à pH 1 (courbe rose clair). Ceci signifie que les complexes polyioniques ont été totalement inhibés. Néanmoins, macroscopiquement des mélanges troubles blanchâtres étaient observés précédemment.

Après avoir mis en lien toutes les caractérisations effectuées sur les solutions et les gels, nous pensons que l'inhibition des CPI à pH 5,5 en présence de sel repose sur le phénomène de fibrillogénèse du collagène en solution. En effet, des solutions troubles étaient déjà observées à pH 5,5 en présence de sel sur les contrôles de collagène. La turbidité étant généralement synonyme de formation de micro-objets et donc de fibrilles, nous les avons observées par Cryo-MEB. Là, les solutions se sont avérées former un début d'auto-assemblage confirmé par la présence de fibrilles et par la température de dénaturation qui augmentait.

A pH 5,5 en présence de sel, nous nous approchons du point isoélectrique du collagène (autour de 6). A ce pH, l'état de charge des triples hélices diminue de plus en plus pour s'approcher de la neutralité permettant l'auto-assemblage en fibrilles. Ces dernières ont une charge presque nulle (Gobeaux et al., 2008). Ainsi, de par l'état de charge des triples hélices qui est moins important et de par la présence de fibrilles, le collagène est moins susceptible d'être disponible pour interagir avec le THA même si ce dernier est chargé. C'est donc l'induction d'un début de précipitation du collagène sous forme de fibrilles qui permet d'inhiber les CPI à pH 5.5.

Cette dernière condition nous a semblé très intéressante dans la perspective de mettre nos encres au contact de cellules. En effet, un pH acide est beaucoup trop cytotoxique pour les cellules et donc incompatibles. En utilisant une encre à pH 5,5, ceci permettrait de diminuer cette cytotoxicité et de pouvoir encapsuler les cellules dans cette encre.

Chapitre 3 : Gélification de l'acide hyaluronique par réticulation chimique

Le tissu que nous cherchons à modéliser dispose de propriétés mécaniques très élevées difficilement reproductibles. Pour rappel, l'Annulus Fibrosus se caractérise notamment par son anisotropie et ses modules en tension, en compression et en cisaillement selon diverses orientations (Long et al., 2016). Les fibres dans les lamelles disposent par exemple d'un module axial en tension de 180 MPa. Le module de compression axial du tissu est compris entre 0,4 et 3 MPa alors que le module en cisaillement est compris entre 0,1 et 0,28 MPa. Afin de tirer profit au mieux de notre système, nous avons cherché à renforcer nos hydrogels en effectuant une réticulation chimique du THA. En plus d'augmenter les propriétés mécaniques du matériau, cela permet de former un réseau de THA interpénétré dans celui du collagène

Pour cela, nous avons utilisé les données bibliographiques provenant de notre état de l'Art pour sélectionner le mode de la réticulation. La réticulation enzymatique nous a paru être une méthode idéale en raison de sa cinétique de gélification rapide dans des conditions douces et physiologiques. Nous nous sommes appuyés sur les travaux d'Antoine Frayssinet, ancien doctorant du laboratoire, afin d'adapter cette voie de réticulation enzymatique à notre projet.

I. Réticulation enzymatique à la Peroxydase de Raifort (HRP)

1. Optimisation des paramètres de réticulation enzymatique du THA

Dans un premier temps, il nous a fallu adapter les paramètres de réticulation enzymatique. Ces derniers sont directement liés aux produits utilisés dans ce système, c'est-à-dire le peroxyde d'hydrogène et la HRP. Ainsi, on peut faire varier la concentration de l'un ou de l'autre pour moduler les propriétés du réseau obtenu. Afin de former un réseau et donc un hydrogel, il faut suffisamment de HRP et de H_2O_2 pour former des nœuds de réticulation. La HRP est responsable de la vitesse de réticulation du réseau alors que le H_2O_2 module la densité de réticulation. Avec ces données en tête, nous avons conduits des tests préliminaires pour former des hydrogels de THA purs à différentes concentrations en THA et en HRP.

Une solution de THA à 3% en masse a été préparée et la réticulation a été faite sur 1 mL de THA pour chaque condition testée. Trois concentrations finales en HRP ont été testées : 0,01 $U.mL^{-1}$, 0,1 $U.mL^{-1}$ et 1,5 $U.mL^{-1}$. Deux concentrations finales en H_2O_2 ont été conduites : 0,3mM (concentration minimale critique pour former un hydrogel) et 1mM.

Après 15 minutes à température ambiante, les hydrogels ont été observés puis ensuite caractérisés au MEB.

Lorsque la concentration en HRP était de $0,01 \text{ U.mL}^{-1}$, la gélification n'a pas eu lieu quelle que soit la concentration de H_2O_2 malgré une augmentation de sa viscosité. Lorsque la concentration en HRP est de $0,1 \text{ U.mL}^{-1}$, des hydrogels sont formés synonymes de réticulation malgré leur tenue mécanique très faible. Enfin, à une concentration en HRP de $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$, des hydrogels rigides totalement réticulés sont formés.

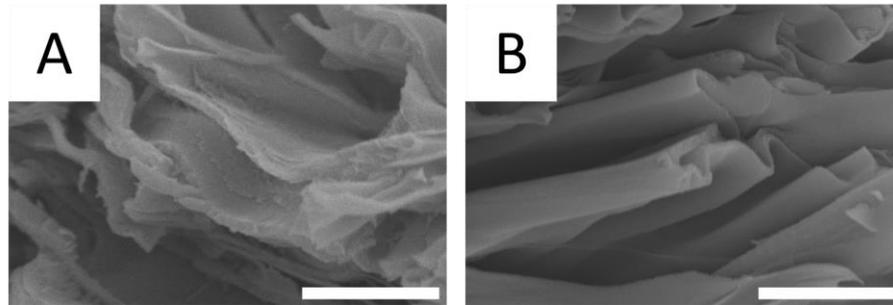


Figure 90 : Ultrastructure en voiles des hydrogels de THA formés à $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$ en HRP et (A) $0,3 \text{ mM}$ ou (B) 1 mM en H_2O_2 (barre d'échelle : $4 \mu\text{m}$).

L'ultrastructure du THA réticulé est caractérisée par la présence de voiles visibles en MEB (Figure 90). Ici, les voiles ne sont clairement observables que pour les photos prises à plus hautes concentrations en HRP où des hydrogels rigides sont formés c'est-à-dire à $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$. Les deux concentrations en H_2O_2 avec la HRP à $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$ ont démontré le même type de structure en voiles.

A l'issue de cette étape préliminaire, nous avons décidé de conduire la réticulation enzymatique des hydrogels collagène/THA avec une concentration en HRP de $1,5 \text{ U.mL}^{-1}$ et une concentration en H_2O_2 de 1 mM .

2. Transposition aux hydrogels collagène/THA

Une fois les paramètres fixés, nous avons essayé de transposer ce processus aux gels collagène/THA en nous inspirant de ce qu'avait déjà développé le précédent doctorant avec ce système (Frayssinet, 2020). Les hydrogels testés ici sont ceux qui ne présentaient pas de CPI dans les solutions mélangées. Cela correspond aux pH 1 avec et sans sel et aux pH 2,5 et 5,5 en présence de sel.

Le procédé consiste à déclencher simultanément la fibrillogénèse du collagène et la réticulation du THA pour former un double réseau interpénétré hybride. Pour cela, après avoir mélangé le collagène et le THA, 1 mL de PBS 5X contenant $0,1 \text{ M}$ de NaOH mélangé à la HRP

et au H_2O_2 sont ajoutés et homogénéisés par agitation. Après 1h de mise en contact à température ambiante, aucun hydrogel n'est formé. Nous pensons que cela est dû au fait que le volume de PBS est trop important pour que l'activité de la HRP soit optimale. Néanmoins, pour gélifier le collagène, la présence du bain de PBS 5X est nécessaire.

Compte tenu de ces résultats, nous avons ré-évalué le procédé de formation des hydrogels composites en l'adaptant sur deux étapes. Chaque hydrogel a été formé dans des moules faisant 8 mm de diamètre et pouvant contenir jusqu'à 400 μ L de liquide. 200 μ L de mélanges de collagène/THA ont été fibrillés dans les moules puis mis au contact de vapeurs d'ammoniaque sous dessiccateur pendant 24h. Les hydrogels ont ensuite été neutralisés dans des bains de PBS 1X successifs puis la réticulation du THA a été conduite en ajoutant la HRP et le H_2O_2 par le biais d'un bain de 100 μ L fraîchement préparé et déposé sur le gel. La réticulation a été conduite à l'abri de la lumière pendant 24h afin de laisser le temps à la HRP de pénétrer dans le réseau fibrillaire de collagène.

Les hydrogels obtenus sont présentés en Figure 91(A).

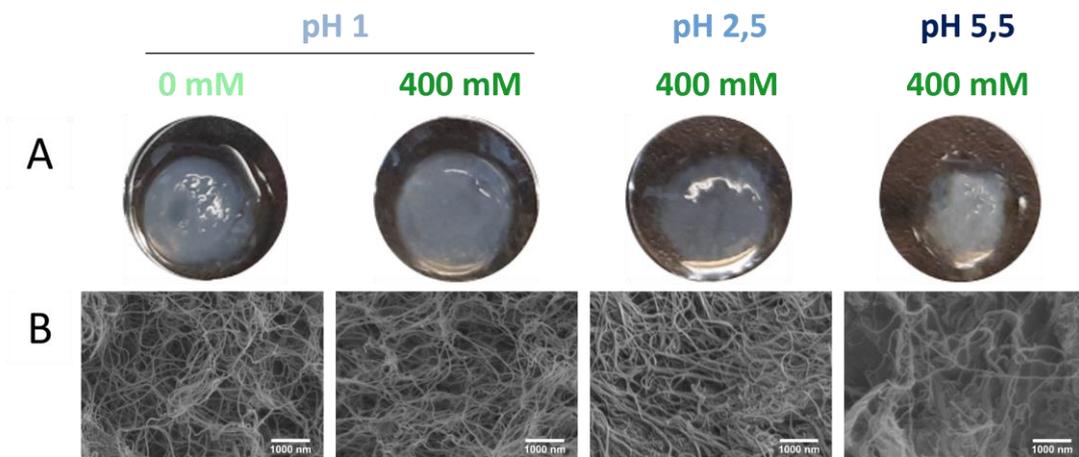


Figure 91 : (A) Observations macroscopiques et (B) ultrastructure des hydrogels collagène/THA réticulés à la HRP après fibrillation du collagène lors du protocole standard.

On observe des gels cohésifs mais dont la taille est variable selon l'échantillon considéré (Figure 91(A)). Les plus épais semblent être ceux formés à pH 1. A pH 5,5, l'hydrogel semble plus faible et plus fin. Néanmoins, après avoir observé leur ultrastructure par microscopie électronique à balayage (Figure 91(B)), aucune différence n'est détectée dans le réseau de fibrilles de collagène. Celles-ci sont présentes et définies similairement à des fibrilles de collagène pures. Ainsi, l'ultrastructure reste inchangée après réticulation enzymatique toujours typique d'un réseau fibrillaire de collagène pur.

La stabilité thermique des hydrogels a ensuite été mesurée après réticulation enzymatique comme présenté sur la Figure 92(A). La température de dénaturation n'a pas augmenté après

réticulation enzymatique puisqu'elle est toujours située autour de 53°C. Cette température est caractéristique des fibrilles de collagène. Cela montre que la réticulation ne semble ni n'avoir stabilisée ni déstabilisée les fibrilles par des liaisons collagène-THA.

La réticulation enzymatique a également été conduite sur des hydrogels de collagène purs afin de détecter son impact sur celui-ci. En effet, lorsque du collagène et/ou du THA sont réticulés à la HRP, trois types de ponts covalents peuvent être formés comme démontré lors de l'état de l'art. Des ponts de réticulation peuvent se former entre deux tyrosines du collagène ou entre deux tyramines du THA. Dans le cas où un réseau hybride serait formé comme lors de la thèse d'Antoine Frayssinet, des ponts covalents entre une tyramine du THA et une tyrosine du collagène peuvent également se former. En effet, la tyrosine et la tyramine se ressemblant par la présence d'une même substitution hydroxy sur leur cycle aromatique, la HRP peut lier les deux pour former un réseau hybride.

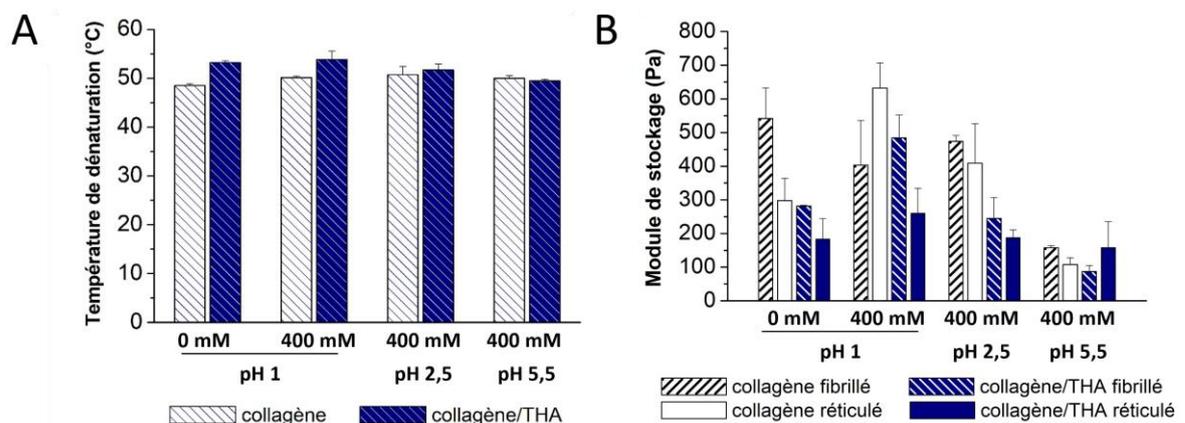


Figure 92 : (A) Température de dénaturation des hydrogels de collagène et de collagène/THA après réticulation à la HRP et (B) Module de stockage des hydrogels de collagène et de collagène/THA avant puis après réticulation enzymatique à la HRP selon le protocole standard (Les valeurs 0 et 400 correspondent aux concentrations de NaCl pour chacune des conditions).

Les propriétés mécaniques des hydrogels collagène/THA et des hydrogels de collagène ont été analysées par rhéométrie (Figure 92(B)) avant et après réticulation enzymatique. Au vu de la diminution du module de stockage après réticulation, il semblerait que la réticulation enzymatique et la génération du réseau de THA ne renforce pas les propriétés mécaniques de l'hydrogel mais plutôt l'impact négativement. Ceci est valable pour les hydrogels collagène/THA et pour les hydrogels de collagène purs. Cela peut provenir de trois facteurs. Puisque les hydrogels sont rincés au PBS post fibrillogénèse. Il est possible que le THA ait été éliminé lors des lavages. De plus, la HRP étant une enzyme, sa taille peut être un facteur limitant à sa diffusion dans le réseau fibrillaire. Néanmoins, même si cela reste vrai, ce n'est pas suffisant comme explication puisque le même phénomène est observé sur les contrôles de collagène. Enfin, nous savons que le

peroxyde d'hydrogène peut être une source de dépolymérisation des biopolymères (Jahn et al., 1999; Yamazaki et al., 2003). Peut-être qu'au lieu de renforcer le réseau, cela le déstabilise.

Afin d'optimiser le système en évitant l'élimination de THA lors des lavages, nous avons pensé à une alternative consistant à inverser les étapes de gélification.

3. Pré-réticulation du THA suivie de la fibrillogénèse du collagène

Ici, nous avons inversé les deux étapes de gélification afin d'éliminer la possibilité d'une élimination du THA du réseau fibrillé due aux lavages post-fibrillation. La première étape a donc été de réticuler le THA du mélange avec la HRP et le H₂O₂. Dans un second temps les moules ont été placés au contact de vapeurs d'ammoniaque pour déclencher la gélification du collagène. Finalement, après 24h de gélification, ils sont neutralisés via des lavages au PBS 1X. Pour plus de clarté, ce protocole est nommé « protocole inversé » alors que le précédent est le « protocole standard ».

Des hydrogels ont été obtenus pour toutes les conditions où les CPI ne sont pas présents ou alors quand ils sont affaiblis. Les hydrogels produits ont un volume plus grand que ceux obtenus avec le protocole standard et ont une texture différente (Figure 93(A)). Ceci suggère le gonflement du THA avant la fibrillogénèse du collagène. En effet les hydrogels sont plus translucides et paraissent plus hydratés et souples (Figure 93(A)). Ceci est consistant avec les propriétés physiques des hydrogels de THA qui gonflent beaucoup du fait de leur grande capacité à retenir l'eau dans leur réseau polymérique.

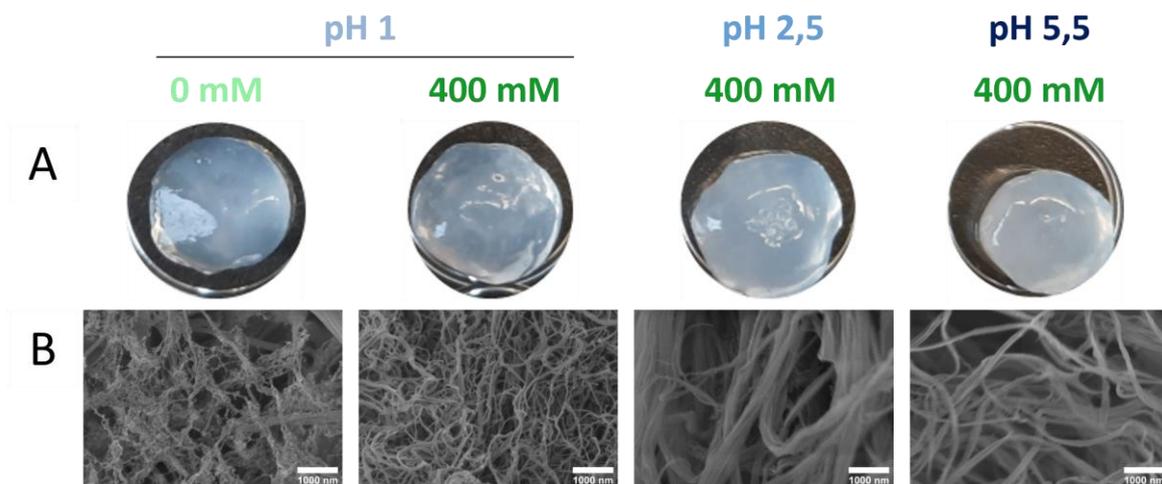


Figure 93 : (A) Observation macroscopique et (B) ultrastructure des hydrogels collagène/THA formés par voie enzymatique selon le protocole inversé observé par MEB.

Pour vérifier l'impact de cette inversion sur la formation des fibrilles de collagène, des observations au MEB ont été effectuées (Figure 93(B)). Si un réseau fibrillaire défini est toujours observé pour toutes les conditions, celui-ci a tout de même l'air moins organisé qu'auparavant avec une polydispersité légèrement plus élevée en termes de diamètre de fibres observé notamment à pH 2,5 et 5,5 en présence de sel.

De plus, leur stabilité thermique a été étudiée en DSC puis comparée à celle obtenue pour le protocole standard. Les températures de dénaturation mesurées ont été compilées dans l'histogramme présenté en Figure 94(A). Afin de s'assurer que la réticulation enzymatique n'engendre pas d'instabilité des fibrilles de collagène, les contrôles de collagène ont également été réticulés à la HRP puis étudiés. Ceux-ci présentent une signature thermique supérieure (60°C) à celle observée pour de simples fibrilles de collagène à pH 1 sans sel et 5,5 avec sel. De plus, cette température est supérieure aux hydrogels de collagène non réticulés à l'HRP suggérant la création de pont tyrosine/tyrosine. A pH 1 et 2,5 en présence de sels, la température de dénaturation est d'environ 53°C caractéristique de la formation de fibrilles matures. La stabilisation de la triple hélice engendrée par la réticulation enzymatique du collagène n'est donc pas observée.

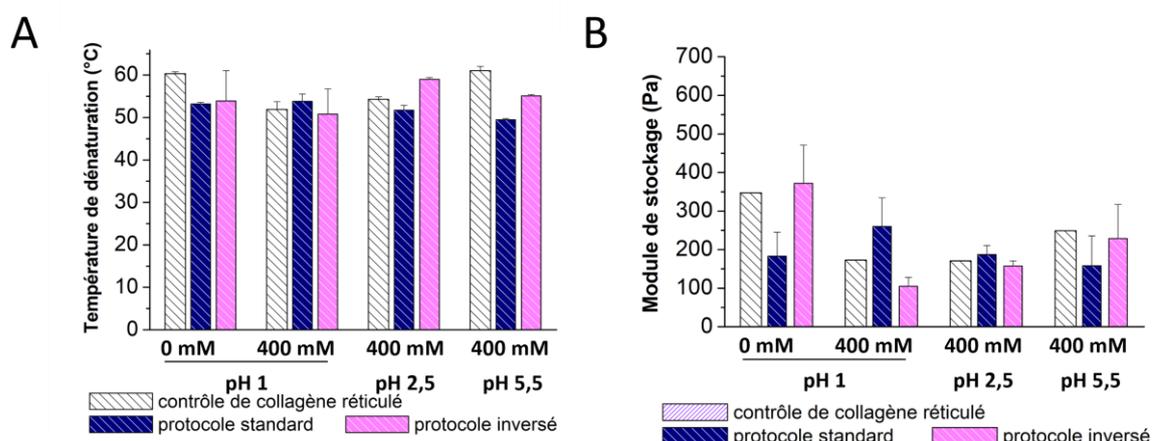


Figure 94 : Comparatif de (A) la température de dénaturation et (B) du module de stockage des hydrogels collagène/THA et collagène selon le protocole de réticulation utilisé.

En observant les stabilités thermiques des hydrogels collagène/THA post-réticulation, des fibrilles sont formées pour toutes les conditions quel que soit le protocole utilisé. Au pH 1 avec ou sans sel, la température de dénaturation est la même à l'issue du protocole inversé qu'à l'issue du protocole standard. En effet, elle se situe autour de 52°C qui est la signature thermique des fibrilles matures de collagène. Cela atteste bien de la formation des fibrilles précédemment observées en MEB mais mériterait à être validé par observation de la striation en MET. En présence de sels à pH 2,5 et 5,5, les fibrilles sont légèrement plus stables à l'issue du protocole inversé qu'à l'issue du protocole standard puisque leur température de dénaturation atteint des valeurs comprises entre 55 et 60 °C et augmente avec le pH. Cette légère stabilisation peut être

causée par une pré-réticulation du collagène en solution qui lui permet de pouvoir s'organiser avant même d'initier la fibrillogénèse par l'ammoniaque. Globalement la réticulation du THA avant la fibrillogénèse du collagène n'inhibe pas celle-ci.

Nous avons également quantifié les propriétés mécaniques des hydrogels par rhéométrie en cisaillement et déterminer le module de stockage de ceux-ci (Figure 94(B)). Pour rappel, les hydrogels formés à partir du protocole inversé semblaient macroscopiquement plus mous et fragiles que ceux formés lors du protocole standard. Nous nous attendons donc à obtenir des modules de stockage inférieurs pour les hydrogels formés via le protocole inversé.

A pH 1, les hydrogels de collagène/THA sont déstabilisés mécaniquement par rapport aux hydrogels de collagène. Le protocole inversé permet de rétablir le même module de stockage que le contrôle de collagène c'est-à-dire à 350 kPa. Ce module de stockage est deux fois plus élevé que celui obtenu pour le protocole standard. En effet, à pH1, aucune interaction de complexation n'a lieu ce qui rend le THA libre d'être réticulé par la HRP dans sa totalité. Dans ce cas, le collagène peut s'organiser et s'auto-assembler dans le réseau de THA déjà formé. Au même pH en présence de sels, la tendance s'inverse puisque des modules de stockage supérieurs sont obtenus pour le protocole standard. Dans le cas du collagène, l'abaissement du module de stockage peut être lié à la présence de sels qui peut perturber l'action de la HRP en écrantant le collagène. En ce qui concerne les mélanges de collagène et de THA, nous pensons que la HRP peut également être perturbée dans le cas du protocole inversé ce qui provoquerait des modules de stockage d'environ 100 Pa. Lorsque le protocole standard est utilisé, l'auto-assemblage en fibrilles de collagène étant favorisé par la présence de sel, ceci permet de créer un échafaudage solide permettant de maintenir le module élastique. La réticulation du THA s'adapte alors à la microporosité présente dans le réseau fibrillaire.

A pH 2,5 en présence de sels, aucune modification des propriétés mécaniques n'est observée pour les hydrogels produits par les différents protocoles puisqu'un module de stockage d'environ 150 kPa est obtenu pour l'ensemble des hydrogels.

A pH 5,5 en présence de sels, l'élasticité des hydrogels collagène/THA formés est la même quel que soit le protocole utilisé et atteint le même niveau que les contrôles de collagène. Ici, la fibrillogénèse étant initiée, cela permet d'avoir la même stabilisation mécanique via une pré-réticulation physique du réseau de collagène pour le protocole inversé et une réticulation physique complète lors du protocole standard.

Les résultats obtenus à l'issue de ces caractérisations ont confirmé notre perception macroscopique initiale puisque le protocole inversé ne semble pas apporté de plus-value importante sur les hydrogels collagène/THA formés. Le seul paramètre qui semble jouer en sa

faveur est la stabilité thermique des fibrilles de collagène qui semble légèrement augmenter pour certaines conditions de pH et de force ionique mais ceci se fait à l'insu de la tenue mécanique des hydrogels. L'inversion des étapes de gélification ne permettant pas d'améliorer les performances physiques des hydrogels générés, il a fallu trouver une autre solution via ce qu'on a appelé la « stratégie d'imprégnation ».

4. Renforcement des hydrogels par imprégnation du THA

Le problème majeur rencontré dans notre protocole standard est dû à la fuite possible du THA du réseau de collagène lors des lavages post-fibrillogénèse. Afin de le compenser autrement qu'en inversant les étapes, nous avons imaginé un protocole d'imprégnation permettant de réintroduire du THA dans le réseau de collagène déjà formé.

Lors d'une première étape, les hydrogels de collagène sont formés par fibrillogénèse au contact de vapeurs d'ammoniaque. Après 24h, ces derniers sont lavés au PBS 1X jusqu'à ce que le pH soit neutre. La seconde étape consiste à préparer un bain de THA à 3% en masse et d'incuber pendant 24h les hydrogels avec ce bain afin de laisser le THA diffuser dans le réseau fibrillaire de collagène. Enfin, après avoir rincé l'excédent de THA brièvement, les hydrogels sont réticulés avec le bain de HRP/H₂O₂ précédemment utilisé pour déclencher la réticulation enzymatique du THA.

L'ultrastructure de ces hydrogels imprégnés n'a pas été modifiée puisqu'elle présente un réseau fibrillaire typique du collagène pur (Figure 95(A)).

Néanmoins des changements ont été observés quant aux résultats mécaniques et thermiques.

La stabilité thermique des fibrilles de collagène a été renforcée après imprégnation comme visible en Figure 95(B). En effet, aucune augmentation de la température de dénaturation des fibrilles de collagène n'a été observée après réticulation des hydrogels collagène/THA via le protocole standard. Celle-ci reste à 53°C, signature thermique des fibrilles de collagène. Lorsque le protocole d'imprégnation est effectué avant la réticulation enzymatique des hydrogels, les fibrilles semblent légèrement stabilisées au pH 1 sans sel et aux pH 2,5 et 5,5 en présence de sel. En effet, la température de dénaturation du collagène est augmentée jusqu'à 57°C par exemple pour la condition à pH 2,5 en présence de sels. Cette augmentation visible après réticulation par rapport aux hydrogels de collagène seulement fibrillés traduit l'efficacité de la réticulation du THA sur la stabilisation des fibrilles de collagène. Si les fibrilles de collagène sont stabilisées thermiquement après imprégnation et réticulation, cela suggère que les macromolécules de collagène ont été réticulées avec le THA via des pont tyramine/tyrosine.

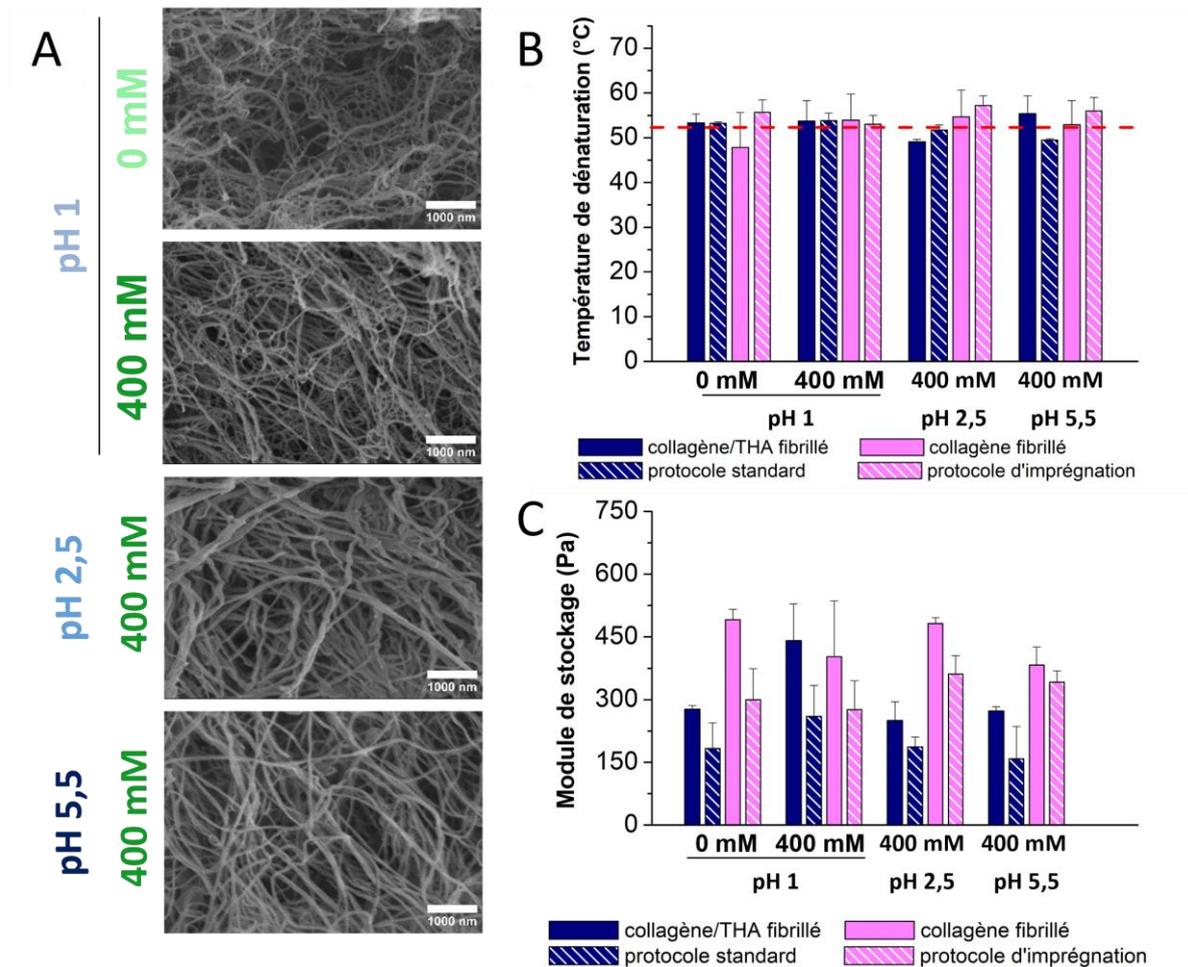


Figure 95 : Apport du protocole d'imprégnation sur (A) l'ultrastructure (x20k), (B) la température de dénaturation et (C) le module de stockage des hydrogels collagène/THA ou collagène fibrillés avant réticulation et pontés après réticulation par voie enzymatique.

De plus, les hydrogels imprégnés sont plus rigides que ceux formés avec le protocole standard (Figure 95(C)). A pH 1 sans sel, le protocole d'imprégnation permet d'obtenir des modules de stockage de l'ordre de 300 Pa alors que le standard n'est qu'à 165 Pa. En ajoutant du sel à ce même pH, les modules de stockage sont similaires pour les deux protocoles atteignant une valeur de 300 Pa. Enfin, à pH 2,5 et 5,5 en présence de sels, le protocole d'imprégnation permet de multiplier par deux l'élasticité du réseau puisque le module passe de 150 Pa lors du protocole standard à 350 Pa lors du protocole d'imprégnation.

Malgré l'apport mécanique assuré par l'imprégnation des hydrogels avant réticulation enzymatique, le renforcement n'est toujours pas optimal puisque la plus-value en comparaison avec les hydrogels contrôles de collagène avant réticulation est faible voire nulles. Cependant, les hydrogels imprégnés se tiennent et permettent d'obtenir des propriétés mécaniques supérieures aux réseaux collagène/THA fibrillés sans réticulation et même après réticulation par la HRP.

L'imprégnation ne semble pas permettre de prévenir la dégradation du réseau par la HRP observé lors du protocole standard puisque l'élasticité est diminuée par rapport aux contrôles seulement fibrillés quelles que soient les conditions de pH et de force ionique envisagées. Néanmoins elle permet d'atteindre des modules de stockage plus important que pour le protocole standard via l'incorporation et la réticulation du THA.

Finalement, le renforcement des hydrogels collagène/THA par réticulation enzymatique ne semble stabiliser que faiblement les hydrogels collagène/THA fibrillés malgré toutes les solutions apportées, ce qui nous a poussé à chercher d'autres alternatives plus adaptées à notre système.

II. Photoréticulation de l'acide hyaluronique dans les hydrogels collagène/THA

En faisant quelques recherches bibliographiques, nous avons sélectionné deux autres agents de réticulation qui semblaient efficaces sur des systèmes similaires aux nôtres (Donnelly et al., 2017; Heo et al., 2016; Kang et al., 2022; Petta et al., 2018). Ils sont tous les deux utilisés pour des voies de photoréticulation. L'un utilise les UV et l'autre est également adaptable aux sources LED (lumière visible) qui sont moins puissantes mais également moins cytotoxiques que les UV.

1. Photoréticulation à la riboflavine

La riboflavine est un agent de réticulation couramment utilisé en photoréticulation de l'acide hyaluronique ainsi que du collagène. Il s'agit de la vitamine B2 essentielle au bon fonctionnement de l'organisme et s'avère être par conséquent un candidat de choix. Sa capacité à réticuler à la fois des réseaux de THA et de collagène nous a semblé très intéressante.

La seule ombre au tableau semble être l'utilisation d'UV puisqu'il s'agit d'une source lumineuse très puissante qui peut être toxique pour les cellules et peut produire de la chaleur ce qui n'est pas compatible avec le collagène si la température est trop élevée. Néanmoins, nous avons souhaité tester cette voie afin d'en mesurer l'impact sur nos matériaux.

1.1. Optimisation de la gélification du THA par la riboflavine

En nous appuyant sur la littérature, nous avons pu déterminer une gamme de paramètres à tester afin d'optimiser dans un premier temps la réticulation du THA par la riboflavine (Donnelly et al., 2017). Dans cet article, plusieurs concentrations en riboflavine et plusieurs temps d'exposition aux UV ont été étudiés.

Les conditions optimales de réticulation du THA ont été évalués à partir d'une concentration en riboflavine de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ et un temps d'exposition minimal de 60 minutes. La cytotoxicité a été évaluée après 7 jours sur des chondrocytes. 98% des cellules étaient toujours en vie après 7 jours d'incubation post-exposition. Des UV à une longueur d'onde de 365 nm ont été utilisés.

Nous nous sommes inspirés de ces données scientifiques pour établir notre protocole. Trois concentrations en riboflavine ont été testées : 25, 50 et $100 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Pour chacune de ces concentrations, trois temps d'exposition aux UV ont été testés : 1 h, 2 h et 10 h. Tout d'abord, des hydrogels THA purs ont été produits à partir d'une solution à 3% en masse et avec un volume de $200 \mu\text{L}$ pour chaque hydrogel. La riboflavine a été mélangée au THA avant réticulation puis l'exposition aux UV a été faite à une hauteur de 10 cm entre la surface de l'échantillon et la lampe.

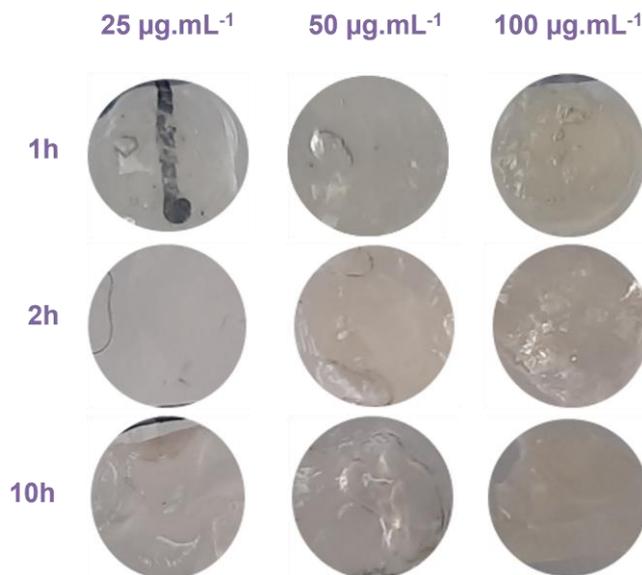


Figure 96 : Observations macroscopiques des hydrogels de THA réticulés avec la riboflavine sous exposition aux UV.

Les hydrogels obtenus sont observables en Figure 96. Après 1h d'exposition aux UV, quel que soit la concentration en riboflavine, les échantillons sont partiellement réticulés. Il s'agit de gels visqueux n'ayant pas de formes distinctes et fragiles mécaniquement. Au bout de 2h de réticulation, des hydrogels avec une forme définie et une bonne tenue mécanique sont formés pour toutes les concentrations de riboflavine. Enfin, après 10h d'exposition aux UV et ce pour

toutes les concentrations de riboflavine, les hydrogels sont formés et bien réticulés mais une pellicule sèche est présente en surface et le volume a diminué synonyme d'évaporation dû au chauffage par la lampe. Après réhydratation avec de l'eau il est possible de supprimer cette pellicule. Néanmoins, la déshydratation des gels étant due au chauffage induit par les UV, cela représente un risque de dégradation pour le collagène. En effet, la structure du collagène peut être dégradée en gélatine ce qui est un phénomène irréversible.

A l'issue de ces tests préliminaires, une concentration de $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$ en riboflavine et un temps d'exposition de 2h ont été sélectionnés afin de former des hydrogels rigides sans évaporation.

1.2. Photoréticulation des gels collagène/THA par la riboflavine

Le protocole retenu pour former les hydrogels purs de THA a été utilisé pour réticuler le THA dans les hydrogels collagène/THA. Pour cette étude, seules les solutions à pH 1 avec et sans sel et à pH 2,5 et 5,5 avec sel ont été utilisées suivant le protocole standard. Les hydrogels de collagène purs ont également été testés selon le même protocole. Une première étape de gélification du collagène sous vapeurs d'ammoniaque a été conduite pendant 24h. Après avoir rincés les hydrogels pour neutraliser le pH, ces derniers ont été imprégnés dans un bain de riboflavine à $25 \mu\text{g.mL}^{-1}$. La diffusion de la riboflavine dans le réseau de collagène a été effectuée pendant une nuit à l'abri de la lumière. Après retrait de l'excédent de bain et un bref rinçage, les hydrogels ont été mis à réticuler pendant 2h sous lampe UV à 365 nm.

Après 2h de photoréticulation, les hydrogels sont rincés à l'eau puis leur ultrastructure, leurs propriétés mécaniques et leur stabilité thermique ont été caractérisées.

Avant d'effectuer le dernier rinçage post-réticulation, aucune pellicule de dessèchement n'a été observée mais une rétraction en hauteur a été observée. Nous pensons donc que l'échauffement de la lampe a été assez important pour évaporer une partie du solvant en surface de l'hydrogel comme observé précédemment pour les hydrogels de THA purs. Néanmoins, après un rinçage post-réticulation, les hydrogels ont gonflé pour obtenir une hauteur supérieure à celle observée avant photoréticulation. Ceci signifie que la réticulation du THA à la riboflavine semble effective puisque le THA a tendance à gonfler plus que les autres biopolymères lorsqu'il est gélifié. Néanmoins, cela confirme aussi qu'il y a eu un dessèchement lors de l'irradiation aux UV. Nous avons donc vérifié que ce phénomène n'engendrait pas de modification/dégradation du réseau fibrillaire par MEB (Figure 97(A)).

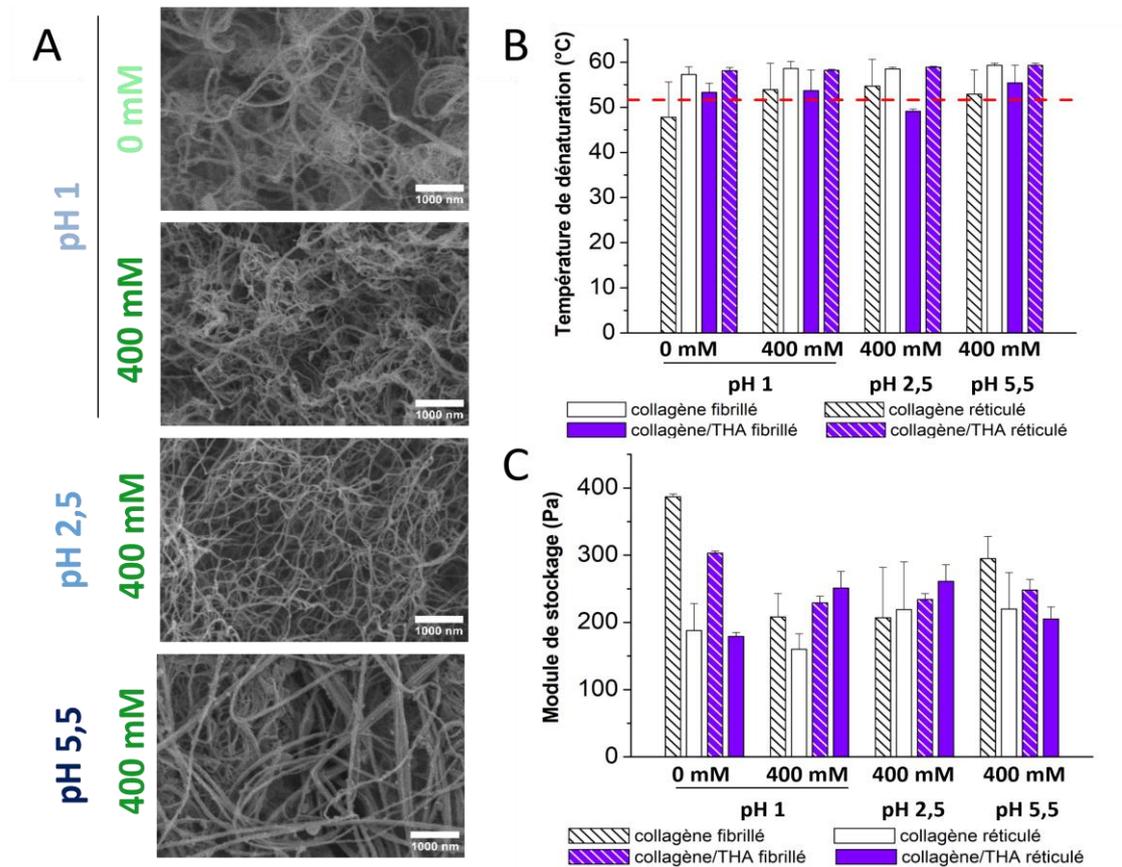


Figure 97 : Impact de la photoréticulation à la riboflavine sur (A) l'ultrastructure (20k), (B) la température de dénaturation et (C) le module de stockage des hydrogels de collagène/THA fibrillés.

Qu'il s'agisse des contrôles de collagène ou des hydrogels collagène/THA, un réseau fibrillaire est observé. Aux pH 1 et 2,5, ce réseau ne diverge pas en taille ou en densité selon qu'il s'agisse des contrôles ou des mélanges. Par contre, à pH 5,5, les fibrilles formées semblent plus grosses même si le réseau reste bien défini. Par conséquent, la photoréticulation par la riboflavine ne semble pas modifier l'organisation du réseau de fibrilles de collagène mais le diamètre des fibrilles semble affecté à pH 5,5 en présence de sels.

Afin vérifier l'impact de la photoréticulation par la riboflavine sur la stabilité thermique du réseau fibrillaire de collagène, une analyse par DSC a été effectuée (Figure 97(B)). Lorsque les contrôles de collagène sont exposés à la photoréticulation par la riboflavine, la température de dénaturation des fibrilles de collagène augmente de 4°C pour l'ensemble des conditions de pH et de force ionique. Elle atteint une valeur maximale de 58°C. Ceci atteste de la stabilisation des fibrilles de collagène à travers la photoréticulation et donc de la réticulation covalente du collagène via ses Tyrosines. En effet, les tyrosines présentes dans le collagène ont une structure similaire à la tyramine greffée sur l'acide hyaluronique. Elles ont toutes les deux un alcool primaire sur leur cycle aromatique (phénols) qui est le groupement réagissant avec la riboflavine lors de la réticulation chimique sous UV. Pour cela, la riboflavine peut à la fois réagir avec une

tyramine et une tyrosine. Ceci peut permettre de former des réseaux hybrides avec trois types de ponts covalents :

- Des ponts entre tyramines
- Des ponts entre tyrosines
- Des ponts entre une tyramine et une tyrosine.

Des réseaux interpénétrés peuvent également être formés si les ponts covalents ne se font qu'entre tyramines et qu'entre tyrosines.

Afin de savoir s'il s'agit d'un réseau interpénétré ou d'un réseau hybride, les hydrogels collagène/THA réticulés ont également été étudiés. Si un réseau hybride était formé, la température de dénaturation post-réticulation des hydrogels collagène/THA serait supérieure à celle des contrôles de collagène réticulés attestant de la plus-value apportée par la création de ponts tyrosines/tyramines. Si un réseau interpénétré était créé, la température de dénaturation des hydrogels collagène/THA post-réticulation serait la même que celle des contrôles de collagène attestant de la seule présence de ponts covalent tyrosines/tyrosines. Ici, quelles que soient les conditions de pH et de force ionique, la température de dénaturation des fibrilles de collagène dans les hydrogels collagène/THA augmente également de 4°C post-réticulation pour atteindre 58°C. La température de dénaturation étant la même que pour les contrôles de collagène réticulés, un réseau interpénétré semble s'être formé par photoréticulation par la riboflavine via la création de ponts covalents entre deux tyrosines des fibrilles de collagène en plus des ponts entre deux tyramines du THA.

Nous avons ensuite évalué les performances mécaniques en rhéométrie de ces hydrogels (Figure 97(C)). Une fois encore, le renforcement n'est pas assez efficace. Les modules de stockage obtenus sont plus élevés qu'avec la HRP néanmoins ils restent similaires aux modules mesurés avant réticulation. Ceci peut être dû à l'échauffement émanant des UV qui endommagerait partiellement le réseau et donc ses propriétés mécaniques. De plus le rinçage après fibrillogénèse peut être, comme c'est le cas pour la HRP, à l'origine d'une perte de THA qui diminuerait les performances post-réticulation.

Il s'agit d'un procédé qui est globalement plus efficace que la HRP puisqu'il n'affaiblit pas le réseau, il le conserve. Ceci pourrait être compensé par imprégnation de THA comme tenté pour la HRP précédemment. Néanmoins, il resterait tout de même le problème de la puissance des UV qui semble être néfaste pour les propriétés mécaniques du réseau de collagène (Hong et al., 2019).

Finalement, ce système de renforcement semble plus adapté que l'utilisation de HRP puisqu'un réseau interpénétré est formé avec une stabilité thermique du réseau fibrillaire de collagène supérieure après photoréticulation mais les performances mécaniques ne semblent pas améliorées. Il a donc fallu poursuivre les investigations pour trouver un système permettant d'améliorer à la fois les propriétés mécaniques et la stabilité thermique.

2. Photoréticulation à l'éosine Y et à la lumière verte

L'éosine Y est un photoinitiateur souvent utilisé en photoréticulation. Nos collaborateurs suisses l'utilisent largement sur le THA mais également sur des matériaux hybrides faisant intervenir du collagène (Petta et al., 2018). Ils l'utilisent seul ou bien en complément de la réticulation enzymatique à la HRP pour plus d'efficacité.

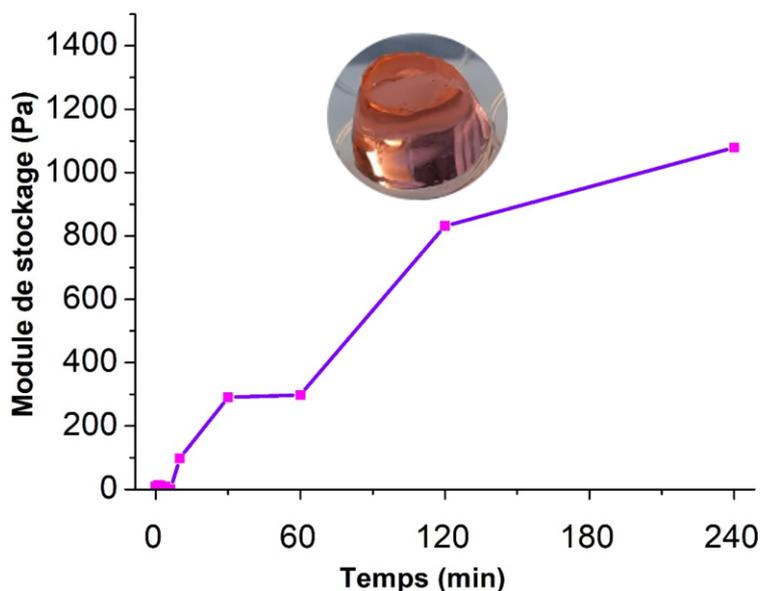
Afin d'activer l'éosine Y, il faut utiliser une source de lumière. Il peut s'agir d'UV ou bien de lumière verte émettant autour 520 nm. Cette deuxième alternative a attiré notre attention car elle permettrait de réduire les dégradations et la toxicité liées aux irradiations par UV. La source lumineuse doit être autour de 520 nm car l'éosine possède un maximum d'absorbance à 518 nm (Arunkumar et al., 2008).

Lors de sa thèse, Gregor Miklosic a démontré qu'en utilisant un système de photoréticulation à l'éosine sur un gel d'une hauteur de 2mm, 30 minutes d'irradiation étaient suffisantes pour atteindre un module de stockage maximal. Néanmoins, au bout de 5 minutes de photoréticulation, 95% du module de stockage final est atteint. Cela nous permettrait d'effectuer des irradiations plus courtes ce qui serait moins nocives pour de futures expériences de culture cellulaire. Ici, la photoréticulation a été effectuée avec une lampe verte Eurolite émettant à 520 nm.

2.1. Optimisation de la gélification du THA par photoréticulation à la lumière verte et l'éosine Y

Tout d'abord, comme pour la riboflavine et la HRP, il a fallu optimiser les paramètres de photoréticulation en fonction de notre protocole sur du THA pure. Concernant la concentration en éosine, nous avons fait le choix de garder celle utilisée par nos collaborateurs. Le gel a été formé avec du THA pur à 3% en masse puis l'éosine a été ajoutée à une concentration finale de 0,2 mg.mL⁻¹. Une fois le tout homogénéisé, 200 µL sont placés dans chaque moule de gélification et ces derniers sont exposés à une lumière verte à une hauteur fixe de 10 cm.

Au bout de 2h, les gels de THA font environ 6 à 7 mm, se tiennent et semblent rigides comme présenté en Figure 98. La coloration rose est due à la présence d'éosine.



Intervalle de suivi											
0 min	30 s	1 min	2 min	4 min	6 min	10 min	30 min	1 h	2 h	4 h	

Figure 98 : Observation macroscopique d'un hydrogel de THA réticulé à l'éosine après 2h d'exposition à la lumière verte et cinétique d'évolution du module de stockage en fonction du temps d'exposition.

Un suivi cinétique de gélification a été effectué par mesures rhéologiques du module de stockage à intervalles fixes entre 0 minutes et 4h d'exposition à la lumière (Figure 98).

Pendant les 10 premières minutes de photoréticulation, aucune gélification ne se produit, se traduisant par un module de stockage nul. A partir de 10 minutes, la solution de THA s'épaissit ce qui s'accompagne d'une augmentation du module de stockage significatif, montrant la réticulation progressive du THA. Entre 1h et 2h d'exposition le module triple pour passer de 298 Pa à 831 Pa. Des hydrogels rigides qui se tiennent sont obtenus à partir de 1h. Cependant, si l'exposition dure trop longtemps, c'est-à-dire à partir de 4h, on observe un dessèchement de l'hydrogel en surface dû à l'échauffement continu de la lampe. Une pellicule sèche est observée en surface comme c'était le cas pour la riboflavine et les UV. Le module de stockage augmente tout de même mais une rupture de pente est observée puisque le plateau de fin de réticulation est atteint à 1 kPa après 4 h.

A l'issue de cette étape d'optimisation, les conditions retenues sont l'utilisation d'éosine à une concentration de $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ et une exposition à la lumière verte pendant 2h pour obtenir des gels aux propriétés mécaniques élevées sans dégrader le réseau.

Une fois les paramètres optimaux identifiés, il a fallu transposer le protocole aux hydrogels mixtes collagène/THA. Le procédé a également été testé sur les contrôles de collagène.

2.2. Photoréticulation des gels collagène/THA par l'éosine Y et la lumière verte

Comme pour le protocole standard, après avoir mélangé le collagène et le THA pour chaque condition de pH et de force ionique considérée, 200 μL du mélange sont mis dans les moules. La fibrillogénèse du collagène est conduite sous vapeurs d'ammoniaque pendant 24h puis les gels sont rincés jusqu'à neutralisation. Les hydrogels sont incubés dans un bain d'éosine à 0,2 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ une nuit. Après avoir retiré l'excédent de bain, la photoréticulation est faite par irradiation à la lumière verte à 520 nm pendant 2h. Les hydrogels sont finalement rincés au PBS 1X puis caractérisés.

En Figure 99(A), les observations macroscopiques des hydrogels obtenus sont présentées. Les gels semblent rigides. L'ultrastructure fibrillaire n'est pas altérée par l'éosine et la photoréticulation (Figure 99(A)). Quelle que soit la condition, le réseau de fibres de collagène est homogène sous forme de longues fibres bien définies caractéristiques aux réseaux observés pour des hydrogels de collagène pur.

Comme pour la riboflavine, nous avons évalué l'impact de la photoréticulation à l'éosine sur la stabilité thermique du réseau de collagène (Figure 99(B)). Lorsque la photoréticulation a été effectuée sur les hydrogels contrôles de collagène pur, une augmentation de la température de dénaturation des fibrilles de 5°C a été observée pour toutes les conditions de pH et de force ionique. La stabilisation semble être la même indépendamment du pH considéré puisqu'une valeur seuil autour de 58°C est obtenue post-réticulation. Par conséquent, ceci atteste de la stabilisation des fibrilles de collagène par la photoréticulation et donc de la réticulation covalente du collagène via ses Tyrosines.

Nous avons souhaité vérifier s'il s'agissait d'un réseau interpénétré ou d'un réseau hybride. Pour rappel, le réseau hybride mettrait en jeu des ponts entre tyrosines et tyramines en plus de ceux entre deux tyramines ou deux tyrosines. Un réseau interpénétré consisterait à former deux réseaux distincts interpénétrés l'un dans l'autre : un de collagène avec des ponts tyrosine/tyrosine et un de THA avec des ponts tyramine/tyramine. Pour cela, les hydrogels collagène/THA post-réticulation ont également été analysés par DSC. Leur température de dénaturation est bien au-delà de celle de fibrilles de collagène pur sans réticulation (53°C) synonyme de stabilisation des fibrilles de collagène après photoréticulation. En effet, ici elle oscille entre 60,7 et 62,8°C selon les conditions de pH et de force ionique. Les températures de dénaturation atteinte pour les contrôles

de collagène purs réticulés oscillaient entre 58,3 et 60,6°C toutes conditions confondues. La température de dénaturation du collagène dans les hydrogels collagène/THA par rapport aux contrôles de collagène suggère qu'une contribution stabilisatrice des fibrilles de collagène supplémentaire a eu lieu. Par la photoréticulation à l'éosine, on peut imaginer qu'un réseau hybride s'est donc formé avec :

- Des ponts covalents tyrosine/tyrosine entre fibrilles de collagène
- Des ponts covalents tyramine/tyramine entre macromolécules de THA
- Des ponts covalents tyramines/tyrosines entre fibrilles de collagène et macromolécules de THA.

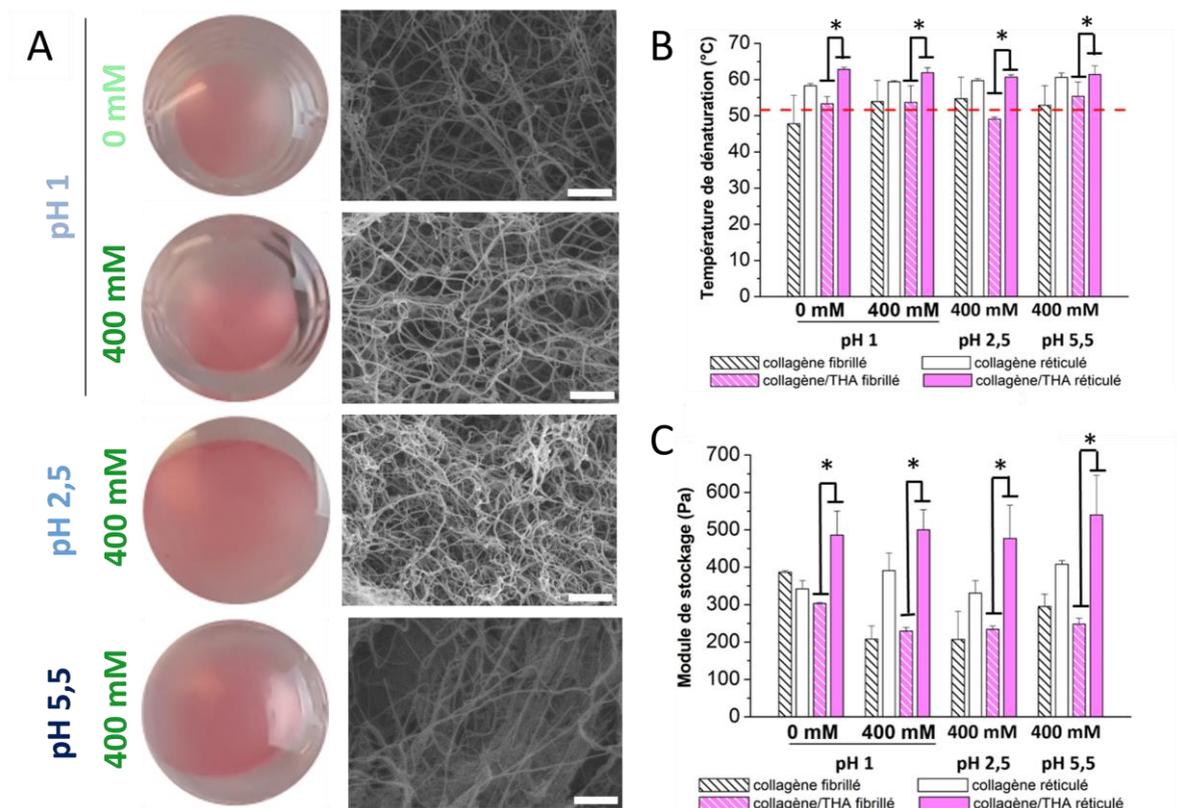


Figure 99 : (A) Observations macroscopiques et ultrastructure des hydrogels collagène/THA après photoréticulation à l'éosine (échelle = 1 μm), (B) leur stabilité thermique et (C) leur module de stockage (* : p<0,05 (n = 3)).

Pour rappel, l'existence d'un tel réseau avait déjà été mis en évidence lors d'une précédente thèse au laboratoire mais avec le système HRP/H₂O₂. La technique de co-gélification utilisée était différente avec une gélification simultanée du collagène et du THA sans présence de sel ce qui permettait une action optimale de la HRP. Néanmoins cette technique est incompatible avec l'impression 3D puisque la gélification est instantanée après le mélange collagène/THA (Frayssinet et al., 2020).

Enfin, pour vérifier la rigidité des gels, nous avons mesuré leurs modules de stockages (Figure 99(C)). Une augmentation de l'élasticité du module de stockage des hydrogels de collagène est observable pour toutes les conditions sauf pour celle à pH 1 sans sel où le module de stockage initial est seulement conservé. Ainsi, pour les conditions pour lesquelles cette augmentation est observée, la réticulation des fibrilles de collagène entre elles par photoréticulation à l'éosine est bien confirmée. Indépendamment du pH, la photoréticulation à l'éosine a augmenté le module de stockage des hydrogels collagène/THA traduisant une plus grande élasticité post-réticulation. Celui-ci a été doublé attestant de l'efficacité de l'éosine à réticuler le THA. En comparant l'élasticité des hydrogels de collagène post-réticulation avec les hydrogels de collagène/THA réticulés, une augmentation du module de stockage de 37% toutes conditions confondues est observée. De manière différenciée, cette augmentation est de 42, 28, 44 et 32% respectivement pour les conditions à pH 1 sans sel et avec sel et les pH 2,5 et 5,5 en présence de sels. Dans toutes les conditions le module de stockage G' atteint environ 500 Pa et il n'y a pas de différence significative entre les groupes. Ceci confirme la présence d'un réseau hybride stabilisé par la présence de ponts tyrosine/tyramine en plus des ponts tyrosine/tyrosine et tyramine/tyramine comme expliqué précédemment.

Ainsi, la photoréticulation à l'éosine permet d'obtenir des hydrogels collagène/THA conservant la structure fibrillaire du collagène tout en améliorant les propriétés mécaniques et thermiques.

3. Réticulation enzymatique vs photoréticulation

Afin d'établir les paramètres nécessaires à l'élaboration de l'encre que nous allons tester en impression 3D, nous avons comparé les trois voies de réticulation optimisées et testées dans cette partie.

Pour rappel, les trois voies testées pour notre système collagène /THA sont la réticulation enzymatique avec le système HRP/ H_2O_2 et la photoréticulation aux UV avec la riboflavine ou la photoréticulation à la lumière verte (520 nm) avec l'éosine.

L'ultrastructure, la stabilité thermique et les propriétés mécaniques des hydrogels générés selon chaque procédé de réticulation ont été comparés entre eux. Ainsi, le système de réticulation adéquat a pu être sélectionné.

Tout d'abord, au niveau macroscopique, quelle que soit la méthode de réticulation utilisée, des hydrogels collagène/THA plus ou moins rigides ont été obtenus. Néanmoins, dans le cas de la photoréticulation à la riboflavine, un dessèchement en surface des hydrogels a été observé post-réticulation. Ceci a été provoqué par l'utilisation d'UV qui semble néfaste pour le

collagène. En vue de l'impression 3D et de la cellularisation des hydrogels, ce procédé ne semble pas non plus optimal puisque les UV sont aussi mutagènes pour les cellules. Les deux autres voies de réticulation n'ont pas montré ce phénomène, ce qui les démarque de la photoréticulation à la riboflavine.

L'ultrastructure du réseau fibrillaire de collagène observée au MEB a également été comparée selon la voie de réticulation utilisée (Figure 100). Nous avons observé des réseaux fibrillaires homogènes et définis pour toutes les techniques de réticulations. Aucune perturbation du réseau de fibrilles de collagène ne semble avoir eu lieu. Au niveau structural, nous ne pouvons donc pas conclure quant à la meilleure voie de réticulation du THA.

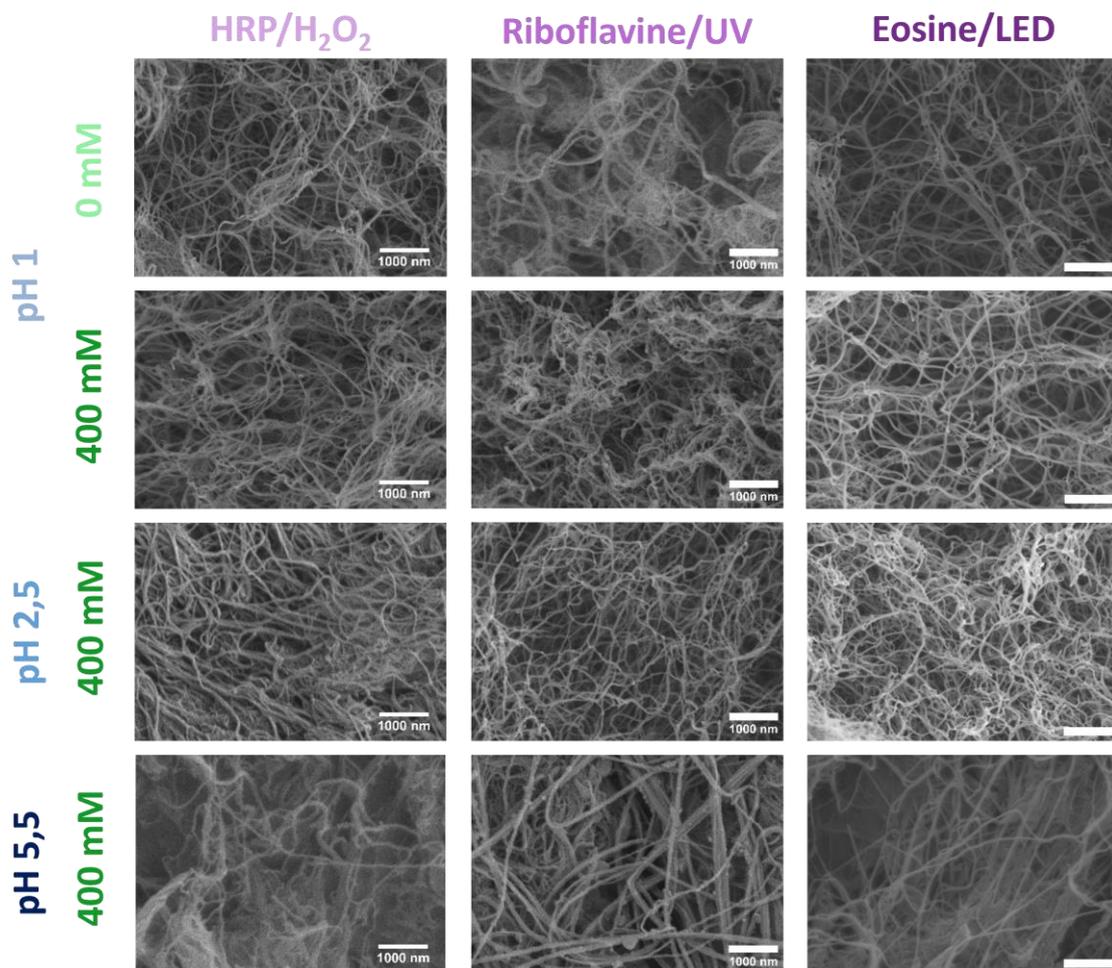


Figure 100 : Impact de la méthode de réticulation du THA sur le réseau fibrillaire des hydrogels collagène/THA fibrillés (x20k).

Afin de discriminer les trois procédés, nous nous sommes intéressés à l'étude de la stabilité thermique et mécanique de ces hydrogels. En effet, un procédé de réticulation est efficace s'il permet de générer des ponts covalents au sein du matériau. Ici il s'agit de ponts entre deux tyramines du THA mais il s'agit également de la réticulation du collagène via les tyrosines. Lorsque des nœuds de réticulation covalents se créent entre des fibrilles de collagène, une énergie

extérieure supérieure est nécessaire afin de dégrader le matériau et ses nouvelles liaisons chimiques. Cela se traduit par une augmentation de la température de dénaturation du collagène dans notre cas ou encore d'une augmentation de l'élasticité du matériau via l'augmentation du module de stockage du réseau. Ceci provient aussi de l'augmentation du nombre de nœuds de réticulation dans le réseau polymérique.

C'est pourquoi dans un premier temps nous avons comparé les résultats de DSC obtenus pour chaque méthode de réticulation (Figure 101(A)). Ici nous avons considéré les hydrogels collagène/THA uniquement fibrillés comme référence. En effet, n'ayant pas subi de réticulation du THA, il s'agit seulement d'un réseau de fibrilles. Ce réseau de fibrilles est facilement détectable puisque peu importe les conditions de pH et de force ionique utilisées, la température de dénaturation des hydrogels est autour de 53°C (barres blanches à rayures noires).

Lorsque le système est réticulé enzymatiquement (barres bleues), aucune augmentation de la température de dénaturation n'est observée. Pour les conditions à pH 2,5 et 5,5 avec sels, on observe même une diminution de celle-ci traduisant une altération du réseau de fibrilles de collagène par l'action du système HRP/H₂O₂.

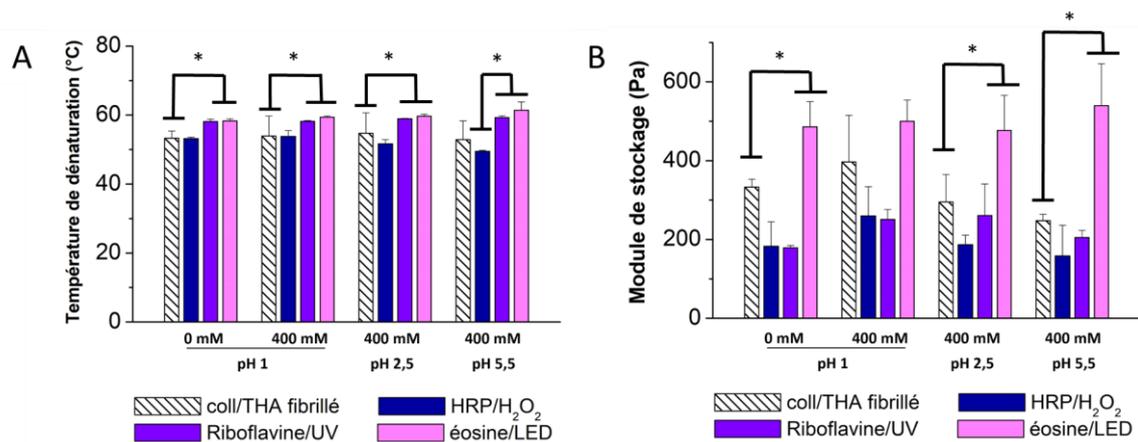


Figure 101 : Impact de la méthode de réticulation du THA sur (A) la température de dénaturation et (B) le module de stockage des hydrogels collagène/THA (* : p<0,05 (n = 3)).

Lorsqu'une photoréticulation à la riboflavine (barres violettes) ou à l'éosine (barres roses) est effectuée, on observe une stabilisation des fibrilles de collagène dans les hydrogels collagène/THA. En effet, la température de dénaturation augmente pour atteindre environ 60°C quelles que soient les conditions de pH et de force ionique considérées. La réticulation tyrosine/tyrosine entre deux molécules de collagène semble avoir eu lieu. Néanmoins nous observons certaines différences entre les deux modes de photoréticulation. Précédemment, il a été démontré qu'aucune augmentation de la stabilité thermique n'a été observée pour les hydrogels collagène/THA en comparaison avec les hydrogels de collagène pur dans le cas de la riboflavine d'où la formation d'un réseau interpénétré constitué de ponts tyramine/tyramine entre deux

THA et tyrosine/tyrosine entre deux collagènes. Dans le cas de la photoréticulation à l'éosine, la température de dénaturation des hydrogels de collagène/THA réticulés était supérieure à celle des hydrogels de collagène purs réticulés attestant de la formation d'un réseau hybride. Trois types de liaisons chimiques se forment : des ponts tyramine/tyramine, des ponts tyrosine/tyrosine et des ponts tyramine/tyrosine. Enfin, les propriétés mécaniques des hydrogels obtenues par ces deux modes de photoréticulation ont été comparés.

Nous avons analysé les propriétés mécaniques des hydrogels générés et notamment leurs modules de stockage (Figure 101(B)). En renforçant un réseau par réticulation, c'est-à-dire en créant des ponts covalents supplémentaires via la réticulation du THA à minima ou la création d'un réseau hybride avec le collagène, une augmentation du module de stockage doit être observée. Notre référence est toujours les hydrogels mixtes collagène/THA fibrillés non réticulés afin de quantifier directement l'effet de chaque méthode de pontage.

Cette analyse nous a permis tout d'abord d'éliminer définitivement le mode de réticulation enzymatique car les modules de stockage soit diminuent, soit restent constant après la réticulation. Lorsqu'une photoréticulation à la riboflavine est opérée, le module de stockage diminue également. Cela traduit l'affaiblissement mécanique du réseau. Cet affaiblissement mécanique semble être dû au séchage en surface de l'hydrogel lors de l'exposition aux UV, ce qui déstabilise le réseau de manière irréversible. Le risque de dégradation semble trop important pour notre étude si l'on y ajoute l'incorporation de cellules par la suite qui sont également sensibles à la température et à la surexposition aux radicaux.

Concernant la photoréticulation à l'éosine, une augmentation de l'élasticité du réseau est observée pour toutes les conditions de pH et de force ionique. Cette méthode de réticulation est la seule qui permet d'obtenir des hydrogels rigides avec un réseau fibrillaire caractéristique du collagène démontrant une augmentation de la stabilité thermique et mécanique des hydrogels mixtes collagène/THA. De plus, l'utilisation de lumière visible a permis de conserver la stabilité des matériaux sans induire de séchage en surface. Cette source de lumière douce est cytotocompatible et non mutagène contrairement aux UV.

Nous souhaitons incorporer à terme des cellules dans les hydrogels imprimés, c'est pourquoi nous nous sommes particulièrement penchés sur la condition à pH 5,5. En effet, un pH trop acide serait toxique pour les cellules et donc incompatible avec notre projet. Néanmoins, le pH 5,5 semble être idéal puisqu'il permet d'être dans des conditions plus proches du pH physiologique tout en prévenant la formation des complexes polyioniques. En regardant les propriétés mécaniques à pH 5,5 en présence de sel après réticulation à l'éosine, on s'aperçoit également qu'il s'agit de la condition pour laquelle on observe un renforcement mécanique optimal.

Finalement, la photoréticulation à l'éosine semble être la plus adaptée à notre système et celle que nous avons sélectionné pour la suite du projet. Néanmoins il faudra modifier le processus de gélification du collagène pour adapter la technique à la culture cellulaire puisque les vapeurs d'ammoniaque sont incompatibles avec la survie cellulaire. Il est facile de les remplacer en exposant les solutions à une quantité de soude à 0,1 M et/ou de PBS.

Conclusion de l'étude physicochimique

Si l'utilisation d'un pH acide inférieur à 2,5 en présence de NaCl à 400mM semble inhiber totalement les phénomènes de complexation, cela reste toxique pour les cellules. Dans le cadre de ce projet, il est inenvisageable de travailler avec des conditions cytotoxiques. En effet, les cellules étant à termes directement en contact avec l'encre, le matériau ne serait pas biocompatible.

Une alternative a été découverte lors de l'étude physicochimique. En effectuant la formulation à un pH 5,5 avec du NaCl, l'écrantage des charges est suffisant pour inhiber la complexation grâce à l'utilisation du pH proche du point isoélectrique du collagène. A ce pH, la fibrillogénèse du collagène est amorcée en présence de sel rendant les macromolécules de collagène plus neutres et moins disponibles pour interagir avec des acides carboxyliques du THA. La stabilité thermique pour cette condition permet de confirmer la présence de fibrilles matures avec une température de dénaturation typique des fibrilles de collagène à 53°C.

Suite à cela, la réticulation du THA a été conduite par voie enzymatique avec de la HRP et du H₂O₂. Dans un premier temps, elle a été effectuée selon un protocole que l'on a appelé standard se déroulant en deux étapes. Après avoir formé et rincé le réseau de collagène par gélification et fibrillogénèse au contact de vapeurs d'ammoniaque, la réticulation enzymatique a été conduite. Celle-ci n'a pas permis d'augmenter les propriétés mécaniques de l'hydrogel comme attendu après la réticulation du THA. Le rinçage essentiel pour maintenir le pH neutre nécessaire à l'activité enzymatique de la HRP a potentiellement provoqué la fuite du THA libre du réseau de collagène. Une deuxième hypothèse subsiste selon laquelle la HRP est une protéine trop grosse pour diffuser efficacement dans le réseau de collagène pour réticuler le THA. Le protocole standard a donc été jugé inefficace.

Un protocole inversé a alors consisté à effectuer la réticulation du THA en premier lieu suivie de la fibrillogénèse du collagène avec les vapeurs d'ammoniaque. Ce protocole s'est également avéré non approprié puisqu'il ne permettait pas d'améliorer significativement les propriétés physiques des hydrogels collagène/THA par rapport à un hydrogel de collagène pur.

Une stratégie d'imprégnation de l'hydrogel de collagène par du THA a été testée afin de compenser la perte de THA. Pour cela, après gélification et fibrillogénèse du collagène, un bain de THA est effectué pendant 2h permettant de saturer par diffusion le réseau de collagène avec des macromolécules non réticulés de THA. Une dernière étape a été de procéder à la réticulation enzymatique du THA afin de le figer dans le réseau de collagène et de former un réseau interpénétré. Ce protocole s'est avéré prometteur puisque les propriétés mécaniques ont été rétablies au niveau de celles des hydrogels de collagène pur fibrillé. Néanmoins, la réticulation

enzymatique est tout de même inefficace puisqu'aucune augmentation supplémentaire des propriétés mécaniques et thermiques n'a été observée après réticulation du THA. Cela montre que ce n'est pas la présence de THA qui limite l'efficacité de la réticulation enzymatique mais bien l'enzyme qui diffuse trop peu dans le réseau de collagène déjà formé. Ce protocole n'a donc pas été retenu à ce stade due à l'inefficacité de la réticulation enzymatique du THA sur notre système mais reste intéressant pour la suite du projet.

Pour améliorer la tenue mécanique des hydrogels collagène/THA et former de manière efficace le réseau de THA, différentes voies de réticulation ont ensuite été investiguées et optimisées : la photoréticulation aux UV avec la riboflavine et la photoréticulation à la lumière verte avec l'éosine Y. Les paramètres de réticulation comme les concentrations mais aussi les temps de réactions ou d'irradiation ont été modulés pour optimiser chacune des deux voies. La comparaison des deux voies a pu être faite selon trois critères : la structure du réseau, les propriétés rhéologiques et la stabilité thermique des hydrogels générés. Finalement, la photoréticulation à l'éosine a été retenue pour la suite de cette thèse car en plus d'atteindre les meilleures propriétés structurales, thermiques et mécaniques, nous pensons qu'elle est viable avec l'utilisation de cellules en raison des conditions plus douces de la lumière visible comparé aux UV. Les différents paramètres devront néanmoins être optimisés puisque la photoréticulation repose sur la libération de radicaux qui sont une source de stress cellulaire pouvant conduire à la mort.

Pour conclure, l'encre formulée pour l'impression 3D devra prendre en compte les résultats de cette étude physicochimique afin de générer des hydrogels performants. Cependant des ajustements devront être faits d'une part afin d'avoir une encre générant des hydrogels mimant l'Annulus Fibrosus et d'autre part pour diminuer la cytotoxicité de tels procédés. L'encre à développer devra être à l'image de la condition à pH 5,5 en présence de sels afin d'inhiber la formation de CPI par la formation de fibrilles de collagène et devra être réticulée à l'éosine Y par photoréticulation pour obtenir des hydrogels aux propriétés mécaniques, thermiques et structurales optimales.

Développement d'un modèle d'Annulus Fibrosus cellularisé par impression 3D

Résumé

Ce chapitre s'intéresse au développement du modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus. Afin d'obtenir un tel modèle par impression 3D, il faut adapter les conditions physico-chimiques précédemment décrites à la culture de cellules.

Il nous a fallu tout d'abord formuler une encre homogène et imprimable à partir de solutions denses de collagène I et d'acide hyaluronique afin de se rapprocher des propriétés physiques de l'Annulus Fibrosus. Ensuite, les paramètres d'impression de ces solutions ont été optimisés. Le but final est de générer un hydrogel dense anisotrope ayant le moins de porosité possible comme c'est le cas pour les lamelles d'AF. Ici, deux types d'encres ont été développées correspondant au protocole standard et au protocole d'imprégnation.

Une fois les paramètres d'impression validés, les hydrogels collagène/THA ont été cellularisés avec des fibroblastes humains. Pour cela, une étude biologique a été préalablement conduite afin d'affiner les conditions de fibrillogénèse du collagène et de réticulation du THA compatibles avec la viabilité cellulaire. Notre but était de trouver un compromis permettant de générer un biomatériau anisotrope avec de bonnes propriétés mécaniques tout en préservant la viabilité cellulaire.

La cellularisation de ces matériaux s'est effectuée en deux étapes. La première étape a consisté à cultiver les fibroblastes sur une seule couche d'hydrogel imprimé via la procédure « on top ». Une étude de viabilité cellulaire a été conduite sur 21 jours avec pour chaque temps de culture une observation de la morphologie, une étude de la

migration et une mesure de la prolifération des fibroblastes mis au contact de nos deux modèles (protocole standard et imprégnation).

Dans un second temps, des cellules ont été confinées entre deux couches d'hydrogels anisotropes pour mimer le micro environnement de l'AF. La viabilité, la prolifération, la morphologie cellulaire ainsi que le renforcement des hydrogels par les cellules ont été étudiés sur 14 jours pour nos modèles synthétisés via les deux protocoles.

Enfin, les deux procédures ont été comparées pour sélectionner la méthode adéquate permettant de générer un modèle d'Annulus Fibrosus cellularisé.

Chapitre 1 : Impression 3D de matrices collagène/acide hyaluronique

I. Formulation des encres

Pour générer un hydrogel via l'impression 3D par extrusion, il est nécessaire d'utiliser une encre avec des propriétés adéquates. Pour être imprimable, celle-ci doit être naturellement homogène et doit avoir une viscosité permettant la rétention de forme des filaments imprimés. Par ailleurs, utiliser un polymère rhéofluidifiant peut être un avantage pour l'impression. Dans notre étude, nous avons synthétisé deux encres : une encre de collagène pure et une composée d'un mélange de collagène et de THA. Les encres ont une concentration en collagène élevée à 30 mg.mL⁻¹.

1. L'encre de collagène

L'encre de collagène a été formulée afin de générer des hydrogels de collagène purs utilisés comme contrôles mais aussi pour synthétiser les hydrogels collagène/THA via le procédé d'imprégnation introduit en Partie 3.

En accord avec les résultats de l'étude physicochimique (Partie 3), nous avons utilisé une solution de collagène au pH 5. Pour cela, le collagène a été préalablement dialysé contre de l'acide acétique à une concentration de 17mM. Après 72h de dialyse, il est concentré par évaporation jusqu'à atteindre une concentration finale de 30 mg.mL⁻¹.

L'encre est conditionnée dans des seringues afin de remplir au fur et à mesure les cartouches d'impression (Figure 102(A)). Celle-ci étant stockée à 4°C, elle a tendance à produire un gradient de concentration au bout d'un certain temps de stockage à froid. C'est pourquoi nous avons besoin d'un système nous permettant d'homogénéiser rapidement l'encre avant l'impression. En effet, les paramètres d'impression changent drastiquement selon la concentration en collagène, celle-ci doit avoir des propriétés constantes. Lors d'un changement de batch de concentration, les paramètres doivent être vérifiés et réadaptés en conséquence s'il y a des variations de concentration. La viscosité de l'encre est un bon indicateur de la concentration et donc de son imprimabilité.

Le comportement rhéofluidifiant de l'encre composée de collagène pur a été étudié par rhéologie (Figure 102(C)). Sur la courbe liant la viscosité au taux de cisaillement, on observe que

la viscosité diminue en fonction du taux de cisaillement ce qui est caractéristique d'un fluide rhéofluidifiant et permet une meilleure imprimabilité.

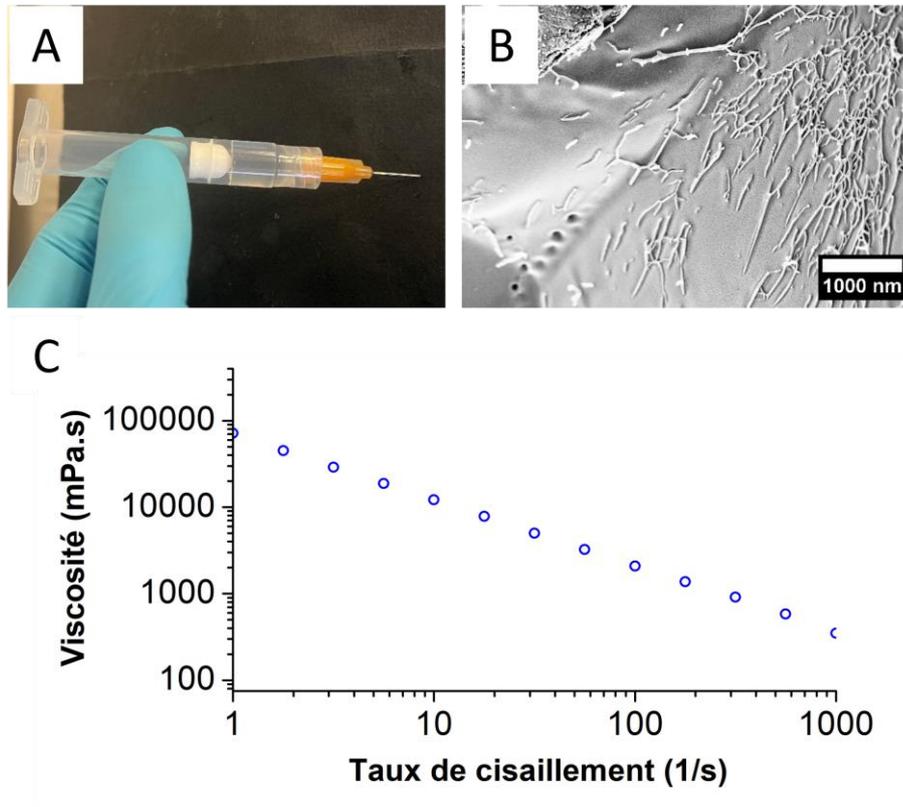


Figure 102 : Caractéristiques de l'encre de collagène dense : (A) Observation macroscopique (B) ultrastructure au Cryo MEB (20k) et (C) comportement rhéofluidifiant.

L'ultrastructure de l'encre a été observée par Cryo-MEB à l'Université de Nantes (Figure 102(B)). On observe clairement la présence de fibrilles en solution ce qui est cohérent avec les résultats obtenus avec les solutions de collagène dilué (4 mg.mL^{-1}) utilisé au même pH lors de l'étude physico-chimique.

2. L'encre collagène/THA

Cette encre a été formulée afin de produire des hydrogels collagène/THA correspondant au protocole standard de l'étude physicochimique (Partie 3) c'est-à-dire à un mélange direct de collagène avec du THA.

Une première expérience a été effectuée en incorporant le sel dans chacune des solutions stocks de collagène et de THA. Une concentration finale en sel à 200mM a été utilisée pour cette étude car la concentration utilisée lors de l'étude physicochimique (400 mM) serait toxique pour les cellules. Selon la littérature, les complexes polyioniques semblent être écrantés à 200mM ce qui ne devrait pas poser de problème d'homogénéité de l'encre (Chen et al., 2014).

Après la dialyse contre de l'acide acétique à 17mM, le collagène a été concentré par évaporation jusqu'à une concentration de 40 mg.mL⁻¹. Le sel a ensuite été ajouté pour atteindre une concentration finale de 200mM. A ce stade, nous avons vite été limités par la viscosité du collagène. En effet, à 40 mg.mL⁻¹, celui-ci est beaucoup trop dense pour pouvoir incorporer le sel de manière homogène. Des zones de précipitation locale du collagène étaient observées par un blanchiment localisé à l'endroit où le sel avait été ajouté. Le mélange à la spatule, au vortex et à l'ultraturax ont été inefficaces pour homogénéiser la solution.

Il a donc fallu trouver une autre méthode pour ajouter le sel. Après avoir dialysé le collagène contre de l'acide acétique à 17 mM, du NaCl à une concentration finale de 20mM a été ajouté sous agitation au collagène dilué à 4 mg.mL⁻¹. L'agitation a été maintenue pendant 2h pour que la solution soit homogène. La concentration s'effectue ensuite par évaporation pour atteindre 40 mg.mL⁻¹. Nous avons ajouté au départ 20 mM de NaCl car en concentrant d'un facteur 10 le collagène, nous concentrons en même temps le sel à 200 mM comme désiré.

A ce stade, la solution stock de collagène semble homogène (Figure 103(A)). Afin de s'en assurer, nous l'avons analysée par Cryo-MEB (Figure 103(B)). La présence de fibrilles dispersées de manière homogène en solution est observée. De plus, les fibrilles semblent plus matures et épaisses que dans l'encre de collagène sans sel. Ceci nous indique que la présence de sel déclenche le phénomène de fibrillogénèse. Ce résultat était attendu et confirme ceux obtenus lors de l'étude physico-chimique en phase diluée.

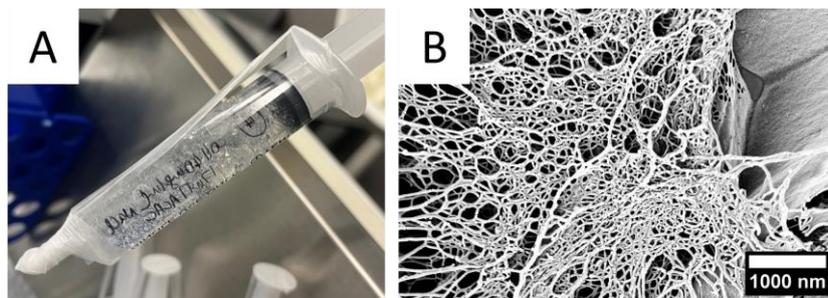


Figure 103 : Solution dense de collagène avec 200 mM de sel (A) Observation macroscopique et (B) ultrastructure observée au Cryo-MEB (x20k).

Pour réaliser l'encre collagène/THA, il a également fallu préparer une solution stock de THA en présence de sel. Cette solution a été concentrée à 30 mg.mL⁻¹ avec 200 mM de NaCl. Nous n'avons pas rencontré de problème d'homogénéisation lors de cette préparation puisque la viscosité était plus faible que celle du collagène à 40mg.mL⁻¹.

Le ratio de collagène : THA dans l'Annulus Fibrosus étant de 4 :1, la formulation de l'encre s'est faite en utilisant ce ratio avec des concentrations finales à 30 mg.mL⁻¹ en collagène et

7,5 mg.mL⁻¹ en THA. L'encre obtenue était homogène et transparente sans aucune trace de précipitation ou de complexation localisées (Figure 104(A)).

La présence de fibrilles dans l'encre concentrée de collagène/THA a été étudiée par Cryo-MEB (Figure 104(B)). Comme lors de l'étude physico-chimique, un réseau fibrillaire a été observé en solution grâce à la présence du NaCl. Ce dernier permet d'écranter les charges et de rendre le collagène moins disponible pour interagir avec le THA, d'où l'inhibition des complexes et l'obtention d'une encre transparente. De plus la présence de fibrilles en solutions a aussi pour conséquence d'inhiber la formation des complexes polyioniques.

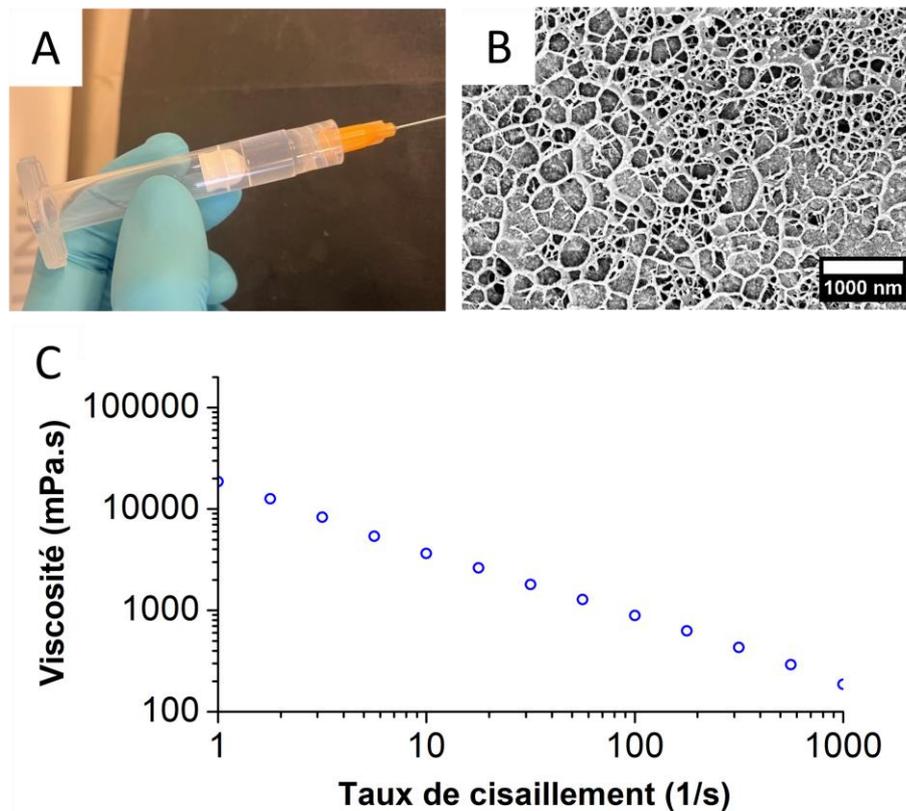


Figure 104 : Encre dense de collagène/THA (A) Observation macroscopique (B) ultrastructure au Cryo MEB (20k) et (C) comportement rhéofluidifiant.

Enfin le comportement rhéofluidifiant de l'encre collagène/THA a été mis en évidence en quantifiant la viscosité en fonction du taux de cisaillement (Figure 104(C)). Comme précédemment, la viscosité diminue lorsque le taux de cisaillement augmente ce qui est caractéristique d'un fluide rhéofluidifiant. Ce phénomène est le dernier facteur définissant l'imprimabilité d'une encre.

Nous avons donc formulé une encre dense et homogène de collagène/THA à un ratio 4 :1 en présence de 200mM de NaCl présentant un comportement rhéofluidifiant et avec une bonne imprimabilité.

II. Paramètres d'impression des encres

L'impression 3D des deux encres formulées a été conduite à l'aide d'une bio-imprimante BioX de CellInk sur laquelle plusieurs paramètres peuvent être modulés. Parmi eux, nous avons optimisé la pression d'extrusion, la vitesse de dépôt et le pourcentage de remplissage des couches d'hydrogel.

De plus, puisque nous voulons générer des hydrogels anisotropes, il faut générer de l'orientation entre les molécules de collagène dans les hydrogels imprimés. Pour cela, nous nous sommes inspirés des travaux de Lise Picaut et de Marie Camman lors de leurs thèses respectives consistant à générer des filaments ou des matrices de collagène anisotropes.

L'extrusion d'une encre de collagène directement dans un bain de fibrillation permet, grâce au cisaillement dans l'aiguille, d'aligner les triples hélices de collagène (Camman et al., 2023). Lorsque les filaments imprimés entrent en contact avec le bain de gélification, la fibrillogénèse et la gélification du collagène sont déclenchées instantanément. Ce processus permet donc de « figer » le système avec l'alignement désiré à la différence près que ce sont des fibrilles qui sont alignées et plus des triples hélices. Le bain de fibrillation a été optimisé pour être compatible avec la viabilité des cellules en plus de générer l'anisotropie des couches de collagènes.

1. L'encre de collagène

1.1. Optimisation du bain de fibrillation et de gélification

Picaut & al. ont démontré que pour fibriller un filament de collagène après extrusion, l'utilisation d'un bain de PBS pouvait être utilisé (Picaut et al., 2018). Selon la concentration de ce bain, la force ionique est plus ou moins grande. Plus elle est élevée, plus la cinétique d'auto-assemblage est rapide. Le PBS 5X est la concentration pour laquelle le filament gélifié ne gonfle pas post impression. De plus, la force ionique est suffisante pour contraindre les molécules de collagène sans contracter le filament. Lorsque du PBS 1X est utilisé, les filaments ont tendance à se dilater car la force ionique est plus faible.

Camman & al. ont démontré qu'il était possible de générer une matrice 3D de collagène anisotrope en utilisant un bain de PBS 5X (Camman et al., 2023). Pour générer ce matériau les filaments étaient tous imprimés dans le même sens pour avoir l'ensemble anisotrope. Cette matrice comportant 5 couches possède des propriétés mécaniques importantes ($E = 15$ kPa) et

surtout une cinétique de fibrillation de l'ordre de quelques minutes. La cinétique de fibrillation est un facteur clé dans la conception d'hydrogels anisotropes car plus elle est lente plus les phénomènes de diffusion de matière sont permis. S'il y a trop de diffusion, le filament gonfle, est moins défini et surtout les molécules de collagène perdent leur alignement.

Dans notre étude, nous ne pouvons pas travailler avec du PBS 5X car il créerait un choc osmotique pour les cellules provoquant leur lyse. Nous avons donc testé trois bains de gélification différents pour comprendre l'effet qu'ils avaient sur le filament imprimé. Le PBS 5X étant la référence pour laquelle le filament ne gonfle pas, nous l'avons sélectionné comme contrôle positif. Puis nous avons également testé un bain de PBS 1X et un bain de PBS 2X. Dans chacun de ces bains, ont été ajouté $10^{-3}M$ de NaOH afin d'augmenter légèrement leur pH et de faciliter la fibrillogénèse.

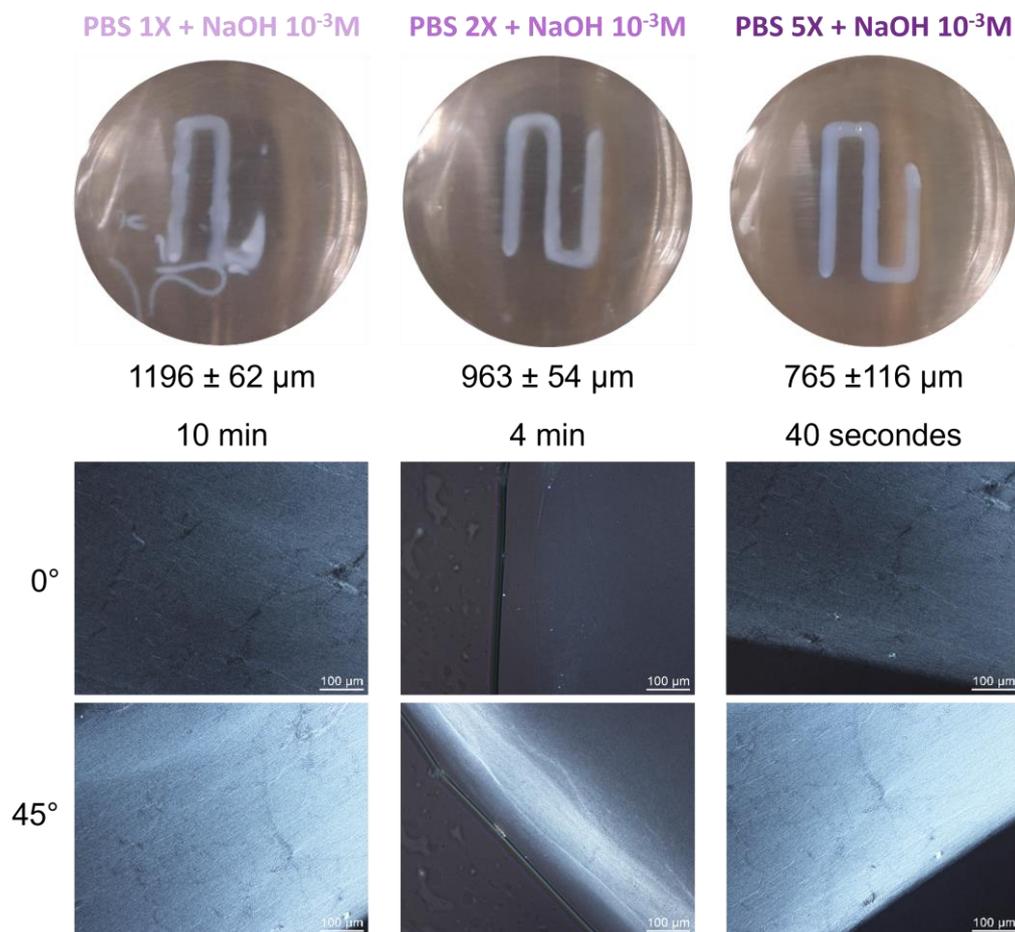


Figure 105 : Impact du bain de fibrillation sur le temps de fibrillation, la définition et la taille des filaments extrudés ainsi que sur l'anisotropie du collagène.

Pour les trois bains, un pH final de 7,5 est obtenu. Seule la force ionique est modifiée. Les essais ont été faits avec une aiguille 23G avec une pression de 95 kPa, une vitesse de 5mm/s, une température de plateau de 11°C et une température de buse de 8°C. Les paramètres de pression et

de vitesse ont été fixés arbitrairement jusqu'à ce que de la matière soit extrudée mais ils seront affinés dans les parties suivantes. Enfin, les filaments ont été extrudés à un pourcentage de remplissage de 10% afin de les discerner clairement et de ne pas avoir un effet supplémentaire dû au contact avec d'autres filaments.

Macroscopiquement, nous observons une différence de définition du filament selon la force ionique du bain (Figure 105). Les filaments sont très bien définis lorsqu'ils sont extrudés dans un bain de PBS 5X avec 10^{-3} M de NaOH. A contrario, lorsque du PBS 1X est utilisé, ils semblent plus diffus et de forme irrégulière.

Nous pouvons lier cette impression de diffusion et gonflement au temps de fibrillation de chaque bain. Lorsqu'un bain de PBS 1X est utilisé, le collagène blanchit après 10 minutes de contact dans le bain. Ce blanchiment est un bon indicateur de la fibrillogénèse et la gélification du collagène. Le temps est diminué par 2 pour un bain de PBS 2X et par 10 pour un bain de PBS 5X. Plus la cinétique est lente plus on observe des phénomènes de diffusion qui mènent à des filaments moins bien définis comme c'est le cas pour le bain de PBS 1X. Ceci a également un impact sur la taille des filaments qui a tendance à augmenter lorsque la cinétique est faible et que la diffusion est importante. Par exemple la taille des filaments est réduite de 36% en passant du bain de PBS 1X au bain de PBS 5X. Il est à noter que les filaments gélifiés avec du PBS 2X sont pratiquement aussi bien défini que ceux réalisés avec du PBS 5X, montrant que cette force ionique est suffisante pour le maintien de forme.

Nous avons complété ces premiers essais par l'observation au Microscope optique à Lumière Polarisée (MOLP) des filaments extrudés. Pour les trois bains utilisés, une extinction est observée entre 0 et 45° signifiant la présence de biréfringence dans l'hydrogel et lié à l'alignement des molécules de collagène dans une même direction. L'extinction n'est pas totale car un phénomène « cœur/coquille » est présent comme décrit par Picaut et *al* (Picaut et al., 2018).

Pour conclure, les résultats obtenus sont en adéquation avec les observations faites dans les travaux de Picaut et *al* et de Camman et *al* puisqu'en augmentant la force ionique du bain on obtient des filaments mieux définis plus rapidement et orientés.

Pour prendre en compte les propriétés physiques recherchés et la préservation de la viabilité cellulaire., nous avons choisi de poursuivre avec du PBS 2X et 10^{-3} M de NaOH qui nous permet d'obtenir des filaments orientés avec moins de gonflement et de diffusion qu'en PBS 1X.

Il faut ensuite évaluer la toxicité de ces conditions sur les cellules même si d'après la littérature, il s'agit de conditions plus douces pour les cellules.

1.2. Optimisation de la pression

Une fois le bain de PBS 2X/NaOH 10^{-3} M sélectionné, nous nous sommes intéressés à un deuxième paramètres très importants : la pression d'extrusion. En effet, si elle est trop élevée, le dépôt de matière sera trop important et le filament sera plus gros que le diamètre interne de l'aiguille d'extrusion. Ceci peut poser problème notamment pour la résolution finale du construit imprimé. A contrario, si celle-ci est trop faible, le filament sera trop fin voire inexistant. Cela peut également laisser place à la présence de trous dans la structure et peut affecter l'orientation puisque le taux de cisaillement ne sera pas suffisant pour aligner les triples hélices de collagène le long de l'aiguille.

Nous avons donc généré des filaments avec les mêmes paramètres que précédemment utilisés pour l'optimisation du bain de fibrillation. Puis nous avons modulé la pression en fixant une gamme allant de 70 kPa, pression la plus faible pour laquelle de la matière est extrudée, jusqu'à 95 kPa. Les filaments résultants ont été observés au MOLP afin de déterminer leur taille ainsi que leur biréfringence (Figure 106).

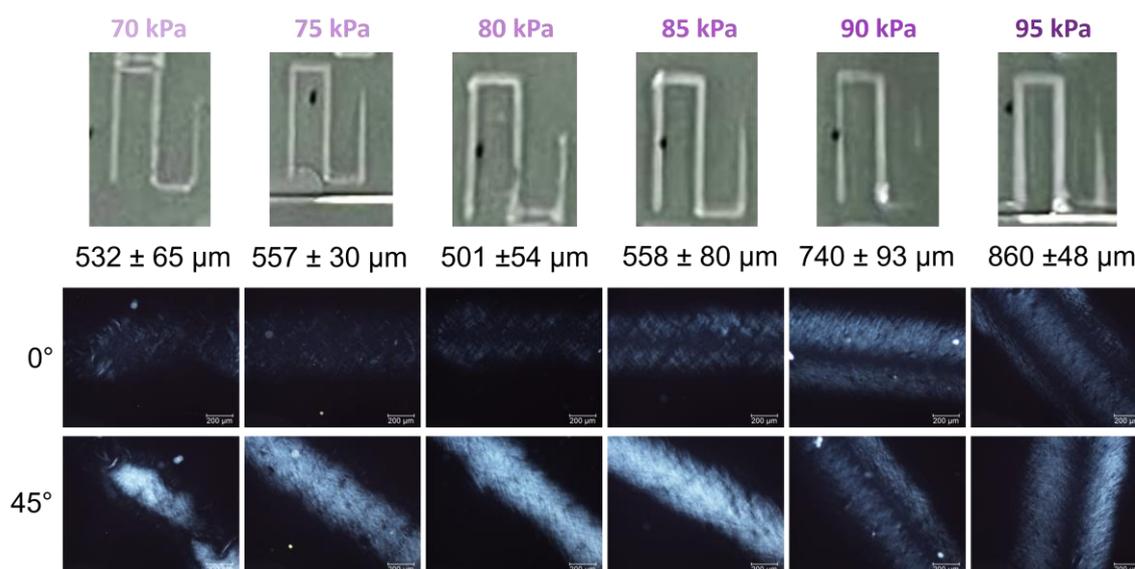


Figure 106 : Impact de la pression sur la taille des filaments et leur biréfringence.

Il est à noter que lorsque la pression est trop élevée (95 kPa), les filaments mesurent 860 μm de diamètre ce qui est plus du double du diamètre interne de l'aiguille (330 μm). Il est normal d'observer un peu de gonflement puisqu'on utilise un bain de PBS 2X cependant il faut qu'il soit minimisé pour ne pas perdre en orientation et en définition. Ici à 95 kPa, en plus d'être gros, les filaments perdent de l'orientation comme observé en lumière polarisée.

En diminuant la pression à 80 kPa, on obtient des filaments mieux définis d'environ 500 μm et anisotropes puisqu'on observe de la biréfringence entre les polariseurs croisés. En dessous de 80 kPa, la pression devient insuffisante se traduisant par des manques de matière à certains

endroits et de pertes d'orientation dû au cisaillement insuffisant. Néanmoins, le diamètre moyen des filaments atteint un plateau autour de 532 μm à 70 kPa.

Nous avons donc déterminé que la pression optimale d'impression pour laquelle le diamètre est le plus petit tout en générant des hydrogels orientés est de 80 kPa.

Dans le cadre des travaux de Marie Camman qui imprimait du collagène à 30 mg.mL^{-1} dans de l'acide acétique à 0,5 M, la pression utilisée était de 60kPa ce qui est assez proche de notre valeur de pression. Bien entendu, les différences de pression peuvent être dues à la fois aux différences minimales de concentrations en collagène, à la différence de viscosité due à la concentration en acide acétique mais également aux conditions de gélification du bain.

1.3. Optimisation de la vitesse

La vitesse d'extrusion a également été optimisée avec les paramètres précédemment établis et le bain sélectionné. L'impression a été faite à une pression de 80 kPa, une température de plateau à 11°C, une température de buse à 8°C et un pourcentage de remplissage de 10% dans un bain de PBS 2X/NaOH 10^{-3} M. La vitesse a été modulée entre 4 et 6 mm/s.

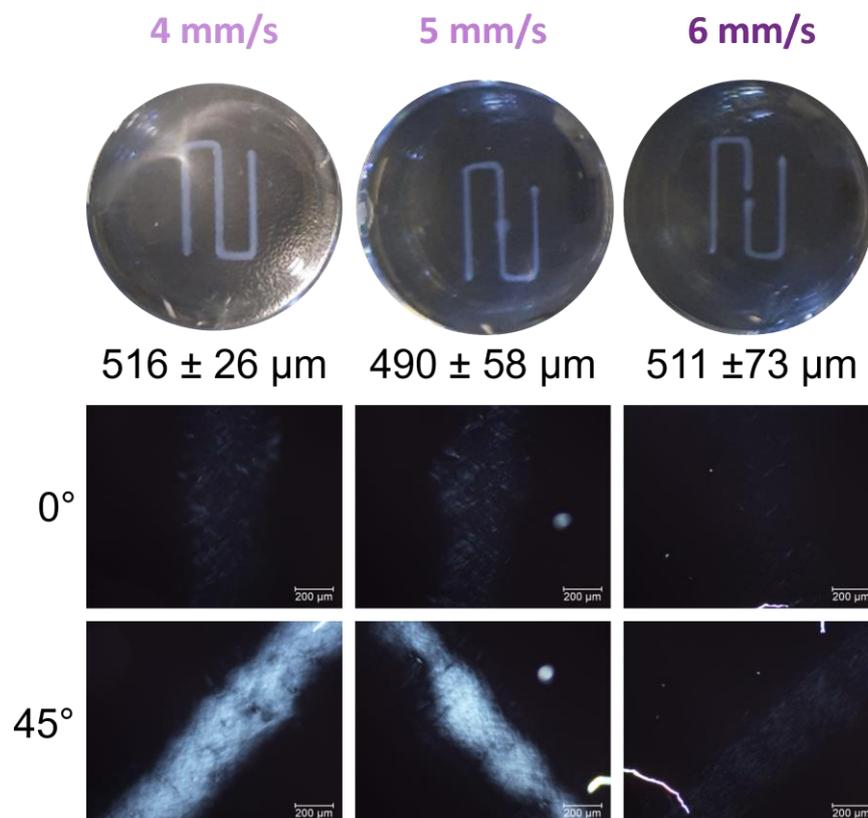


Figure 107 : Impact de la vitesse d'impression sur les filaments générés et l'orientation des fibrilles de collagène.

Les filaments produits ont une épaisseur de l'ordre de 500 μm pour les trois vitesses utilisées (Figure 107). Les filaments sont continus et bien définis quelle que soit la vitesse. Néanmoins, l'orientation des fibrilles de collagène varie selon la vitesse utilisée. Alors qu'aucune biréfringence ne semble être générée à 6mm/s, à 4 et 5 mm/s, des extinctions sont observables sous polariseurs croisés synonyme de biréfringence du collagène et d'alignement. Néanmoins, la biréfringence semble plus intense et plus homogène à 4mm/s.

Lorsque la vitesse est excessivement élevée (6mm/s), le dépôt est si rapide que la matière est à peine déposée sur le support d'où la perte d'alignement et de matière observées expérimentalement. A contrario si elle est trop faible, le dépôt de matière est trop important ce qui crée des filaments épais où l'alignement peut également être perturbé. Certaines fois, si la vitesse est vraiment trop faible, de la tortuosité peut également être générée lors du dépôt.

En vue de ces résultats nous avons choisi d'utiliser une vitesse d'impression de 4 mm/s.

1.4. Optimisation du pourcentage de remplissage

Le dernier paramètre à optimiser est le pourcentage de remplissage. Celui-ci définit l'écart entre deux filaments adjacents et la cohésion de la couche. Plus le pourcentage de remplissage est élevé plus les filaments sont proches.

Dans le cadre de notre projet, le tissu natif est cohésif sans porosité pour former des lamelles concentriques. Par conséquent, il faut que le matériau présente le moins de porosité possible. Nous avons donc optimisé le pourcentage de remplissage afin que les filaments adjacents soient en contact (pas de porosité) sans se superposer pour que la couche soit la plus plane possible sans perturber l'alignement. En effet, lorsqu'il est trop élevé, les filaments se superposent provoquant une architecture de surface irrégulière avec des bosses et des creux importants. Cela pose problème quant à l'impression d'une seconde couche après ajout des cellules puisque l'adhérence et la hauteur d'impression ne seront pas les mêmes partout. De plus, une porosité importante est générée entre les couches due aux zones de superposition. Ici le pourcentage de remplissage a été modulé entre 30 et 100% pour trouver la condition optimale (Figure 108).

Lorsque le pourcentage de remplissage est trop faible, c'est-à-dire inférieur à 70%, on observe des zones de non contact entre les filaments. La couche n'est pas cohésive et le diamètre moyen des filaments oscille entre 477 et 561 μm . De la biréfringence est observée sous polariseur croisé mais les filaments n'étant pas en contact, ces conditions ne sont pas optimales.

A contrario, lorsque le pourcentage de remplissage est supérieur à 80%, les filaments sont en contact et le diamètre des filaments diminue drastiquement pour atteindre 284 μm à 100%. Ici, la biréfringence du collagène est maximale mais les filaments se superposent comme observé au goniomètre sur une vue de profil (Figure 108). Comme discuté précédemment, la superposition des filaments n'est pas souhaitée car cela peut engendrer des inhomogénéités ainsi que de la porosité supplémentaire. De plus cela ne permet pas de reproduire la structure lamellaire observée dans l'AF.

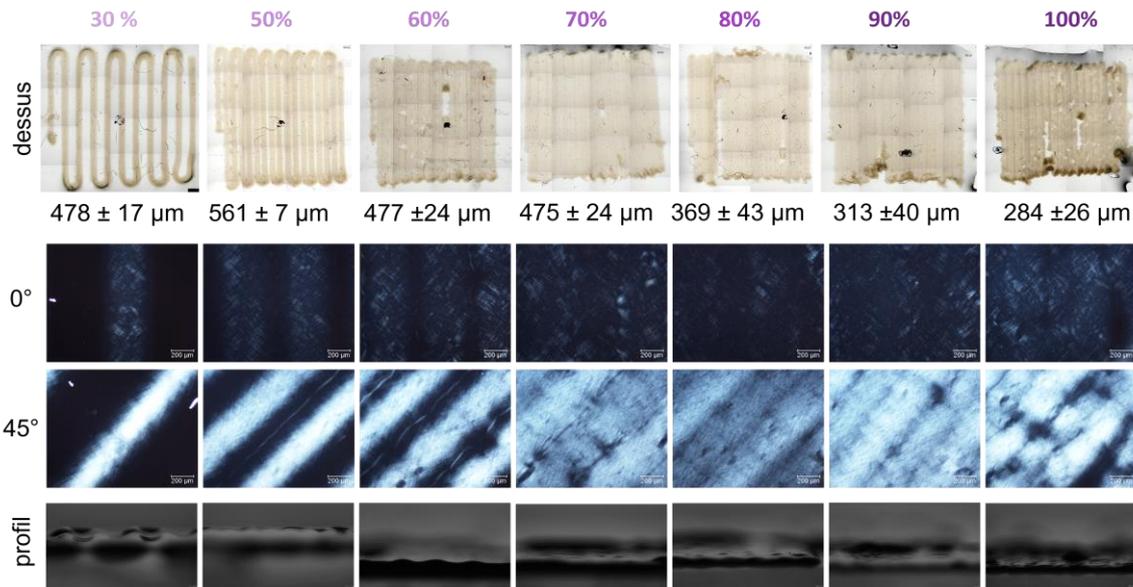


Figure 108 : Impact du pourcentage de remplissage sur le diamètre des filaments, leur anisotropie et leur superposition.

Avec 80% de remplissage, les filaments sont tous en contact les uns avec les autres pour un diamètre moyen de 369 μm , ce qui est proche du diamètre interne de l'aiguille (330 μm). Les fibrilles de collagène sont alignées car elles génèrent un signal très biréfringent. La vue de profil confirme bien qu'aucune superposition n'a lieu dans ces conditions et que la surface est lisse. Finalement, la condition à 80% de remplissage nous semble optimale pour poursuivre l'impression de matrices de collagène.

2. L'encre collagène/THA

Lorsque la nature de l'encre est modifiée, cela pourrait avoir un impact sur ses paramètres d'impression. C'est pourquoi, après avoir formulé l'encre de collagène/THA, il nous a fallu optimiser les paramètres d'impression en prenant comme base ceux du collagène pur.

Les températures de plateau et de buse restent les mêmes ainsi que le bain de fibrillogénèse. Seule la pression, la vitesse et le pourcentage de remplissage ont été optimisés.

2.1. Optimisation de la pression

Le premier paramètre optimisé pour l'impression de l'encre de collagène/THA a été la pression. Pour cela, la vitesse a été fixée provisoirement à 5 mm/s. La gamme de pression testée commence à 75 kPa qui se trouve être la pression minimale pour laquelle l'encre commence à s'écouler de l'aiguille. La pression a ensuite été augmentée pour atteindre 85 kPa (Figure 109).

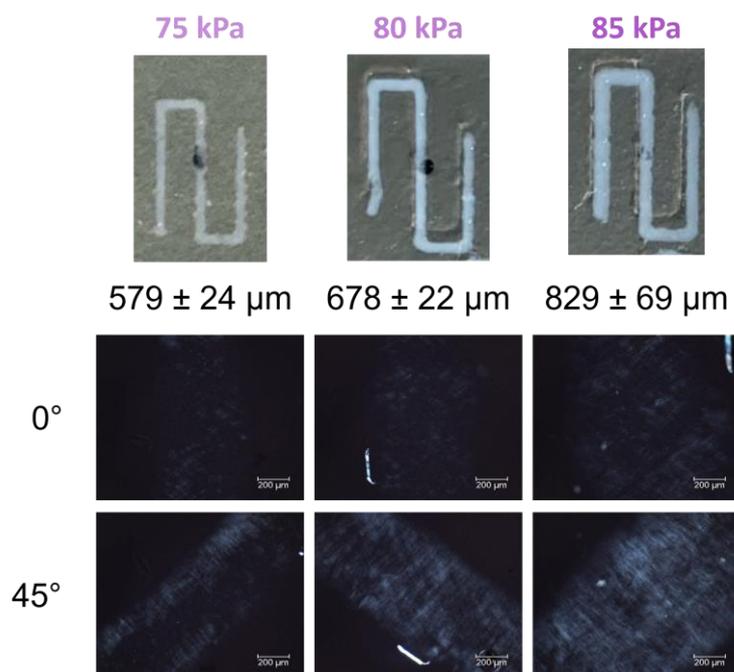


Figure 109 : Impact de la pression sur le diamètre des filaments de collagène/THA et l'orientation du collagène.

A 75kPa, les filaments générés avaient un diamètre moyen autour de de 579 μm. Lorsqu'il a été observé sous polariseurs croisés, aucune biréfringence du collagène n'a été observée de par le cisaillement insuffisant de la solution dense de collagène.

A 85 kPa, le diamètre moyen observé est de 829 μm soit près de 45% de gonflement par rapport à celui généré à 75kPa. Celui-ci présente quelques tortuosités ponctuelles synonyme de pression trop élevée. Sous polariseurs croisés, de la biréfringence est observée même si elle est moins importante que celle observée pour le collagène pur.

Finalement, lorsqu'on utilise une pression intermédiaire à 80 kPa, le diamètre moyen des filaments extrudés est de 678 μm et semble régulier et bien défini. Il démontre autant d'alignement qu'à 85kPa. Cette pression nous semble donc être optimale et est celle sélectionnée pour la suite de l'impression de l'encre collagène/THA. Néanmoins, il est à noter que la perte de biréfringence est dû à la présence de THA. Le THA semble donc perturber l'orientation du collagène même si les CPI ont été inhibés.

2.2. Optimisation de la vitesse

La vitesse de dépôt du filament sur le support a été ensuite affinée. Une gamme comprise entre 5 et 7 mm/s a été testée tout en gardant les autres paramètres fixes. Les résultats sont présentés en Figure 110.

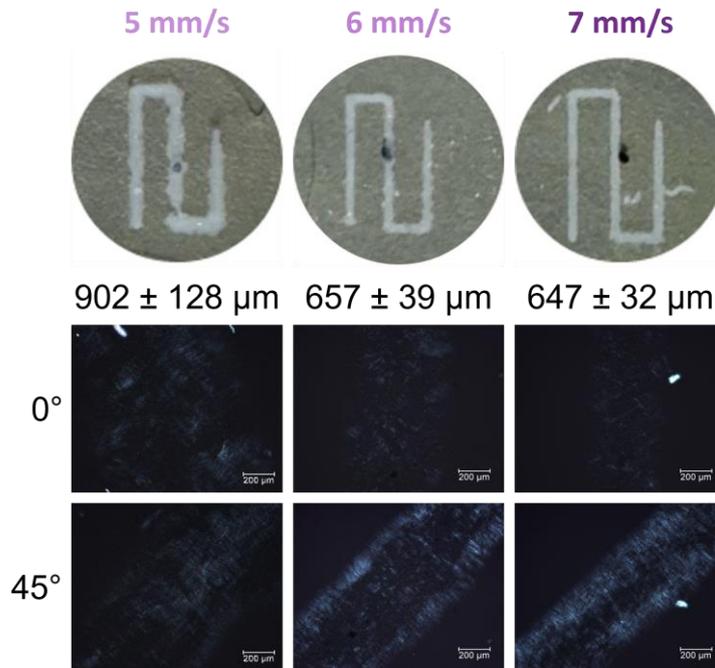


Figure 110 : Impact de la vitesse d'impression sur la taille des filaments et la biréfringence du collagène.

A 5 mm/s, des filaments présentant une forte tortuosité sont obtenus. Le diamètre moyen des filaments est également supérieur puisqu'il mesure environ 900 μm . La tortuosité des filaments vient de la vitesse qui est trop faible puisque la pression a déjà été optimisée précédemment. Lorsque la vitesse est trop faible, trop de matière est déposée sur le support malgré l'extrusion continue du filament ce qui provoque ces tortuosités. De plus, cela perturbe également l'alignement du collagène puisque aucune biréfringence n'est observée.

La vitesse a alors été augmentée à 6mm/s. La tortuosité des filaments est toujours observée mais de manière moins importante qu'à 5 mm/s. Le diamètre moyen des filaments est également diminué à 657 μm . Sous polariseurs croisés, les fibrilles de collagène présentent une légère extinction synonyme de plus d'orientation que précédemment. Néanmoins, la tortuosité des filaments restant importante et l'alignement n'étant pas satisfaisant, nous avons tenté une troisième vitesse.

A 7 mm/s, les filaments sont bien définis et ne présentent plus de tortuosités. Le diamètre moyen des filaments reste autour de 647 μm et une biréfringence plus nette du collagène est

observée sous polariseurs croisés par la présence d'une extinction du filament. C'est cette vitesse qui a été sélectionnée pour imprimer l'encre collagène/THA.

2.3. Optimisation du pourcentage de remplissage

Le pourcentage de remplissage a été optimisé de telle sorte que tous les filaments soient en contact sans se superposer. L'objectif est d'obtenir un hydrogel cohésif anisotrope avec le moins de porosité possible comme vu précédemment pour l'encre de collagène.

Pour cela, le pourcentage de remplissage a été modulé entre 30% et 100% tout en maintenant les autres paramètres constants (Figure 111).

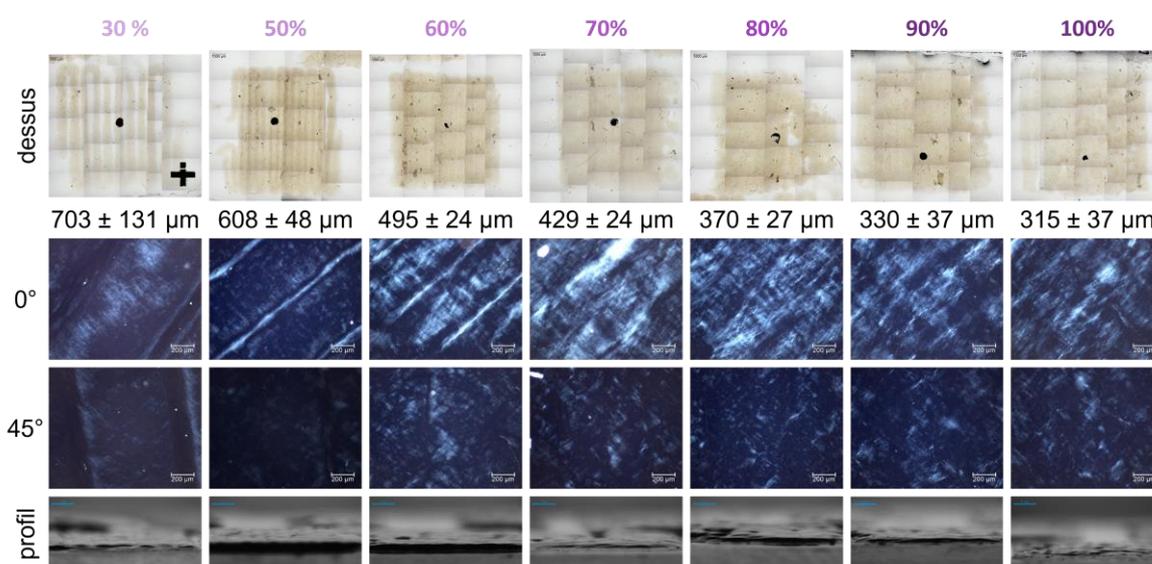


Figure 111 : Impact du pourcentage de remplissage sur la cohésion des couches, le diamètre des filaments, l'orientation des fibrilles de collagène et de la porosité de surface vue de profil.

Lorsqu'un pourcentage de remplissage inférieur à 70% est utilisé, les filaments ne sont pas entièrement en contact voire pas du tout pour les valeurs les plus basses. Les filaments ont un diamètre moyen élevé qui atteint 703 μm à 30% de remplissage. Les hydrogels générés présentent peu de biréfringence et leur profil est majoritairement constitué de creux et de bosses significatif de la non cohésion des filaments.

A partir de 80% de remplissage, les filaments sont tous en contact et l'hydrogel est cohésif. Le diamètre des filaments est significativement diminué pour atteindre un plateau autour de 350 μm. A partir de 90% de remplissage, de la superposition est observée sur les vues de profil avec des bosses et des creux plus prononcés et la biréfringence du collagène semble légèrement perturbée.

A 80% de remplissage, la biréfringence est maximale et le profil d'impression semble être linéaire. Nous considérons donc 80% comme la valeur optimale pour la suite de l'impression 3D de l'encre dense de collagène/THA.

III. Fabrication des matrices anisotropes collagène/THA

Une fois les paramètres d'impression optimisés, nous avons pu nous concentrer sur la fabrication de matrices anisotropes de collagène/THA non cellularisées. Ici, l'objectif est de se servir de ces paramètres d'impression pour fixer les protocoles d'impression des matrices. Ces protocoles s'appuient sur les expériences menées lors de l'étude physicochimique (Partie 3).

Le protocole standard repose sur l'impression de l'encre dense collagène/THA dans un bain de PBS 2X et 10^{-3} M de NaOH pour déclencher la fibrillogénèse et la gélification du collagène suivi d'une étape de réticulation du THA avec de l'éosine en présence de lumière visible.

Le protocole d'imprégnation repose sur l'impression de l'encre dense de collagène dans le même bain de fibrillation suivi d'une étape d'imprégnation avec un bain de THA et d'éosine. Après ce bain, la réticulation du THA imprégné dans le réseau fibrillaire de collagène est conduite sous lumière visible. En vue de l'utilisation de cellules, il est essentiel d'optimiser chacun de ces protocoles afin que le procédé, les conditions de gélification du collagène et celles du THA soient compatibles avec la survie cellulaire.

Par conséquent, une étude préliminaire de cytotoxicité a été effectuée afin de trouver un compromis entre la biologie et la physicochimie. Suite à cela, le protocole d'imprégnation puis le protocole standard ont pu être adaptés afin de générer des matrices non cellularisées avec une cytocompatibilité et des propriétés physiques optimales.

1. Etude préliminaire de cytotoxicité du procédé sur des fibroblastes

Les fibroblastes ont été sélectionnés pour la cellularisation de nos matrices car ils ressemblent aux cellules d'AF. Deux facteurs critiques dans nos protocoles peuvent provoquer de la toxicité cellulaire : la photoréticulation et le bain de fibrillogénèse. Nous nous focaliserons sur l'impact de ces phénomènes sur la survie des fibroblastes.

1.1. Etude de la toxicité du procédé de fibrillogénèse sur des fibroblastes

La potentielle toxicité du bain de fibrillogénèse (PBS 2X/NaOH 10^{-3} M) peut venir de sa force ionique étant donné que le pH de ce bain est neutre. Afin de s'assurer de la cytocompatibilité de notre procédé, l'effet du bain de fibrillation sélectionné sur la viabilité cellulaire a été étudié.

Pour cela, nous avons effectué un test Alamar Blue sur des fibroblastes ayant été au contact de ce bain pendant différents temps. Un contrôle cellulaire sans exposition au bain de fibrillation a été fait pour évaluer la toxicité. Les cellules ont été incubées dans du PBS 2X/NaOH 10^{-3} M pendant 10 min, 30 min, 1h, 2h, ou 4h. Afin de mesurer l'impact de cette exposition, le test d'Alamar Blue a été fait 24h après l'exposition pour mesurer l'activité métabolique des cellules. Pour déterminer la toxicité du bain de fibrillation, les activités métaboliques des cellules au contact avec le PBS 2X ont été comparées à celle de cellules cultivées dans leur milieu de culture (non traitées). Si celle-ci est inférieure à 80%, on en déduit que la condition est toxique pour les fibroblastes.

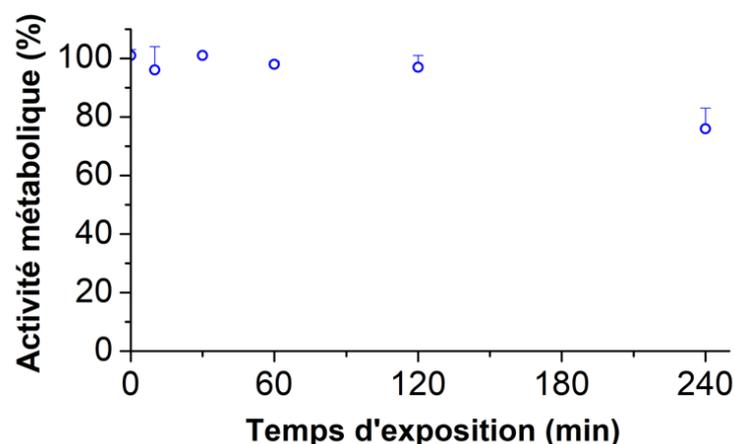


Figure 112 : Impact du temps d'exposition du bain de fibrillation (PBS 2X, NaOH 1 mM) sur l'activité métabolique des fibroblastes.

L'activité métabolique mesurée reste à 100% de celle mesurée dans les échantillons contrôles si le temps d'exposition n'excède pas 2 heures. Après 4h d'exposition au PBS 2X, elle décroît légèrement sous les 80%. Il s'agit donc d'une condition légèrement toxique pour les cellules. Pour tenir compte de ces résultats, la fibrillogénèse du collagène ne doit pas durer plus de 2h afin de ne pas engendrer de cytotoxicité. Ceci ne semble pas poser problème car comme vu précédemment, la fibrillogénèse du collagène dans un tel bain se déclenche au bout de 4 minutes et semble être complète au bout de 20 minutes (saturation du blanchiment).

1.2. Etude de la cytotoxicité du procédé de photoréticulation du THA à l'éosine sur des fibroblastes

Le second facteur pouvant impacter la viabilité cellulaire est la photoréticulation. Nous savons qu'une des sources de mortalité cellulaire est le stress oxydant via la présence de radicaux. La photoréticulation étant un processus radicalaire, de nombreux radicaux sont libérés pouvant engendrer une mortalité cellulaire. Afin de quantifier la cytotoxicité du procédé de photoréticulation du THA à l'éosine, plusieurs tests ont été conduits.

Dans un premier temps, nous avons souhaité étudier la toxicité de l'éosine seule sans irradiation. Pour cela nous avons modulé trois paramètres :

- le milieu de dilution de l'éosine qui peut être soit du PBS 1X comme dans l'étude physicochimique soit du DMEM pour sa moindre cytotoxicité ;
- la concentration d'éosine dans une gamme allant de 0 à 0,4 mg.mL⁻¹ en gardant en tête que 0,2 mg.mL⁻¹ est la condition optimale d'après l'étude physico chimique ;
- le temps d'exposition des cellules à l'éosine qui s'étend à 1 ou 2h pour être adaptable au protocole d'imprégnation.

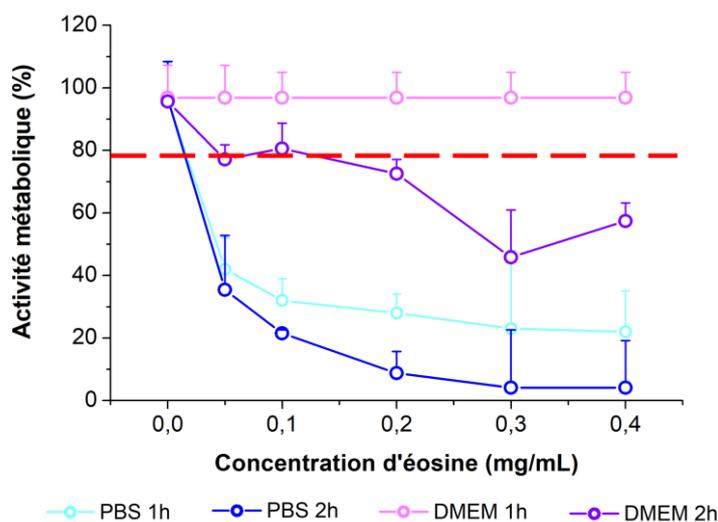


Figure 113 : Impact du milieu de dilution, de la concentration et du temps de contact de l'éosine sur l'activité métabolique des fibroblastes (barre rouge : limite en dessous de laquelle il y a toxicité).

Comme précédemment, l'évaluation de l'activité métabolique a été faite 24h après l'exposition à l'éosine en calculant le pourcentage de réduction de la résazurine. L'activité métabolique a été déterminée comme un pourcentage de viabilité par rapport au puits contrôle pour lequel aucune exposition n'a eu lieu (Figure 113).

Quelle que soit la concentration en éosine et le temps de contact, lorsque l'éosine est diluée dans du PBS 1X, l'activité métabolique chute drastiquement. Elle n'est jamais supérieure à 80% ce qui exclut d'emblée la dilution dans du PBS 1X.

Lorsque la solution stock d'éosine est faite dans du DMEM, l'activité métabolique est meilleure. Un temps de contact de 1h semble préférable puisqu'il permet de maintenir l'activité métabolique à 100% quelle que soit la concentration en éosine. Néanmoins, il est également possible d'effectuer des temps de contact de 2h à condition que la concentration en éosine soit inférieure ou égale à 0,1 mg.mL⁻¹ sans quoi la cytotoxicité serait trop élevée. Lorsque la concentration est supérieure à 0,1mg.mL⁻¹ et que l'exposition dure 2h dans du DMEM, l'activité métabolique diminue de sorte qu'elle soit inférieure à la valeur seuil de 80%.

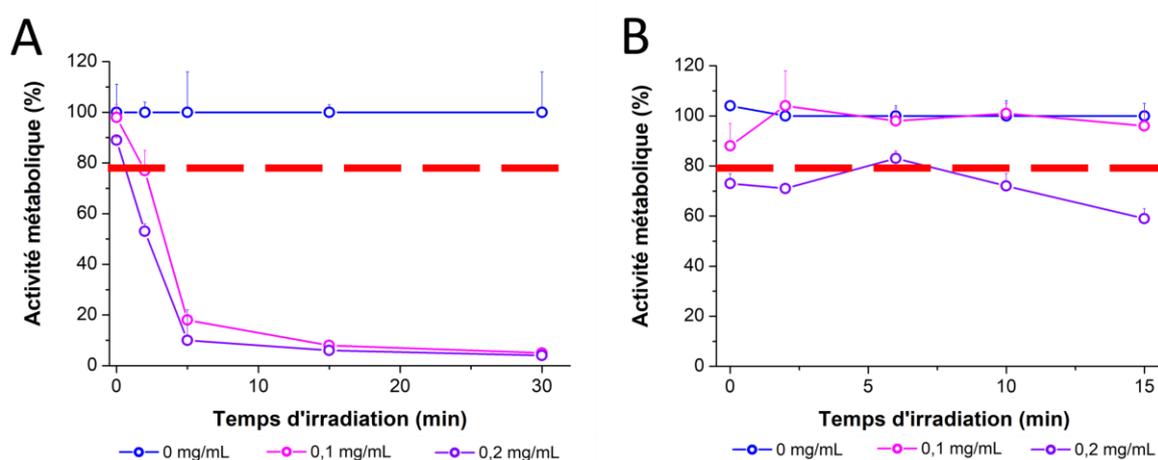


Figure 114 : Impact de la concentration d'éosine (entre 0 et 0,2mg.mL⁻¹) et du temps d'irradiation sur l'activité métabolique des fibroblastes selon si (A) la lampe Eurolite est utilisée (0 à 30 min d'irradiation) ou (B) le module de l'imprimante est utilisé (0 à 15 minutes) (barre rouge = limite en dessous de laquelle il y a toxicité).

Dans un second temps nous avons étudié la cytotoxicité engendrée par la présence de radicaux. Pour cela, deux sources de lumière ont été testées : une lampe LED verte Eurolite avec une puissance de 30 Watts (Figure 114(A)) et le module à 520 nm équipé sur l'imprimante 3D dont on ne connaît pas la puissance mais qui semble chauffer moins que la précédente (Figure 114(B)). Le temps d'irradiation et la concentration en éosine ont aussi été modulés respectivement entre 0 et 15 minutes et 0 mg.mL⁻¹ et 0,2 mg.mL⁻¹.

Indépendamment du temps d'irradiation, l'activité métabolique chute drastiquement lorsque la lampe puissante Eurolite est utilisée pour être nulle avec 0,1 et 0,2 mg.mL⁻¹ d'éosine. Lorsque l'irradiation est effectuée sans éosine, aucune toxicité n'est observée (Figure 13). Cela s'explique par le fait qu'en combinant la présence d'éosine avec l'irradiation de la lampe, des radicaux libres sont générés qui sont directement toxiques pour les cellules.

En utilisant la LED à 520 nm de l'imprimante 3D qui est moins puissante, la toxicité est bien moins importante. Avec $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'éosine, l'activité métabolique reste à son maximum même après 15 minutes d'irradiation. Enfin, à $0,2 \text{ mg.mL}^{-1}$ en éosine, l'activité métabolique diminue légèrement mais suffisamment pour passer en dessous du seuil des 80% peu importe le temps d'irradiation conduit.

Cette étude nous a permis de conclure que pour avoir une activité métabolique haute avec des fibroblastes :

- Le temps de fibrillation avec le bain de PBS/NaOH 10^{-3} M ne doit pas excéder 2h.
- L'éosine doit être diluée dans du DMEM à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ et ne doit pas être mise en contact plus de 2h avec les cellules.
- La source d'irradiation utilisée doit être le module de l'imprimante 3D puisqu'il induit moins de cytotoxicité sur les fibroblastes que la lampe Eurolite qui est plus puissante
- Avec cette même source de lumière, l'irradiation peut être conduite à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'éosine pendant 15 minutes sans déclencher de toxicité.

Une fois tous ces paramètres mis en évidence, nous avons pu les mettre au regard des propriétés du matériau en résultant en optimisant d'une part le protocole d'imprégnation puis le protocole standard.

2. Protocole d'imprégnation

Le protocole d'imprégnation repose sur l'utilisation de l'encre de collagène pure. L'élaboration des matrices avec ce protocole se fait en trois temps. Dans un premier temps un hydrogel est généré par impression 3D de l'encre de collagène dense. Une fois le collagène gélifié et fibrillé dans un bain de PBS 2X/NaOH 10^{-3} M , une solution de THA à 3% en masse et d'éosine à $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ est mise au contact de l'hydrogel pour imprégner la matrice de collagène. Enfin, l'excédent est rincé et le gel de THA formé par photoréticulation à l'aide des deux lampes précédemment utilisées (Eurolite vs module à 520 nm de l'imprimante 3D).

Afin d'optimiser les performances du matériau, nous avons conduit une étude systématique modulant à la fois le temps d'imprégnation, le temps de réticulation et le type de lampe utilisé tout en prenant en compte les résultats de cytotoxicité.

Des temps d'imprégnation en THA de 30 minutes, 1h, 2h ou 24h ont été effectués. Le temps de 24h représente la condition pour laquelle il y a saturation d'acide hyaluronique dans la

matrice de collagène. L'objectif est donc de quantifier l'efficacité de l'imprégnation des autres temps par rapport à ce contrôle.

Des temps de photoexposition de 5, 10, 15 ou 30 minutes ont été effectués pour chaque temps d'imprégnation afin d'évaluer la proportion de THA gélifiée dans le réseau et donc l'efficacité de la réticulation.

L'expérience a été conduite avec la puissante lampe Eurolite qui a été utilisée dans l'étude physicochimique mais dont la puissance était cytotoxique ou avec le module LED à 520 nm de l'imprimante 3D qui est moins puissant mais non toxique pour les cellules.

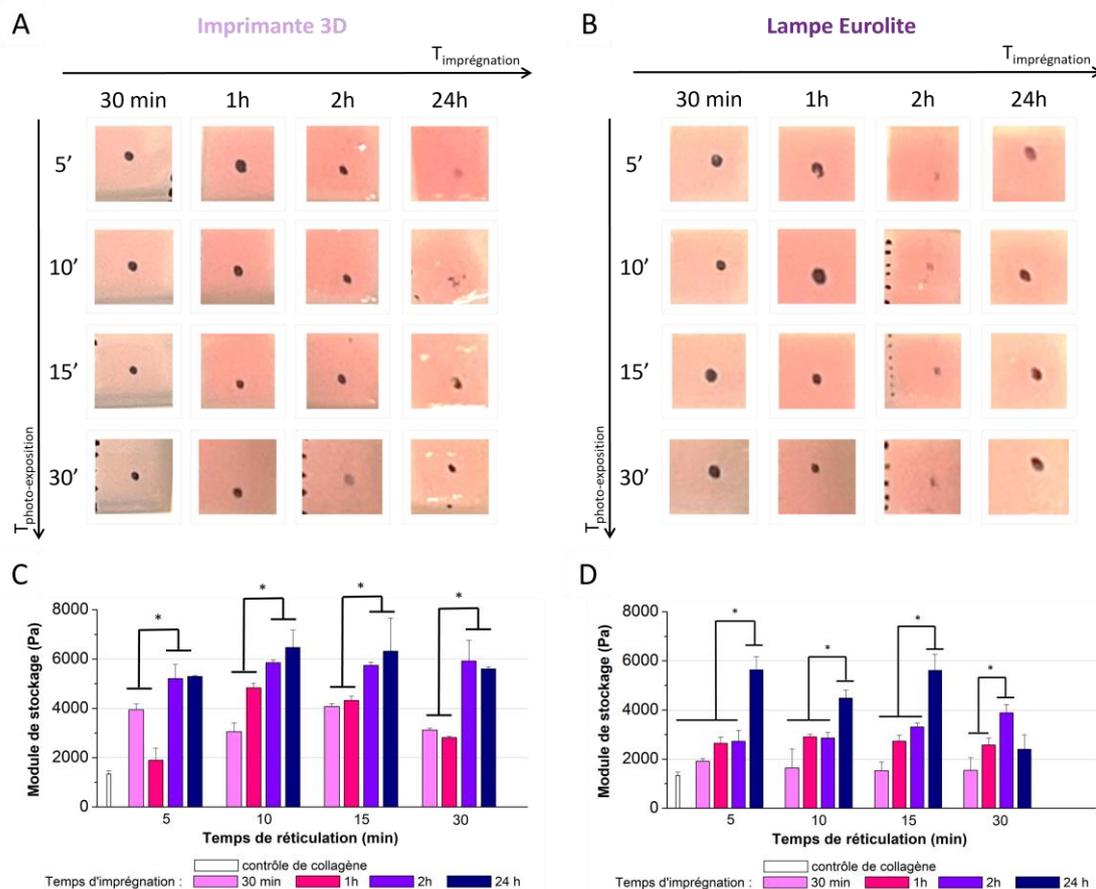


Figure 115 : Observations macroscopiques et propriétés mécaniques des hydrogels réticulés avec (A)(C) le module LED de l'imprimante 3D ou (B) (D) la lampe Eurolite (* : $p < 0,05$ (n = 3)).

Tout d'abord l'efficacité de l'imprégnation a été évaluée macroscopiquement en observant la teinte des hydrogels (Figure 115 (A)(B)). Que les hydrogels aient été réticulés avec le module LED ou la lampe Eurolite, l'imprégnation est la même. Au bout de 30 minutes, les hydrogels sont rose pâle. Au bout d'1, 2 ou 24h d'imprégnation, le rose est plus prononcé et une saturation semble être atteinte puisque l'intensité du rose semble être la même.

Afin de quantifier l'efficacité de la réticulation, le module de stockage a été mesuré pour chaque condition.

Lorsque le module LED de l'imprimante 3D est utilisé (Figure 115 (C)), le module de stockage semble augmenter avec le temps de réticulation. On s'aperçoit également que la saturation semble atteinte au bout de 2h d'imprégnation puisque les deux conditions ont des modules de stockages du même ordre de grandeur. En revanche, après 1h d'imprégnation, le module de stockage est intermédiaire. Il faudrait donc 2h d'imprégnation afin de saturer le réseau fibrillaire de collagène en THA.

Le module de stockage augmente également avec le temps d'exposition à la lumière verte (Figure 115(C)). Au bout de 5 minutes, 87% du module de stockage maximal estimé à 2h d'imprégnation est atteint ; soit un G' égale à 3,88 fois le contrôle de collagène pur. Au bout de 10 et 15 minutes, le module de stockage atteint le plateau avec un hydrogel 4,4 fois plus rigide que celui de collagène. 10 minutes de photoréticulation avec le module LED de l'imprimante 3D semblent donc suffisantes pour réticuler notre système.

Si l'on considère la photoréticulation avec la lampe Eurolite qui était celle utilisée lors de l'étude physico-chimique, les propriétés mécaniques sont légèrement inférieures (Figure 115 (D)). En effet, au bout 2h d'imprégnation, les propriétés rhéologiques n'atteignent pas le plateau observé précédemment. Même après 24h d'imprégnation, le module de stockage reste plus faible que pour le module LED de l'imprimante 3D. Pire encore, lorsqu'une imprégnation de 24h est conduite suivie d'une exposition de 30 minutes, le module de stockage chute de 60% comparé aux hydrogels exposés pendant 15 minutes. L'usage de cette lampe a tendance à fragiliser l'élasticité du réseau. Si elle est plus puissante que l'autre lampe, elle peut s'avérer trop agressive pour notre système en le chauffant excessivement.

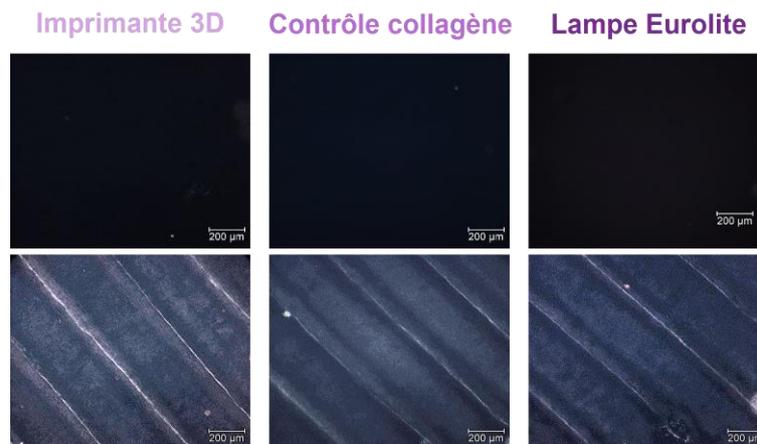


Figure 116 : Observation sous polariseurs croisés de l'alignement du collagène dans les hydrogels réticulés avec le module LED de l'imprimante 3D (gauche), les contrôles de collagène (milieu) et les hydrogels réticulés avec la lampe Eurolite (droite) quels que soient les temps d'imprégnation et de réticulation.

Cette constatation a conforté notre choix d'utiliser le module LED de l'imprimante 3D qui permet à la fois d'avoir un meilleur module de stockage et une meilleure cytocompatibilité.

Parallèlement, nous avons également étudié l'alignement du collagène dans ces hydrogels (Figure 116). Peu importe la source lumineuse utilisée et les paramètres d'imprégnation et de photoréticulation, une extinction est observée aussi bien dans les hydrogels collagène/THA fibrillés et réticulés que dans le contrôle de collagène. La photoréticulation n'a donc pas eu d'impact sur l'arrangement orienté et la biréfringence du collagène.

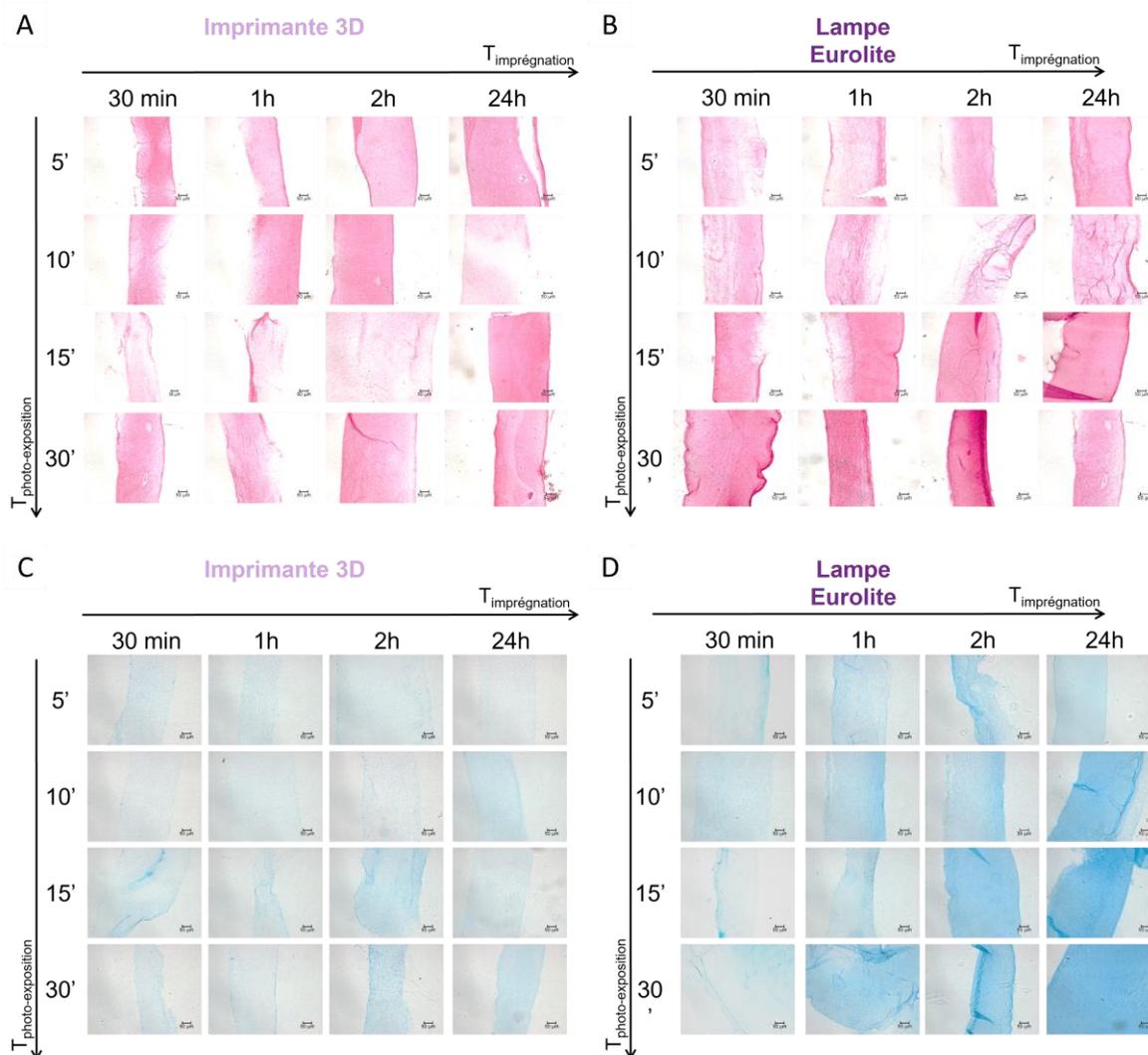


Figure 117 : Coloration du collagène au Picrosirius dans les hydrogels réticulés avec (A) la lampe LED de l'imprimante ou (B) avec la lampe Eurolite et coloration du THA par le Bleu Alcian dans les hydrogels réticulés (C) avec le module LED de l'imprimante 3D ou (D) la lampe Eurolite.

Nous avons tout de même souhaité aller plus loin notamment en observant qualitativement le THA imprégnée pour chaque condition. Cette caractérisation a été conduite après avoir fait des coupes histologiques en marquant la présence de collagène avec du Picrosirius

Red et la présence de THA avec du Bleu Alcian. Les résultats sont qualitatifs et interprétés selon l'intensité observée et l'homogénéité de la coloration sur l'étendue de la coupe.

Tout d'abord, le marquage du collagène au Picrosirius Red représente un contrôle (Figure 117(A)(B)). Quelle que soit la source lumineuse utilisée, les observations confirment bien la présence de collagène pour toutes les conditions, ce qui est logique puisque le THA est imprégné dans un hydrogel pré-fibrillé de collagène. Néanmoins, les résultats ne peuvent pas être quantitatifs car comme observé pour le marquage du collagène qui représente un contrôle, l'intensité peut varier d'une coupe à une autre alors que la quantité de collagène utilisée pour l'impression reste la même. Néanmoins, l'intensité reste du même ordre entre les deux sources lumineuses.

A contrario, le marquage du THA est très différent selon la source lumineuse utilisée.

Avec le module LED de l'imprimante, la coloration bleue est très peu intense pour toutes les conditions. Pour les temps les plus courts de réticulation, le marquage est le plus faible dû à la réticulation incomplète ne permettant pas de gélifier tout le THA dans l'hydrogel. Pour les temps d'imprégnation les plus faibles (30 minutes et 1h), le marquage est également très faible. Ceci est dû à l'imprégnation qui n'est pas à son maximum comme commenté précédemment avec les observations macroscopiques et rhéologiques. Les conditions pour lesquelles la coloration semble plus intense sont les temps d'imprégnation de 2h et de 24h avec des temps de réticulation de 15 ou 30 minutes, ce qui est cohérent avec les modules de stockage mesurés.

Lorsque la lampe Eurolite est utilisée, les marquages sont plus intenses signifiant que plus de THA est réticulé dans le réseau fibrillaire de collagène. Comme pour l'autre source lumineuse, à faible temps d'imprégnation (30 minutes), le marquage est bleu pâle signifiant que peu de THA est présent. Les temps d'imprégnation pour lesquels on observe le plus de THA présents sont également de 2h et 24h. Selon le temps de réticulation, plus ou moins de THA est présent traduisant l'efficacité relative de la photoréticulation permettant de maintenir le THA au sein du réseau sans aucune diffusion à l'extérieur. Le marquage est le plus intense pour les temps de réticulation de 15 minutes et 30 minutes. Ces résultats signifient que l'imprégnation et la réticulation du THA a été conduite de manière efficace avec cette lampe. Néanmoins, nous avons vu précédemment que les modules de stockage mesurés sur ces hydrogels étaient un peu plus faibles que ceux réticulés avec le module LED de l'imprimante. Même si le THA est présent et immobilisé dans le réseau fibrillaire de collagène, cette lampe semble trop puissante pour notre système puisqu'elle altère ces propriétés mécaniques en plus d'être cytotoxique pour les fibroblastes. Ceci est sûrement dû au chauffage de l'hydrogel lors de son irradiation.

Les hydrogels obtenus à l'issue de ce protocole ont été observés au MEB avec la même structure composée de filaments ordonnés (Figure 118). Leur ultrastructure a été visualisée à un grossissement de x20k. Le réseau fibrillaire semble défini et typique de réseau de collagène pur au sein des filaments.

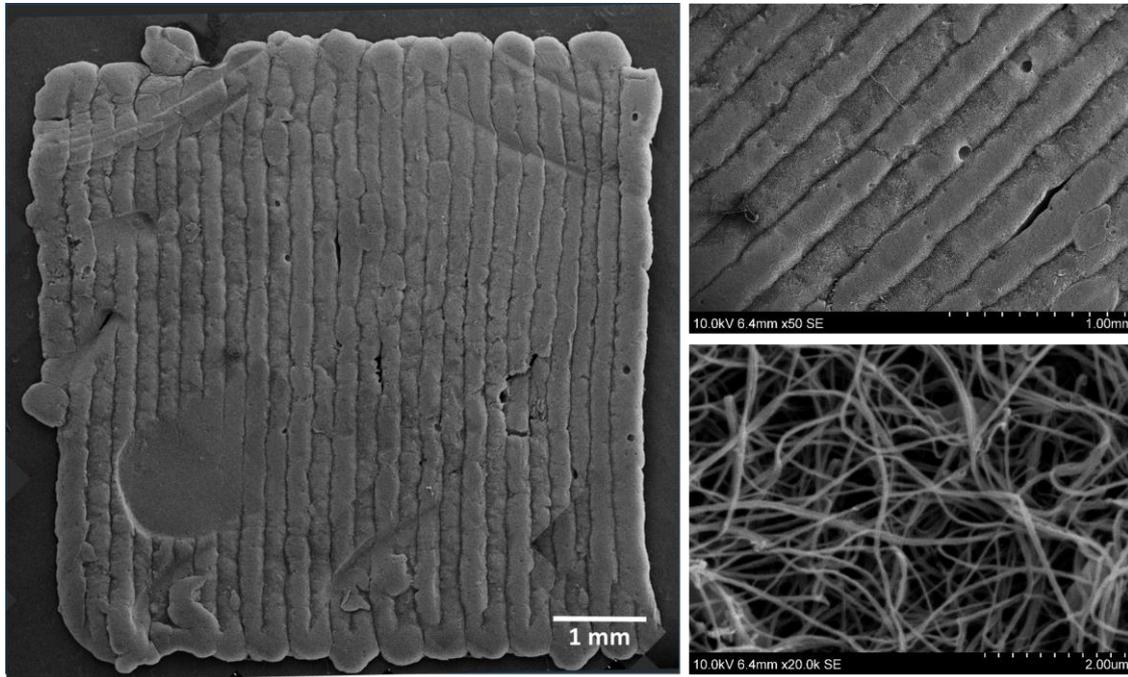


Figure 118 : Observation au MEB des hydrogels collagène/THA imprimés et réticulés (x50) et de leur ultrastructure (x20k).

Compte tenu de tous ces résultats, nous avons affiner le protocole d'imprégnation comme s'en suit. Après avoir fibrillé le collagène *in situ* de l'impression 3D dans le bain de PBS 2X/NaOH 10^{-3} M pendant 30 minutes, une solution visqueuse de THA à 3% en masse en présence de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$ d'éosine est mise en contact de l'hydrogel. L'imprégnation est conduite sur 2h suivie d'un rinçage rapide de l'excédent puis de 15 minutes d'exposition au module LED de l'imprimante 3D afin de photoréticuler et figer le THA dans le réseau fibrillaire de collagène.

3. Protocole standard

Le protocole standard repose sur l'utilisation de l'encre dense collagène/THA formulée précédemment en présence de NaCl. Ici, aucun temps d'imprégnation n'est nécessaire. Cependant, un facteur reste à évaluer : l'incorporation de l'éosine. En effet, nous avons voulu étudier l'impact de son ajout dans l'encre ou extérieur à l'encre.

Pour cela, nous avons imprimé des hydrogels selon 6 conditions d'incorporation de l'éosine afin d'optimiser la photoréticulation de cette encre. A l'image du protocole d'imprégnation, l'éosine a soit été mise en contact de l'hydrogel via un bain soit été ajouté directement dans l'encre. Des bains d'éosine de 30 minutes, 1h, 2h ou 24h ont été conduits afin d'être consistants avec les bains utilisés lors de l'optimisation du protocole d'imprégnation. Lorsque l'éosine a été directement ajoutée à l'encre, soit la réticulation a été faite directement post-impression soit elle a été effectuée après 1h de fibrillogénèse dans le bain de PBS 2X/NaOH 10^{-3} M. La photoréticulation a été ensuite réalisée avec le module LED de l'imprimante 3D fixé à 10 cm de haut du support d'impression pendant 15 minutes.

Les filaments imprimés (grossissement x50) et le réseau fibrillaire (grossissement x20k) ont été observés au MEB et aucune différence n'a été observée (Figure 119(A)). Le réseau fibrillaire des hydrogels collagène/THA imprimés est aussi homogène et défini que celui des contrôles de collagène.

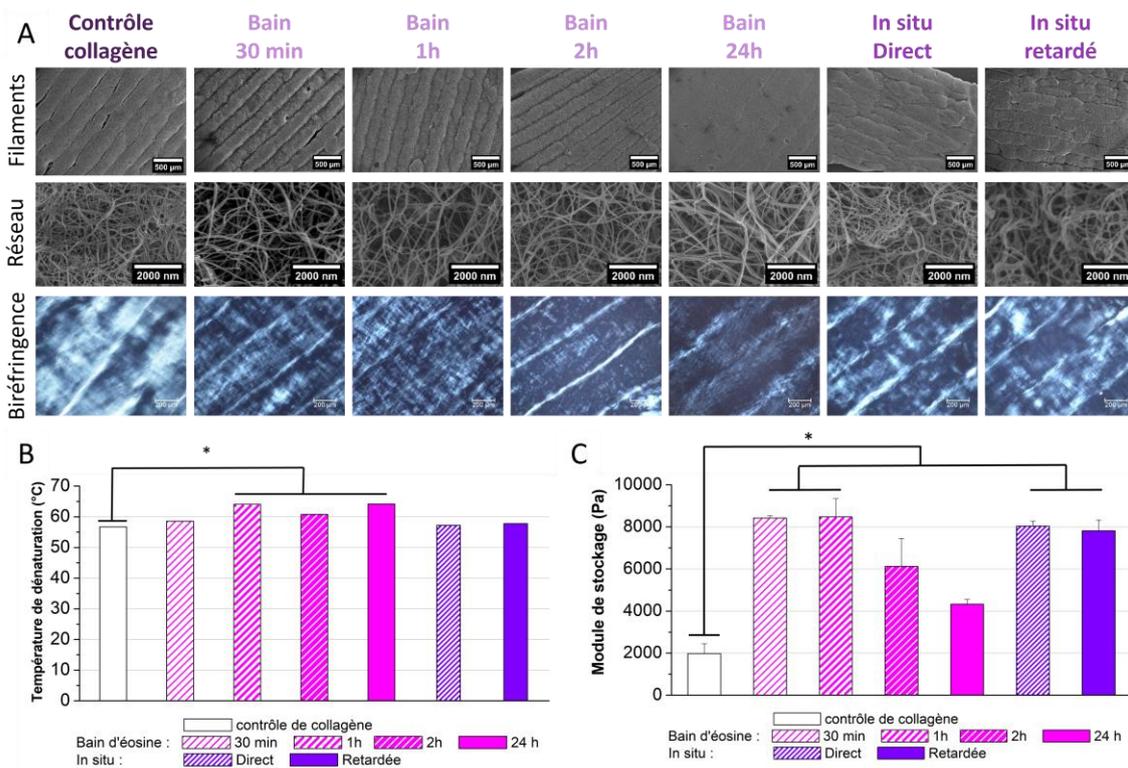


Figure 119: (A) Impact du mode de photoréticulation utilisé sur les filaments imprimés, le réseau fibrillaire du collagène et la biréfringence et impact du mode de photoréticulation sur (B) la température de dénaturation du collagène et (C) sur le module de stockage des hydrogels générés selon chaque procédure d'ajout d'éosine (* : $p < 0,05$ ($n = 3$)).

La biréfringence du collagène est observée pour chaque condition. Elle semble néanmoins moins intense et homogène pour les hydrogels collagène/THA que pour le contrôle de collagène. Ceci signifie que la présence de THA et d'éosine semble perturber légèrement l'alignement des

fibrilles de collagène (Figure 119(A)). Ceci est consistant avec les résultats de la partie physico chimique (Partie 3, Chapitre 2).

Du point de vue de la stabilité thermique, la photoréticulation semble plus efficace après imprégnation dans un bain d'éosine puisque la température de dénaturation augmente de quelques degrés lors de ces bains pour être supérieur à 60°C (Figure 119(B)). Néanmoins, lorsque l'éosine est ajoutée directement dans l'encre, la température de dénaturation reste similaire à celle du contrôle de collagène. La photoréticulation, qu'elle soit directe ou retardée, semble être moins efficace dans ces conditions car le collagène n'est pas stabilisé par la réticulation du THA.

Nous avons corrélé cette information avec la caractérisation de l'élasticité du réseau via la mesure du module de stockage (Figure 119(C)). Le contrôle de collagène non exposé à la réticulation possède un module de stockage d'environ 2 kPa.

Lorsque des bains d'éosine sont effectués suivi de la photoréticulation pendant 15 minutes, le module de stockage est très dépendant du temps d'imprégnation de l'éosine. En effet, plus le temps d'imprégnation est long, plus le module de stockage semble diminuer. Au bout de 30 minutes et de 1h d'imprégnation le module de stockage est de 8 kPa, soit 4 fois celui du contrôle de collagène. Dès lors qu'on passe à 2h d'imprégnation celui-ci diminue jusqu'à atteindre un module de 6 kPa. En augmentant le temps d'imprégnation à sa valeur maximale, 24h, il diminue encore plus puisqu'il ne vaut plus que 4 kPa. Ceci signifie qu'il y a bien eu renforcement mécanique du réseau mais celui-ci est beaucoup moins important que pour de faibles temps d'imprégnation. Cette diminution du module de stockage avec l'augmentation du temps d'imprégnation nous semble directement lié à la présence du bain d'éosine dont la viscosité est faible. L'hypothèse d'une mauvaise répartition de l'éosine est impossible puisque la diffusion a tendance à être renforcée à temps longs et non pas à temps courts. Néanmoins, comme observé précédemment lors de l'étude physicochimique, le THA étant libre dans le réseau de collagène en formation, il est possible que celui-ci soit dilué dans le bain ce qui conduirait à une quantité diminuée de THA. S'il y a moins de THA dans le réseau fibrillaire, la densité de réticulation est moins importante abaissant les propriétés d'élasticité en plus de déstabiliser le ratio 4 :1 commun au tissu natif. Lors des temps courts d'imprégnation (30min et 1h), le THA ne semble pas avoir le temps de diffuser hors du réseau ce qui permet de maintenir le ratio 4 :1 et donc la densité de réticulation maximale tout comme pour les réticulation *in situ*.

Lorsque l'éosine est ajoutée directement à l'encre et que la photoréticulation est amorcée de manière directe ou retardée d'une heure, les résultats sont identiques. Le module de stockage atteint son maximum, c'est-à-dire 8 kPa, ce qui est 4 fois plus élevé que le module de stockage du contrôle de collagène. La photoréticulation semble donc avoir été efficace puisque le réseau est renforcé. Le fait que le module ne varie pas selon si l'exposition est faite directement ou différée

est positive car cela signifie que l'éosine et/ou le THA n'ont pas le temps de se dissiper du réseau de collagène préformé.

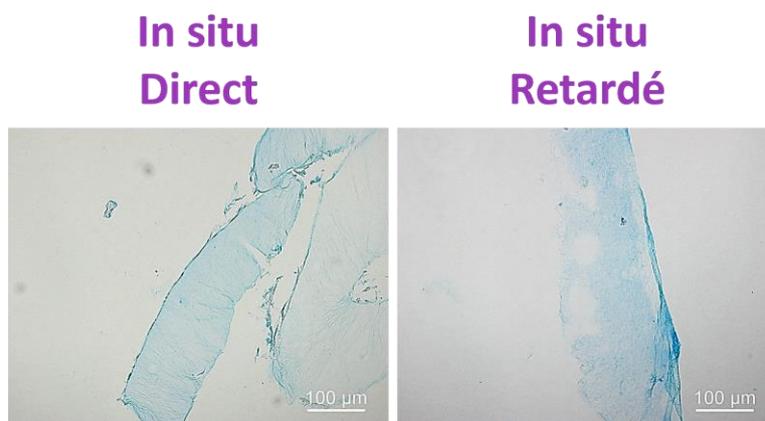


Figure 120 : Marquage du THA à l'Alcian Blue pour les hydrogels avec l'éosine dans l'encre et une réticulation soit directe soit retardée observé au microscope optique (x40).

Afin de s'en assurer, les hydrogels formés avec l'éosine présente dans l'encre ont été marqués au bleu alcian pour s'assurer de la présence de THA dans les hydrogels post-réticulation. Comme observé en Figure 120, les deux types d'hydrogels présentent une coloration bleue. Cela signifie que du THA est bien présent dans les deux conditions. De plus, la coloration est de même intensité selon que la photoréticulation a été conduite directement ou si elle a été retardée d'une heure, montrant que le THA n'a pas été dissipé dans ce laps de temps. L'efficacité des deux modes de photoréticulation in-situ semble similaire et non altérée par le temps attendu entre début de fibrillogénèse du collagène post impression et photoréticulation du THA.

Finalement, nous avons choisi de poursuivre l'impression de l'encre dense collagène/THA avec l'ajout d'éosine directement dans l'encre a une concentration finale de $0,1 \text{ mg.mL}^{-1}$. Afin d'avoir un procédé d'élaboration le plus rapide possible tout en étant efficace, la réticulation est effectuée in-situ directement après l'impression de l'hydrogel. Ceci permet de diminuer les temps d'exposition des cellules aux facteurs stressants tels que le bain de fibrillation et la présence de radicaux générés lors l'exposition à la lumière verte. Ainsi, une couche d'hydrogel est formée en 30 minutes maximum ce qui est bien inférieur aux 2h nécessaires afin de commencer à être cytotoxique pour les fibroblastes.

A l'issue de cette procédure, nous avons un protocole permettant de générer un hydrogel collagène/THA présentant un réseau fibrillaire homogène, un alignement des fibrilles de collagène, une température de dénaturation proche de 53°C ainsi que de bonnes performances mécaniques. Enfin, le THA a bien été immobilisé dans le réseau puisqu'il a été observé par marquage au bleu alcian.

Chapitre 2 : Cellularisation des matrices lamellaires anisotropes

L'Annulus Fibrosus est un tissu composé de lamelles fibreuses orientées à plus ou moins 30° par rapport à la verticale. Les cellules y sont confinées entre deux lamelles adjacentes. C'est pourquoi nous avons choisi de développer un modèle mimant cette organisation confinée. La culture tridimensionnelle a été effectuée sur seulement 2 couches mais si les résultats sont positifs, l'impression d'un construit 3D comportant 15-20 lamelles ne serait pas dur à produire puisqu'il s'agirait de suivre le même procédé. Seule l'épaisseur de l'hydrogel varierait. Deux stratégies peuvent être adoptées dans cette étude. La première repose sur l'impression de deux couches l'une sur l'autre puis de cellulariser le tout en injectant les cellules au cœur de l'hydrogel à l'instar de (Nesti et al., 2008). Néanmoins, le dépôt de cellules est non contrôlé puisqu'elles peuvent se localiser dans l'intercouche ou dans tout le réseau. La deuxième solution est d'imprimer une première couche sur laquelle onensemencerait des fibroblastes, suivi de l'impression d'une seconde couche sur les cellules pour les confiner. C'est cette dernière stratégie que nous avons privilégié pour avoir un meilleur contrôle de la localisation du dépôt cellulaire.

Pour cela, nous avons procédé en deux temps : La première étape a été d'optimiser le dépôt de cellules sur la première couche. Pour cela, le volume déposé, la concentration de cellules mais aussi la méthode de dépôt et le temps de culture avant l'impression de la deuxième couche ont été analysés.

Dans un second temps, un sandwich a été généré afin d'étudier le comportement cellulaire en situation confinée.

I. Dépôt de cellules à la surface de la lamelle d'hydrogel

1. Optimisation des paramètres de dépôt

Au sein de l'AF, les cellules sont présentes entre les lamelles à une densité de 9×10^6 cellules/cm³ (Pattappa et al., 2012). Afin de mimer au mieux le tissu natif, nous avons souhaité nous rapprocher le plus possible de cette concentration sans pour autant avoir un tapis cellulaire afin de pouvoir étudier aisément la morphologie des cellules.

Pour cette expérience, nous avons utilisé l'étude de Chen et collaborateurs (Chen et al., 2014) qui ont étudié le comportement cellulaire de fibroblastes sur une éponge de collagène et d'acide hyaluronique. Ainsi, ils ont déposé des cellules à la surface de leurs éponges préparées par

lyophilisation. Pour ce faire, ils ont préparé une suspension cellulaire de fibroblastes à une concentration de 5×10^6 cellules.mL⁻¹ dans du milieu de culture complet et ont déposé 200 µL sur un disque de 12 mm de diamètre. Nous nous sommes inspirés de ce protocole de dépôt afin d'optimiser les paramètres à notre système.

Quatre dépôts cellulaires différents ont été effectués comportant 50 000, 100 000, 500 000 ou 1 000 000 de cellules par hydrogel. Pour cela, des suspensions cellulaires 5 fois plus concentrées ont été préparées et 200 µL de chacune des ces suspensions ont été déposés sur la couche d'hydrogel imprimée. Un problème a rapidement été détecté : lorsque 200 µL sont déposés, cela recouvre totalement l'hydrogel tel un bain. Cela signifie que les cellules ne sont pas uniquement présentes au-dessus de la couche mais aussi à l'extérieur, dans tout le puits de la plaque de culture. Nous avons donc réadapté le protocole afin que les cellules ne soient déposées qu'au-dessus de l'hydrogel selon un procédé de gouttes à la surface. Au lieu d'ajouter 200µL de la suspension cellulaire, celle-ci a été concentrée 10 fois plus que précédemment afin de ne déposer que 20 µL. En effet, 20µL équivaut à une goutte permettant de recouvrir la surface de l'hydrogel sans couler de part et d'autre de celui-ci. Une fois la suspension cellulaire correspondant à chaque concentration cellulaire déposée, les hydrogels cellularisés ont été incubés pendant 30 minutes afin d'absorber le milieu et permettre aux cellules d'adhérer à l'hydrogel. Après contrôle de leur adhérence grâce au microscope inversé, du milieu de culture complet a été ajouté lentement le long des parois du puits afin de perturber le moins possible le dépôt cellulaire jusqu'à recouvrir entièrement l'hydrogel.

Après 24h d'incubation, la morphologie, le pourcentage de recouvrement cellulaire ainsi que la densité cellulaire réelle ont été étudiés (Figure 121).

L'augmentation du nombre de cellules déposées a naturellement une influence sur le taux de recouvrement de l'hydrogel ainsi que sur la densité cellulaire.

En calculant la densité cellulaire réelle à l'aide du logiciel Fiji, nous nous sommes aperçus qu'il y avait un écart entre la densité théorique et la densité réelle (Figure 121(C)). Ceci est dû au fait qu'une partie des cellules n'ont pas adhéré malgré l'attente des 30 minutes avant ajout de milieu. En effet, il faut environ 10h aux fibroblastes pour qu'ils adhèrent complètement. Néanmoins, les cellules restantes sur l'hydrogel ont bien adhéré après 24 h et adoptent une morphologie allongée typique des fibroblastes (Figure 121(A)).

Alors qu'avec 50 000 cellules déposées, seul 20% du gel sont recouverts, avec 1 000 000 de cellules, la surface est recouverte à presque 80% (Figure 121(B)). La valeur de 80% de recouvrement est une valeur seuil à laquelle les cellules sont à confluence. Ici, la confluence est atteinte à partir de 500 000 cellules déposées.

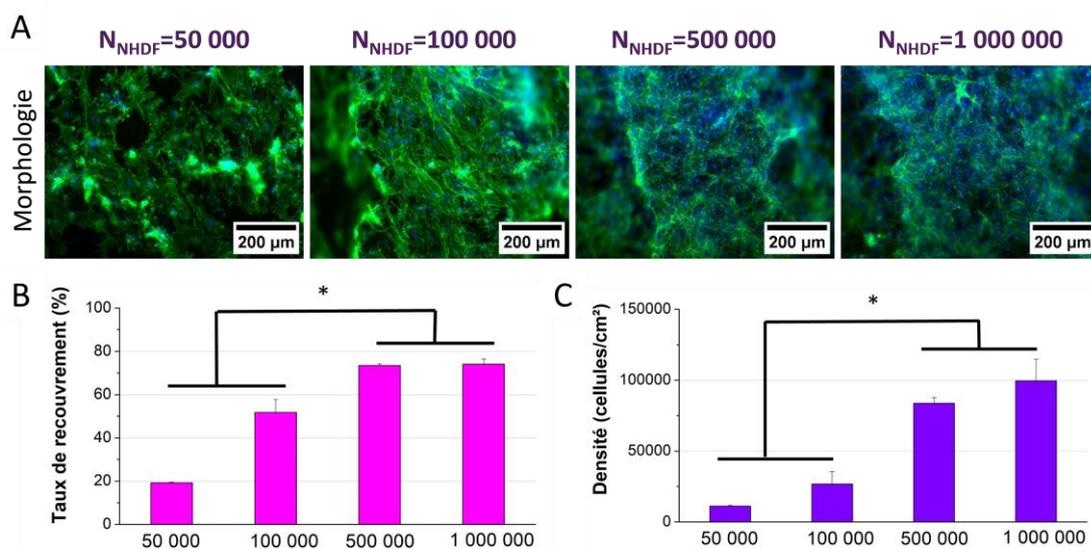


Figure 121 : (A) Morphologie des fibroblastes, (B) Taux de recouvrement cellulaire et (C) Densité cellulaire réelle calculés sur FIJI selon la quantité de cellules déposées après 1 jours de culture (* : $p < 0,05$ ($n = 3$)).

Lors de l'étude, nous souhaitons analyser la prolifération, la morphologie ainsi que la migration des fibroblastes ensemencés sur des lamelles d'hydrogels. Ainsi, il est nécessaire de travailler avec une concentration hors confluence. En effet, l'étude étant menée sur 21 jours, commencer à confluence ne nous permettrait pas d'étudier la prolifération cellulaire.

C'est pourquoi suite à ces résultats, nous avons décidé de poursuivre avec la condition où 100 000 cellules sont déposées à la surface des hydrogels puisqu'à cette concentration, le taux de recouvrement est de 50%.

2. Génération de lamelles d'hydrogels cellularisées

Une fois la concentration cellulaire optimale et les paramètres d'impression 3D de chaque encre définis, nous avons pu générer des lamelles d'hydrogel cellularisées avec des fibroblastes. La prolifération cellulaire, la morphologie et la migration ont été étudiés sur 21 jours de culture. Cette étude a été réalisée avec des matériaux produits selon le protocole standard ou celui d'imprégnation. Les hydrogels de collagène purs de collagène ont été utilisés comme contrôle car leur cytocompatibilité a été démontrée depuis longtemps. Cette étude sur une couche a servi à évaluer la cytocompatibilité de nos deux types de protocoles avant même de générer un modèle confiné double couche.

Les hydrogels collagène/THA élaborés selon le protocole standard nous ont semblé, à première vue, être plus adapté aux cellules que ceux produits avec le protocole d'imprégnation. En effet, lorsque l'imprégnation est faite, l'hydrogel semble lubrifié en surface en raison de l'excès

de THA et d'éosine qui a été introduit puis qui a gonflé au travers de la photo réticulation. La surface semble alors couverte de THA. Le THA étant un moins bon support cellulaire que le collagène, ceci nous mène à penser que les résultats sur 21 jours pourraient être affectés.

Lorsque le protocole standard est utilisé pour générer les hydrogels collagène/THA, cette couche de lubrification en surface n'est pas observée et aucun surplus de gonflement n'est observé. Ceci nous mène à penser que le collagène reste donc majoritaire en surface des filaments. Le dépôt à la surface se caractérise par le fait que les cellules sont en contact avec la surface des filaments et par conséquent ici avec le collagène qui est bioactif. Nous pensons donc que le protocole standard pourrait être plus avantageux en termes de bioactivité des hydrogels.

Quatre facteurs sont primordiaux pour évaluer la bioactivité de nos monocouches d'hydrogels imprimées que nous classons en trois catégories :

- La prolifération cellulaire qui prend en compte le nombre de cellules présentes dans l'hydrogel et leur taux de recouvrement de la surface du matériau.
- La morphologie et l'orientation cellulaire qui peuvent être évaluées en observant les hydrogels cellularisés par microscopie à fluorescence en marquant le noyau au DAPI et le cytosquelette d'actine à la phalloïdine. Cette morphologie est témoin de la force d'adhérence entre les cellules et leur support.
- La migration cellulaire au travers de la couche qui peut être évaluée en effectuant des coupes histologiques marquées au DAPI pour observer les noyaux au microscope à fluorescence. La migration n'est évaluée qu'après 15 jours de culture, temps nécessaire aux cellules pour commencer une migration dans un hydrogel de collagène dense (Helary et al., 2005).

2.1. Prolifération cellulaire

La prolifération cellulaire a été suivie sur 21 jours de culture. Elle a été évaluée dans un premier temps via des tests d'Alamar Blue en quantifiant l'activité métabolique à différents temps de culture : Jours 1, 3, 7, 14 et 21 (Figure 122(A)). Ces essais ont été conduits en parallèle sur les trois types de monocouches : celles de collagène, celles faites de collagène/THA élaborées avec le protocole standard et celles faites avec le protocole d'imprégnation.

Au jour 1, l'activité métabolique est identique dans les hydrogels de collagène et les hydrogels produits par le protocole standard. Le pourcentage de réduction de la résazurine est évalué entre 35 et 40% (Figure 122(A)). Pour les hydrogels collagène/THA préparés par

impregnation, le pourcentage de réduction est légèrement inférieur puisqu'il est d'un peu moins de 30%.

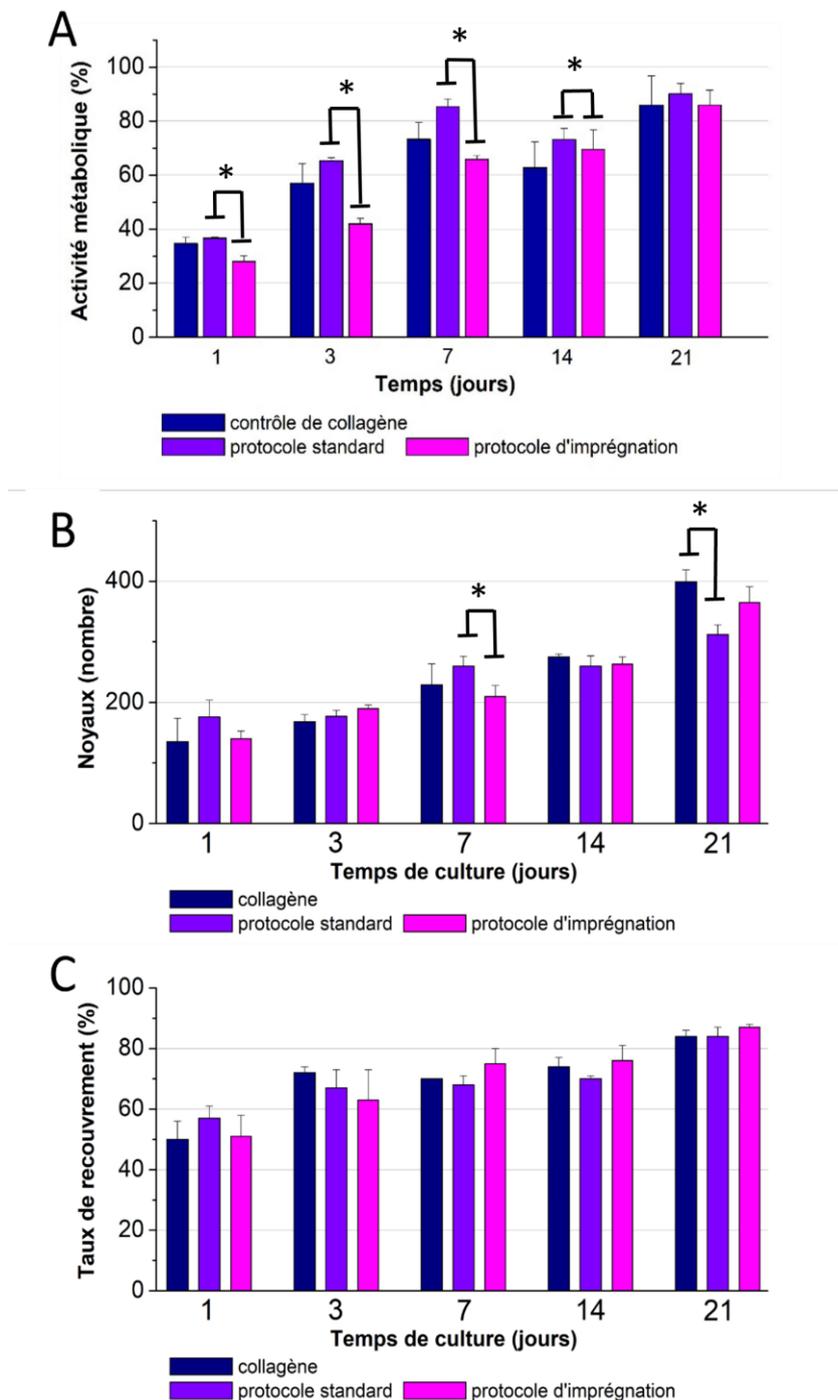


Figure 122 : Evaluation de la prolifération cellulaire sur 21 jours via la quantification (A) de l'activité métabolique par des tests Alamar Blue, (B) du nombre de noyaux observés pour une même surface observée, (C) du taux de recouvrement de l'hydrogel par les fibroblastes pour une même surface observée (* : $p < 0,05$ ($n = 3$)).

L'activité métabolique augmente graduellement jusqu'au jour 7 pour toutes les conditions. L'activité métabolique sur les 7 premiers jours est tout de même plus faible dans le cas

du protocole d'imprégnation. Au jour 14, l'activité métabolique atteint un plateau de 80% de réduction de la résazurine pour les trois types de matériaux. Les cellules semblent donc à confluence à partir du 7^{ème} jour de culture. Les trois groupes ont pratiquement le même comportement métabolique sur 21 jours ce qui ne permet pas de les différencier à ce stade.

Pour confirmer ces résultats, les noyaux et le taux de recouvrement cellulaire ont été évalués. De la même manière que l'activité métabolique a augmenté sur les 21 jours, le nombre de noyaux observé a également augmenté (Figure 122(B)). Cette augmentation semble linéaire pendant les 21 jours quelle que soit la condition considérée. L'augmentation des noyaux confrontée au plateau d'activité métabolique à partir du 7^{ème} jour laisserait présager que les cellules sont plus « dormantes », c'est-à-dire qu'elles sont plus nombreuses mais moins actives dû à l'inhibition de contact liée à la confluence. Le nombre de cellules reste sensiblement le même entre les trois groupes ne démontrant pas de différences de bioactivité.

La confluence est le phénomène pour lequel le plateau de prolifération est atteint et les cellules sont en contact les unes avec les autres. Pour pouvoir évaluer si elle est atteinte ou non et quand de manière précise, le taux de recouvrement cellulaire a été quantifié sur les 21 jours (Figure 122(C)).

Au jour 1, 50% de la surface des hydrogels sont recouverts par les cellules. Pour rappel, la confluence est observée lorsque les cellules sont directement en contact ce qui équivaut à environ 80% de la surface recouverte (Chiu et al., 2020). Ce pourcentage élevé de recouvrement initial montre l'adhérence des cellules.

Le taux de recouvrement ne cesse d'augmenter au cours des 7 premiers jours de culture pour les trois types de matériaux. Ceci permet de démontrer que les cellules ont bien adhéré dans le temps en s'allongeant. La prolifération démontrée précédemment joue également un rôle puisque plus les cellules sont nombreuses plus la surface de l'hydrogel est recouverte.

Entre le 1^{er} jour et le 7^{ème} jour de culture, le taux de recouvrement cellulaire augmente en passant de 50, 51 et 58 % respectivement pour les hydrogels contrôles, le protocole standard et le protocole d'imprégnation à 70, 65 et 62 % de recouvrement. Ceci représente une multiplication du taux de recouvrement par 1,4 pour les contrôles de collagène, 1,27 pour le protocole standard et 1,06 pour le protocole d'imprégnation. Les trois types d'hydrogels semblent avoir, une fois de plus, le même comportement. Sur les 21 jours de culture, le comportement reste le même pour toutes les conditions avec un plateau de recouvrement à 80 % atteint entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour. Les cellules atteignent donc la confluence au 7^{ème} jour quel que soit le matériau utilisé. Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec précaution en raison des différences de dépôt cellulaire pouvant être engendré au 1^{er} jour. En effet, un très petit volume d'une suspension

cellulaire très concentrée étant déposé, il se peut que les cellules ne soient pas réparties de manière homogène sur toute la surface comme l'atteste les barres d'erreur plus ou moins importantes présentes lors de la détermination des noyaux. Deux facteurs jouent : le fait que la goutte soit déposée au centre de l'hydrogel mais également le fait qu'à forte concentration cellulaire, des amas peuvent être présents même après resuspension.

L'une des solutions à ce problème serait de déposer un volume plus grand ayant une plus faible concentration en cellules puis de changer l'hydrogel de plaque afin de ne pas prendre en compte les cellules déposées dans le reste du puits. Néanmoins, cela voudrait dire que des cellules pourraient diffuser de tous les côtés de l'hydrogel et non plus juste au-dessus de celui-ci. De plus, les monocouches ne mesurant que 330 μm , il est difficile de les déplacer sans en altérer le matériau ou le dépôt cellulaire.

A l'issue des 21 jours de culture, l'activité métabolique a presque triplé pour atteindre un plateau synonyme de prolifération durant cette période. Le nombre de cellules pour une même surface a été multiplié par 4 sur 21 jours. De plus, la confluence semble atteinte au 7^{ème} jour de culture. A ce stade, les trois types de matériaux démontrant la même prolifération cellulaire, il est impossible de les discriminer.

2.2. Adhérence, morphologie et orientation des cellules

Les fibroblastes sont des cellules adhérentes allongées sous forme de fuseaux. Afin de contrôler l'adhérence et la morphologie de celle-ci, les monocouches cellularisées ont été fixées puis marquées au DAPI pour le noyau et à la phalloïdine pour le cytosquelette d'actine (Figure 123(A)). Le noyau est détectable par une fluorescence bleue et les filaments d'actine sont représentés par une fluorescence verte.

Que ce soit le contrôle de collagène, le protocole standard ou bien le protocole d'imprégnation, les cellules ont toutes adhéré aux matériaux après 24h de culture. En effet, au 1^{er} jour, les cellules ont une forme allongée qui n'est pas encore totalement en forme de fuseau pour certaines mais elles ont bien adhéré et se sont étalées. L'orientation des cellules sur les supports semblent perturbée même si pour les hydrogels collagène/THA un alignement semble se dessiner quel que soit le protocole d'élaboration utilisé. L'adhérence des cellules n'a jamais été perturbée tout le long des 21 jours (Figure 123).

A partir du 7^{ème} jour, les cellules sont en forme de fuseaux bien allongés typiques des fibroblastes et alignées le long des filaments imprimés. Ce phénomène selon lequel l'anisotropie

guide l'orientation des cellules qui la ressent est déjà bien décrit dans la littérature (Anselme et al., 2018; Anselme and Bigerelle, 2011; Caliarì and Harley, 2011; Ponsonnet et al., 2002). A mesure que les jours passent, les cellules deviennent de plus en plus nombreuses et alignées dans la même direction (Figure 123)

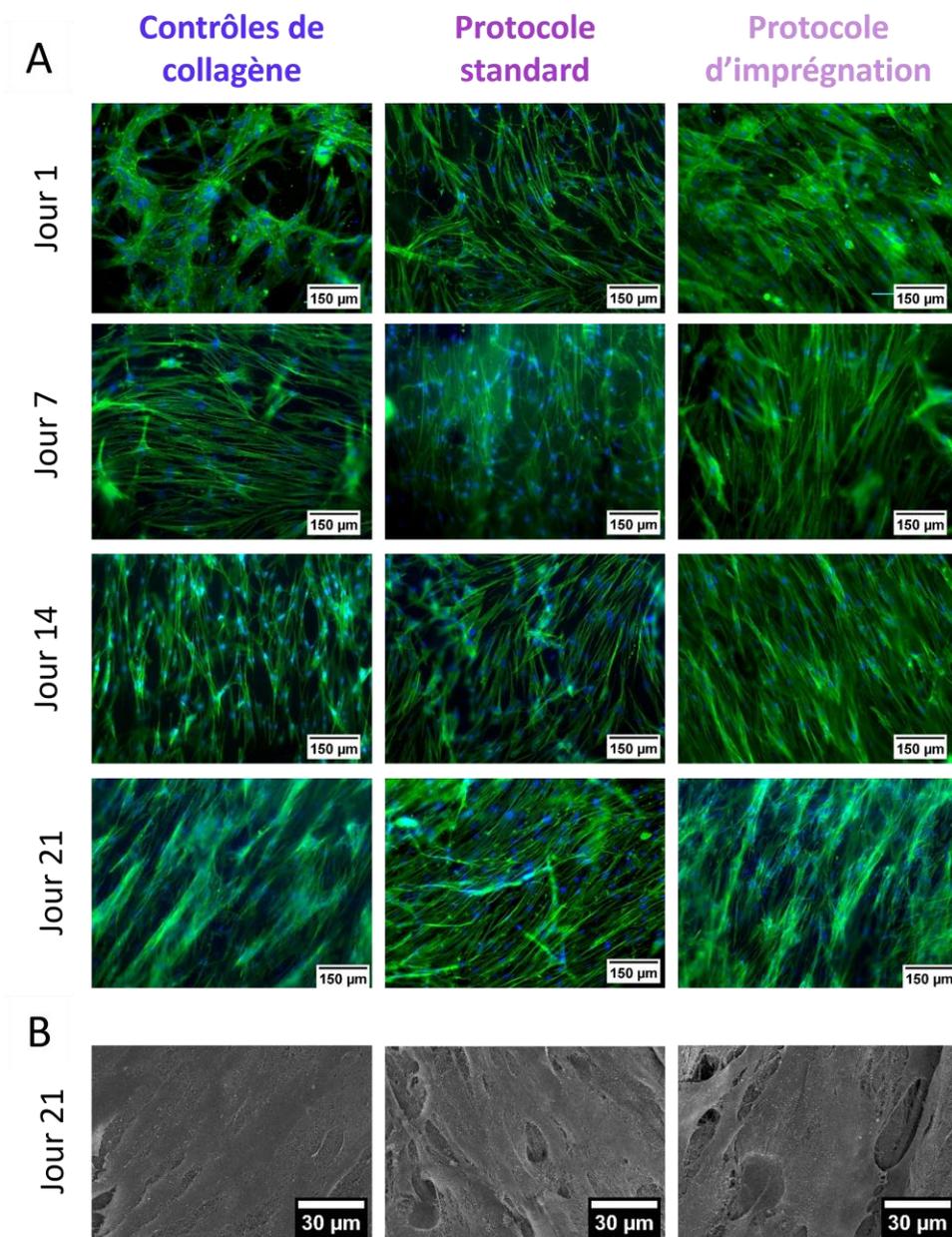


Figure 123 : Observation de l'adhérence, de la morphologie et de l'alignement des cellules (A) au microscope à fluorescence (x10) pendant 21 jours et (B) au MEB au 21e jour (x1k) sur les monocouches de collagène ou de collagène / THA par méthode standard ou par imprégnation.

Durant la culture cellulaire, le nombre de cellules augmente et celles-ci s'alignent. Ceci est favorisé par la confluence cellulaire. En effet, plus les cellules sont nombreuses et au contact les unes des autres, plus elles s'agencent dans une conformation qui leur est favorable c'est-à-dire bien allongées et dans la même direction.

De manière générale, nous avons démontré que nos trois types de matériaux permettaient de maintenir la morphologie allongée et en fuseau des fibroblastes pendant 21 jours de culture. L'adhérence cellulaire a été observée sur toute la durée de l'étude et l'anisotropie de nos matériaux ont permis de guider les cellules qui se sont alignées le long des filaments.

L'observation au MEB des matériaux cellularisés au jour 21 nous a permis de valider d'une autre manière la morphologie allongée en fuseau des fibroblastes (Figure 123(B)). De plus, les cellules y sont bien plus nombreuses qu'au jour 1 et sont visiblement à confluence. L'orientation dans une direction préférentielle de ces cellules est clairement identifiable bien qu'on ne visualise pas les filaments imprimés pour statuer de leur rapport d'orientation. Par ailleurs, des sortes de réseaux fibrillaires semblent faire la jonction entre les cellules sans pour autant montrer de texturation de surface comme c'est le cas pour les filaments imprimés. Nous pensons qu'il s'agit de MEC sécrétées par les cellules pendant les 21 jours de culture et permettant d'intégrer encore plus les cellules aux biomatériaux.

2.3. Migration cellulaire

Le dernier facteur que nous avons évalué était la migration cellulaire dans les lamelles d'hydrogels produites. Le modèle que nous souhaitons développer repose sur la même organisation cellulaire que le tissu natif. A l'image des cellules confinées entre deux lamelles adjacentes dans l'AF, nous souhaitons confiner les fibroblastes entre deux couches d'hydrogel collagène/THA imprimé. S'il y a migration des cellules dans la monocouche, le modèle serait moins représentatif de l'AF *in vivo* puisque les cellules ne se trouvent pas à l'intérieur des lamelles mais seulement entre celles-ci.

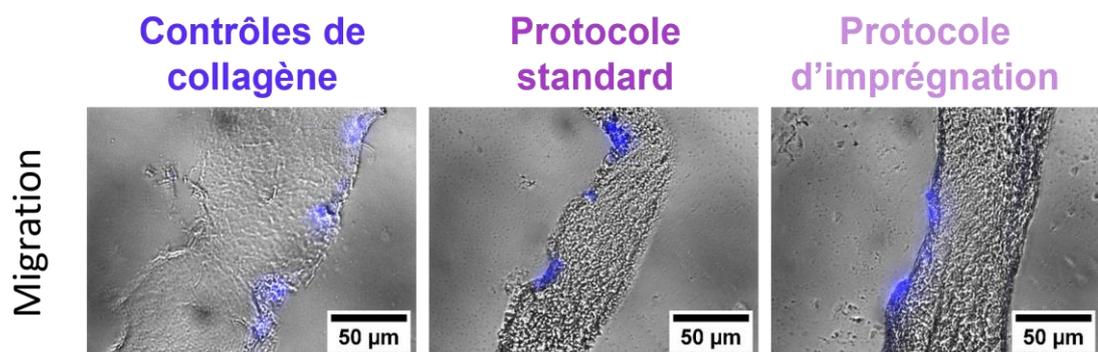


Figure 124 : Evaluation de la migration cellulaire dans les monocouches de collagène ou de collagène/THA après 21 jours de culture des fibroblastes à la surface.

La migration cellulaire des fibroblastes dans les hydrogels de collagène se fait par digestion du réseau de collagène par des enzymes, les métalloprotéases, qui leur permet de pénétrer dans le

réseau fibrillaire (Helary et al., 2005). Cette migration n'est normalement visible qu'après 14 jour de culture dans des hydrogels de collagène dense (Helary et al., 2005). C'est pourquoi, dans notre cas, la migration a été étudiée après 21 jours de culture par marquage des noyaux cellulaires au DAPI sur des coupes histologiques transversales (Figure 124).

Ici, les noyaux, représentés en bleu, semblent être localisé seulement d'un côté des coupes peu importe le type de matériau considéré. Le fait qu'aucun noyau ne soit observé dans une des monocouches après 21 jours de culture montre qu'il n'y a pas eu de migration cellulaire.

2.4. Conclusion

En conclusion, les deux encres formulées nous ont permis d'obtenir des hydrogels de collagène et d'acide hyaluronique anisotropes par impression 3D. Ces lamelles d'hydrogels ont été cellularisées avec des fibroblastes via un dépôt à la surface et mises en culture pendant 21 jours pour étudier leur cytocompatibilité et bioactivité (pour le protocole standard et par imprégnation).

L'activité métabolique mesurée sur 21 jours augmente au cours du temps montrant que les cellules prolifèrent à la surface des lamelles. La confluence semble atteinte dès le 14^{ème} jour de culture pour les trois types de matériaux. Les deux matériaux collagène/THA semblent permettre une bonne adhérence des fibroblastes et une bonne prolifération cellulaire car le comportement des fibroblastes cultivés sur ces matériaux est semblable au contrôle positif (hydrogels de collagène pur).

L'orientation cellulaire a été observée par microscopie sur les 21 jours de culture. Après le premier jour, l'alignement commence à être visible sur les gels collagène/THA car les cellules s'allongent le long du filament, ce qui n'est pas le cas pour les hydrogels de collagène pur. Ainsi les cellules semblent mieux « sentir » l'anisotropie sur ces hydrogels. Après le 7^e jour, on n'observe plus de différence avec les hydrogels de collagène pur.

Enfin, alors que les fibroblastes peuvent migrer après 14 jours de culture dans des hydrogels de collagène denses, aucune migration n'a été observée dans nos matériaux même après 21 jours de culture.

A l'issue de cette étude de bioactivité sur des lamelles d'hydrogel cellularisées, nous avons tous les paramètres réunis pour que les cellules survivent, se développent et s'alignent guidées par l'anisotropie de notre lamelle de collagène/THA.

II. Développement d'un modèle d'Annulus Fibrosus

L'Annulus Fibrosus étant un tissu anisotrope où les cellules sont confinées entre deux lamelles adjacentes, nous avons souhaité reproduire ce confinement. Ceci a été réalisé par l'impression d'une seconde couche d'encre au-dessus de la première préalablement cellularisée. Les deux couches ont été imprimées dans la même direction afin d'étudier le confinement avec un alignement unidirectionnel.

1. Fabrication des « sandwichs » cellularisés

Nous avons tout d'abord évalué la faisabilité du procédé de fabrication. Qu'il s'agisse du protocole standard ou du protocole d'imprégnation, des sandwichs ont toujours été obtenus (Figure 125). Néanmoins, selon le protocole utilisé, des difficultés se sont ajoutées. La plus grande différence entre les deux protocoles est le temps d'élaboration.

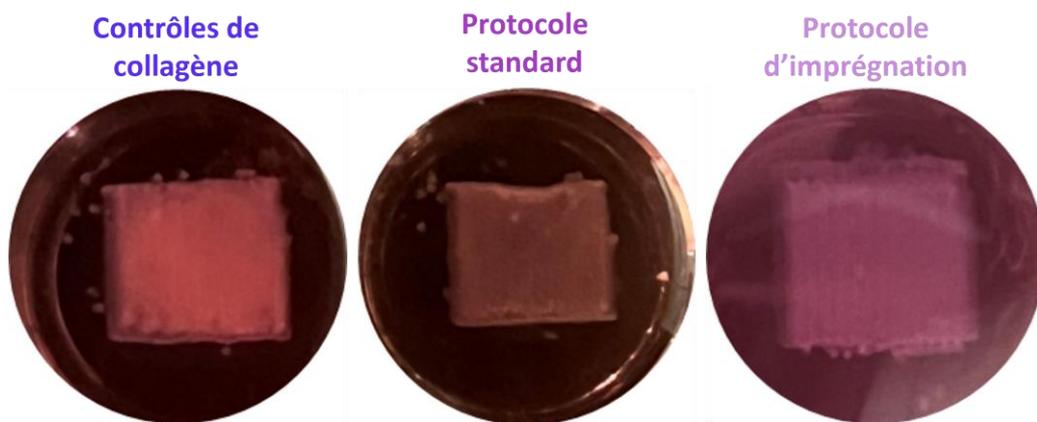


Figure 125 : Observation macroscopique des hydrogels sandwichs cellularisés avec des fibroblastes selon l'encre et le protocole d'élaboration utilisé.

Le protocole standard dure au maximum 1h30 entre l'impression de la première couche et le début de la culture cellulaire après l'impression de la seconde couche (Figure 126(A)). Après avoir imprimé l'encre dense collagène/THA dans le bain de fibrillation, la photoréticulation est amorcée directement pendant 15 minutes. Les hydrogels sont ensuite incubés dans l'incubateur pendant 15 minutes supplémentaires pour permettre la fibrillogénèse complète du collagène. Une fois le réseau formé et rincé au milieu de culture, les cellules sont déposées à la surface et incubées pendant 30 minutes dans l'incubateur pour les faire adhérer à la surface de l'hydrogel. La seconde couche est imprimée et réticulée directement pendant 15 minutes complétée par 15 minutes supplémentaires de fibrillogénèse dans l'incubateur. Enfin, le bain de fibrillogénèse est remplacé par du milieu de culture afin de démarrer la culture cellulaire des « sandwichs » sur 14 jours.

Finalement, les cellules ne sont mises en contact du PBS que pendant 30 minutes au total ce qui n'est pas toxique pour elles comme montré en Partie 4 - Chapitre 1. En effet, la toxicité se manifeste après plus de 2h de mise en contact.

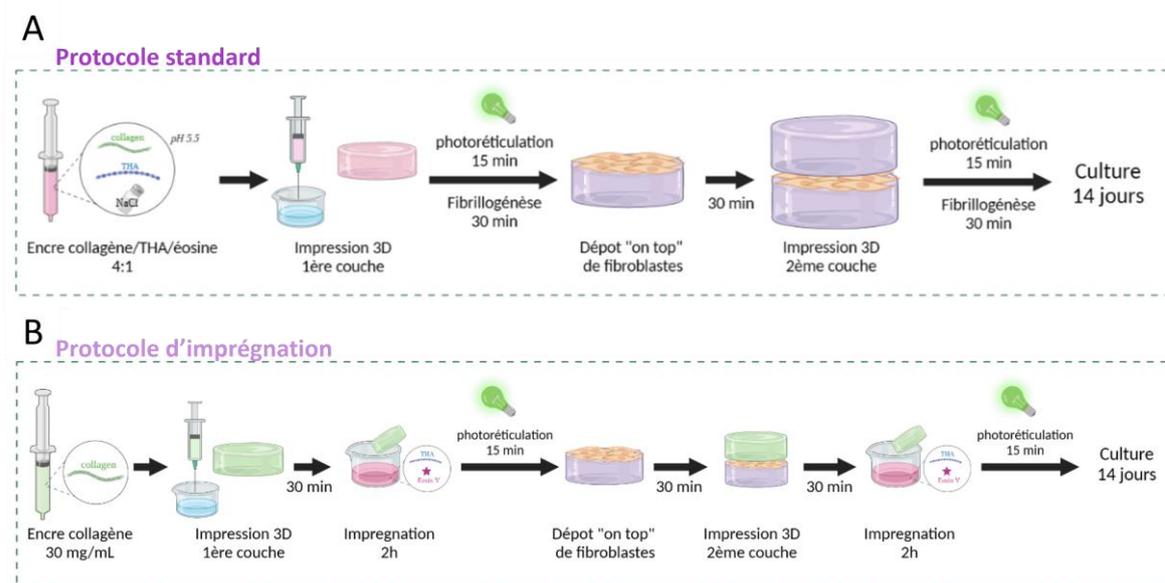


Figure 126 : Schéma d'élaboration des sandwichs selon si (A) le protocole standard est utilisé ou (B) le protocole d'imprégnation est utilisé.

Le protocole d'imprégnation est plus compliqué puisqu'il s'étend sur 6h de fabrication (Figure 126(B)). La première étape est consacrée à l'élaboration de la première couche imprégnée de THA. Après avoir imprimé une première couche de collagène pur qui a fibrillé pendant 30 minutes dans l'incubateur, 2h d'imprégnation sont conduites avec un bain de THA à 3% (w/v) et 0,1 mg.mL⁻¹ d'éosine. L'excédent est rincé suivi de la photoréticulation est conduite pendant 15 minutes. Le PBS est remplacé par du milieu de culture puis les cellules sont déposées à la surface et incubés pendant 30 minutes dans l'incubateur. Suite à cela, la deuxième couche d'encre de collagène est imprimée au-dessus des cellules dans le bain de fibrillogénèse. Après 30minutes de fibrillation dans l'incubateur, un nouveau bain d'imprégnation de THA et d'éosine de 2h est conduit dans l'incubateur. L'excédent est rincé et la photoréticulation est effectuée pendant 15 minutes. Enfin, le milieu de culture est ajouté pour pouvoir démarrer l'incubation. Sur les 6h totales d'élaboration, les cellules restent en contact 30 minutes avec le bain de fibrillation comme pour le protocole standard mais à cela, les 2h d'imprégnation de THA et d'éosine doivent également être ajoutées. Même si le bain d'éosine est effectué dans du DMEM pour diminuer la toxicité, les conditions restent moins favorables aux cellules que celles du protocole standard.

Le temps de préparation étant long pour la méthode par imprégnation, l'imprimante 3D doit être éteinte afin de ne pas chauffer et dénaturer l'encre de collagène. La majeure difficulté du protocole d'imprégnation vient de là puisqu'on perd la calibration initiale entre les deux couches.

Les repères d'impression ne sont plus les mêmes. Certaines astuces pratiques ont été développées afin de palier à cette difficulté ce qui permet tout de même d'obtenir des sandwichs à l'issue de ce protocole. La deuxième difficulté vient de la formation du film de THA et d'éosine en surface de l'hydrogel de collagène. En effet, l'impression de la seconde couche est par conséquent plus compliquée puisque le film qui se forme ajoute de la hauteur mais surtout l'adhérence avec l'encre de collagène n'est plus la même. Ainsi, des glissements de la première couche et donc son décollement du support plastique interviennent assez fréquemment. Lors du protocole standard, ce genre de difficultés n'existe pas puisqu'il n'y a pas de film de lubrification formé en surface. Une astuce développée pour diminuer ce problème a été d'utiliser un modèle carré retranché de 1mm par rapport à celui de la 1^{ère} couche et d'imprimer avec une intercouche supérieure à celle utilisée pour le contrôle de collagène ou le protocole standard (Figure 127).

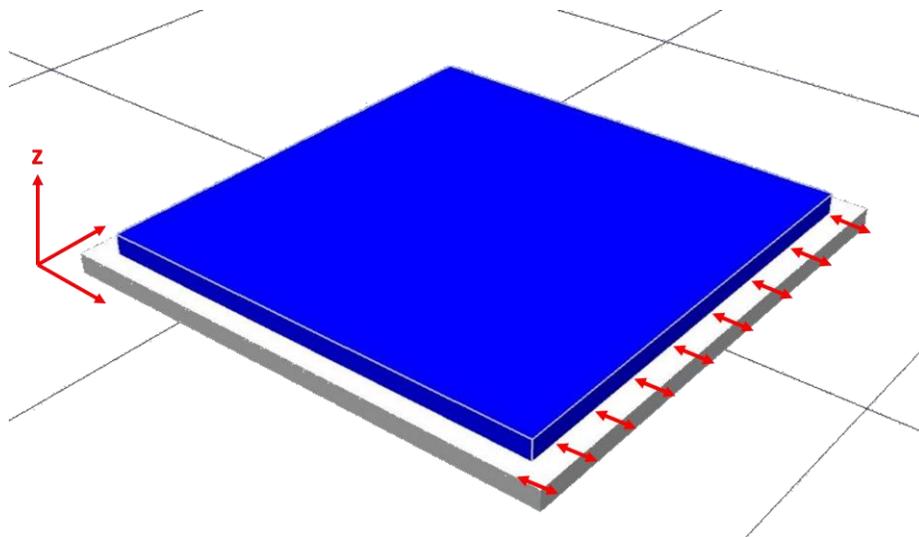


Figure 127 : Modèle informatique des deux couches imprimées pour former le sandwich (double flèche rouge : retranchement de 1mm de la seconde couche).

Le retranchement de la seconde couche a été effectué pour atténuer l'impact de la perte de calibration de l'imprimante 3D. En effet, afin de superposer la 2nde couche sur la première, il a été nécessaire de définir un point repère de calibration utilisé pour les deux couches dans un puits contrôle. Malgré ce point repère, un léger décalage de moins de 1mm était souvent observé. En retranchant le carré de 1mm, ceci compense le décalage afin que la seconde couche puisse adhérer sur la première dès l'extrusion du premier filament. L'augmentation de la hauteur intercouche a été pensée pour diminuer l'effet de « pincement » ressenti par la première couche lors de l'impression de la seconde. En effet, puisque ceci provoquait des phénomènes de glissement dus à la couche de lubrification, en augmentant cette hauteur, ces derniers sont diminués. La première couche se décolle moins conduisant à un meilleur alignement des deux lamelles en plus d'une meilleure facilité de « fabrication ».

Comme pour les monocouches, des sandwichs contrôles formés uniquement de collagène ont également été générés comme contrôle puisque le collagène est un support bioactif à lui seul. Ceci nous a permis d'évaluer directement si le protocole et/ou la présence de THA a un impact positif ou négatif sur le comportement des cellules.

2. Etude comparative de la bioactivité liée aux protocoles standard et d'imprégnation

Divers facteurs ont été étudiés afin d'évaluer la cytocompatibilité et la bioactivité de nos procédures de génération d'hydrogels cellularisés avec confinement :

- La viabilité cellulaire a été évaluée par essais Live/Dead sur 14 jours d'incubation aux jours 1, 7 et 14.
- La prolifération cellulaire a été évaluée par Alamar Blue comme précédemment aux mêmes temps de culture.
- La morphologie et l'alignement des cellules ont pu être observés par microscopie confocale couplée à de la génération de seconde harmonique (GSH) après avoir marqué les filaments d'actine des cellules à la phalloïdine.
- Les propriétés mécaniques ont été caractérisées par rhéologie sous cisaillement.

2.1. Viabilité cellulaire en confinement

Les essais de Live/Dead permettent de détecter la fraction de cellules mortes mais ne dénombrent pas les cellules totales (Figure 128). Les cellules vivantes sont détectables grâce à la coloration verte qui est internalisée dans le cytoplasme et apparaît donc sous forme de fuseaux dans le cas des fibroblastes. Les cellules mortes sont rouges et rondes car le marqueur est internalisé dans le noyau.

Au jour 1, des cellules vivantes sont détectées pour chaque condition alors qu'aucune cellule morte n'est visible. Aux 7^e et 14^e jour, la viabilité des cellules est toujours maximale car aucune cellule morte n'est observée à ces temps de culture (Figure 128). Parallèlement à cela, l'alignement semble présent au 14^e jour notamment pour les contrôles de collagène et les hydrogels élaborés grâce au protocole standard (Figure 128). Ceci sera contrôlé ultérieurement via l'étude de la morphologie cellulaire.

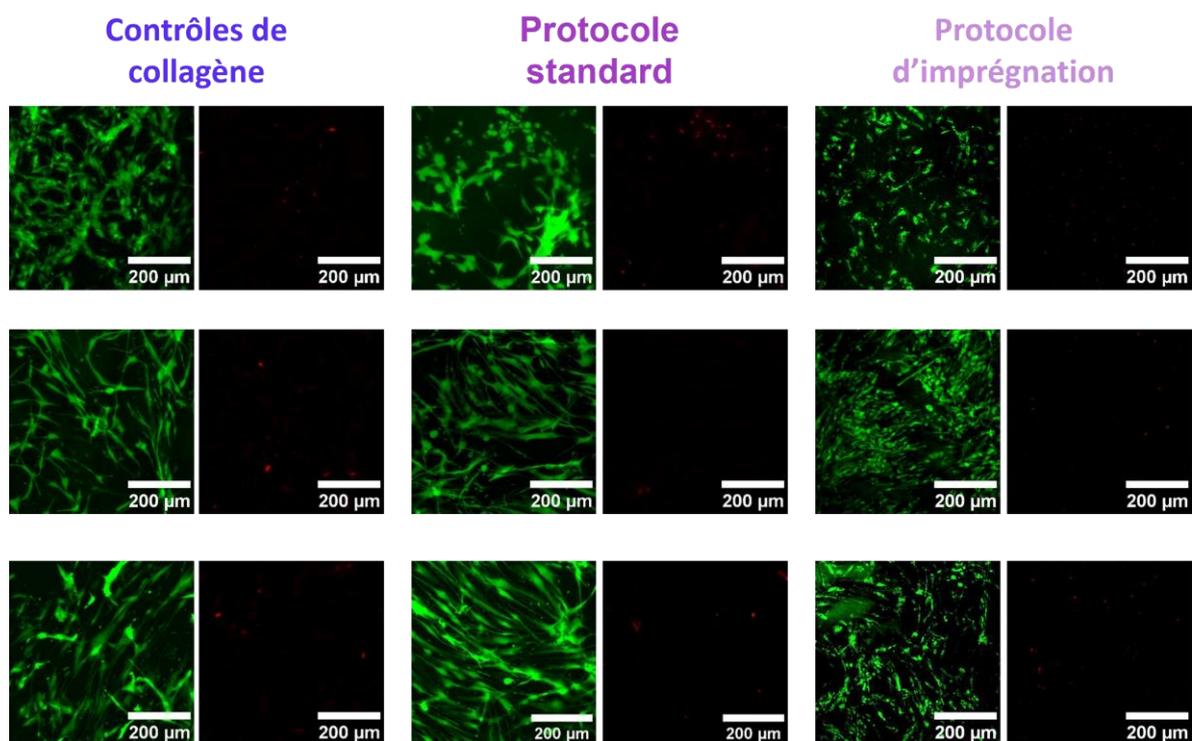


Figure 128 : Viabilité cellulaire évaluée via des essais de Live/Dead et observé au microscope confocal (x25) (vert : cellule vivante / rouge : cellule morte).

2.2. Prolifération cellulaire en confinement

La prolifération cellulaire a été évaluée sur 14 jours de culture par des test Alamar Blue (Figure 129).

Au jour 1, des différences entre les protocoles sont déjà observables. En effet, l'activité métabolique des sandwichs générés grâce au protocole standard est 3 fois plus importante que celle du protocole d'imprégnation. Les cellules du contrôle de collagène ont une activité métabolique similaire à celle des cellules confinées dans les hydrogels collagène/THA fabriqués avec le protocole standard.

La première semaine, la prolifération est quasiment nulle puisqu'aucune augmentation d'activité métabolique n'est observée quelle que soit la condition d'élaboration des hydrogels. Ceci ne peut qu'être lié au seul paramètre commun aux trois conditions c'est-à-dire à l'état confiné des cellules (Serbo et al., 2016; "The Impact of Engineered Mechanical Confinement on Mesenchymal Stem Cell and Lung Fibroblast Mechanobiology - ProQuest," n.d.; Thie et al., 1989). Elles ont donc moins de place et ont une contrainte mécanique qui peut inhiber leur prolifération.

En revanche, après deux semaines de culture, la prolifération cellulaire est observée. Le protocole standard semble être celui pour lequel la bioactivité du biomatériau est la meilleure. En effet, cette condition permet de multiplier par quatre l'activité métabolique pour atteindre une valeur de 80% de réduction de la résazurine, ce qui est bien supérieur aux contrôles de collagène (X1,5). L'activité métabolique des contrôles de collagène atteint les 50 % après 14 jours de culture. Enfin, les hydrogels formés par le biais du protocole d'imprégnation permettent de tripler eux aussi la population cellulaire montrant une activité proliférative des cellules même si elle est plus faible. Ces résultats montrent que les cellules ont adhéré en 3D et se sont adaptées à leur environnement, ce qui leur permet de se multiplier.

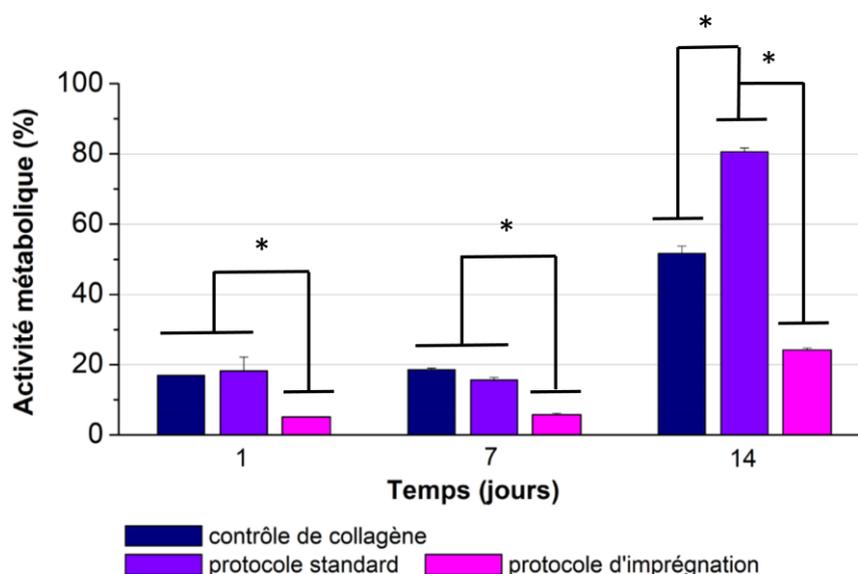


Figure 129 : Evaluation de la prolifération cellulaire via des test Alamar Blue pendant 14 jours de culture (* : $p < 0,05$ (n = 3)).

Une hypothèse peut expliquer les activités métaboliques inférieures mesurées dans les hydrogels obtenus par imprégnation. Il se pourrait que les cellules soient aussi nombreuses que pour les autres conditions mais qu'elles soient dans un moins bon état métabolique. Cette hypothèse semble pertinente au vue des conditions d'élaboration plus longues et stressantes du protocole d'imprégnation et du nombre de cellules observés au jour 14 par Live/Dead. Afin d'en être certain, il serait judicieux de procéder à une quantification exacte du nombre de cellules par un test Picogreen.

A ce stade, l'hydrogel formé par protocole standard semble le plus prometteur puisqu'il dépasse même les performances des hydrogels contrôles de collagène. De manière générale, s'il y a prolifération pour les trois conditions explorées, le confinement des fibroblastes ralentit la multiplication des cellules puisqu'elle était beaucoup plus prononcée sur les monocouches.

2.3. Morphologie et alignement

La morphologie et l'alignement des hydrogels ont été étudiés par microscopie confocale couplée à de la Génération de Seconde Harmonique (GSH). La GSH permet de visualiser l'orientation des filaments de collagène imprimés observable en violet sur la Figure 130. L'orientation des filaments imprimés est marquée par la présence de flèche blanche. Les cellules sont visualisées grâce au marquage des filaments d'actine à la phalloïdine (en vert).

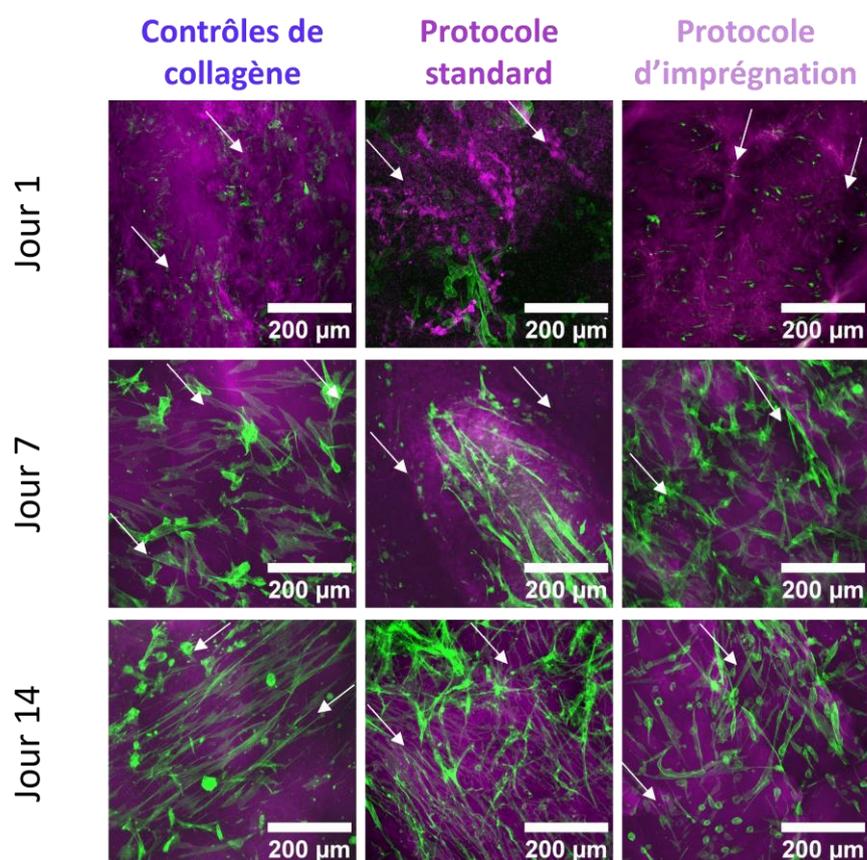


Figure 130 : Morphologie et alignement de fibroblastes confinés dans les trois types d'hydrogels imprimés selon des protocoles différents observés par microscopie confocale couplé à la GSH (x25) (violet : signal GSH du collagène / vert : filaments d'actine des fibroblastes / flèches blanche : direction des filaments de collagène).

Au jour 1, on aperçoit des cellules rondes qui commencent à s'étaler pour certaines d'entre elles quelles que soit les conditions de culture. Elles semblent donc adhérer aux hydrogels. Elles ne présentent pas d'alignement particulier et sont peu nombreuses. Dans le cas du protocole d'imprégnation, elles sont beaucoup plus rondes que pour le protocole standard synonyme de moins bonnes interactions avec leur support.

Après 7 jours de culture, la quantité de cellules semble similaire au jour 1 pour toutes les conditions. Seulement, elles sont plus allongées et forment des fuseaux typiques de la morphologie de fibroblastes exactement comme ceux observés sur la monocouche (Figure 130). Un alignement des fibroblastes le long des filaments semble se produire dans les hydrogels

collagène/THA du protocole standard alors que l'organisation cellulaire reste isotropique dans les autres types d'hydrogels.

Au 14^{ème} jour de culture, on observe une plus grande quantité de fibroblastes présents dans les hydrogels. Ceci est en adéquation avec les résultats d'Alamar Blue analysés précédemment et montre bien qu'il y a prolifération. De plus les cellules sont toujours en forme de fuseaux et l'alignement est clairement visible le long des filaments extrudés peu importe les conditions d'élaboration des hydrogels considérées. Néanmoins, certaines cellules sont rondes dans le cas des contrôles de collagène et du protocole d'imprégnation, peut-être caractéristique de mort cellulaire ou bien de changement de morphologie dû aux contraintes amenées par le confinement et la structure/biochimie de ces supports. Seuls les hydrogels formés via le protocole standard ne semblent pas affectés la morphologie cellulaire ce qui en fait une fois de plus un meilleur candidat que les autres comme modèle de l'AF.

2.4. Propriétés mécaniques des construits constitués de deux lamelles cellularisées

Ici, pour notre dernière étude permettant d'élaborer un modèle d'Annulus Fibrosus, nous avons souhaité évaluer le gain de cohésion des trois types d'hydrogels cellularisés à travers la quantification de leurs propriétés mécaniques.

Puisque les hydrogels ne font que 660µm de hauteur (2 couches), ils sont difficilement manipulables. Nous avons donc éliminé la possibilité de faire des essais de traction qui nous auraient permis de pouvoir comparer les propriétés mécaniques de notre modèle à celles du tissu natif. Ces essais de traction restent tout de même essentiels à conduire pour la suite de ce projet mais pour cela il faudrait produire un plus grand nombre de couches.

Notre objectif étant de quantifier la cohésion entre les lamelles du matériau au cours du temps, nous nous sommes orientés vers de la rhéométrie (Figure 131). Le souci du cisaillement est que, même à faible taux de déformation, on risque de casser la jointure entre les deux couches faites par les cellules.

Tout d'abord, il est à noter que le module de stockage des sandwichs cellularisés est très inférieur aux monocouches non cellularisées caractérisées lors de la Partie 3 - Chapitre 3. En effet, alors que des modules de stockage de l'ordre de 6 kPa étaient obtenus sur les monocouches, les valeurs chutent autour de 2 kPa lorsqu'on caractérise les sandwichs cellularisés soit près de trois fois moins. Nous pensons que ceci est dû au fait que les matériaux ne sont pas entièrement cohésifs du fait de la présence des cellules qui doivent faire le lien entre deux interfaces disjonctives. Il s'agit donc d'un module de stockage complexe combiné de l'apport de deux types

de matériaux complexes : notre hydrogel imprimé aux propriétés mécaniques bien connues et les cellules. Il faudrait une culture cellulaire beaucoup plus longue pour que la production de matrice extracellulaire par les cellules fasse la jonction.

Après un jour en culture, les trois types de sandwich possèdent les mêmes modules de stockage autour de 1,9 kPa. Ceci n'est pas logique puisque le collagène n'a pas subi de photoréticulation, son module devrait donc être plus faible que pour les hydrogels collagène/THA qui ont un réseau de THA formé par photoréticulation.

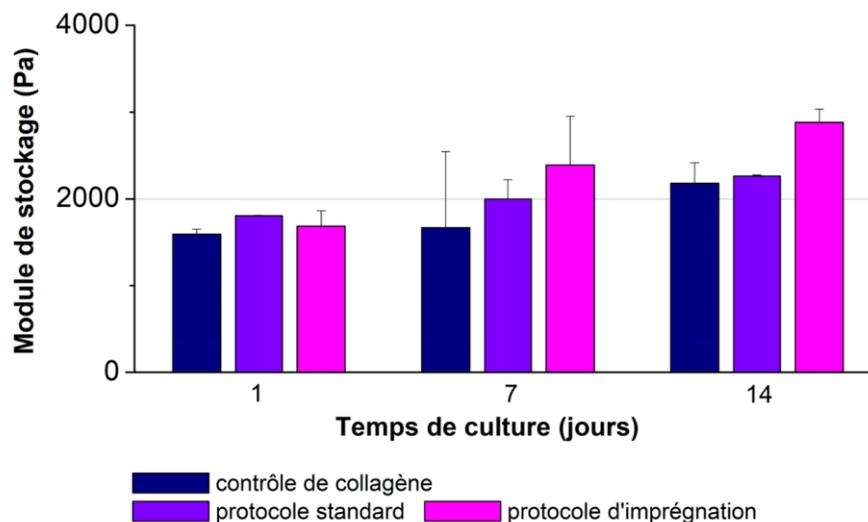


Figure 131 : Module de stockage des sandwich cellularisés sur 14 jours de culture selon l'encre et le protocole utilisés.

Au 7^{ème} jour de culture, une augmentation sensible du module de stockage est observable pour les protocoles standard et d'imprégnation mais pas pour le contrôle de collagène qui reste autour de 1900 Pa. Le protocole d'imprégnation semble être celui présentant la plus grande élasticité puisque son module de stockage est 10% supérieur à celui du protocole standard néanmoins l'ordre de grandeur reste le même. Néanmoins, ces résultats sont à prendre avec précaution puisqu'ils peuvent ne pas être d'une grande fiabilité au vue de la contrainte de cisaillement qui n'est peut rompre la jonction inter lamellaire et générer des valeurs faussées.

Enfin au 14^{ème} jour, le module de stockage semble augmenter pour les trois conditions, synonyme de renforcement du matériau. Ce renforcement pourrait être attribué à une production de MEC. En effet, nous avons constaté que la croissance et la prolifération des cellules n'étaient accélérées qu'entre le 7^{ème} et le 14^{ème} jour. Aucune différence n'avait été observé pendant les 7 premiers jours. Or si les cellules ne se sentent pas bien dans leur environnement biochimique, elles ont tendance à produire de la MEC afin de mieux se développer. Ceci coïncide donc avec l'augmentation de la prolifération cellulaire seulement au 14^{ème} jour de culture.

Nous ne pouvons néanmoins pas conclure de source sûre quant à la production de MEC dû à la fragilité des résultats obtenus en rhéologie. Une confirmation par PCR serait plus fiable et plus précise à notre sens et sera la prochaine chose à faire.

3. Amélioration de la bioactivité et de la biocompatibilité du protocole d'imprégnation

En plus de sa difficulté d'exploitation expérimentale, le protocole d'imprégnation a démontré une légère cytotoxicité lors du confinement des fibroblastes entre deux lamelles. En effet, le nombre de cellules qui survivent au jour 1 de culture est 50 % moindre par rapport au contrôle de collagène et au protocole standard (Figure 129). Nous pensons que ceci est directement lié au temps d'élaboration trop long qui provoque des stress cellulaires affectant l'état des cellules dans le temps. C'est pourquoi nous avons souhaité réduire le temps de fabrication de la procédure d'imprégnation tout en gagnant en faisabilité expérimentale.

Pour cela, le protocole a été modifié pour imprimer un sandwich cellularisé de collagène complet tel qu'ils ont été faits pour les contrôles de collagène. L'imprégnation avec le bain de THA pendant 2h n'a été conduit qu'une fois le sandwich de collagène complètement formé en simultanée sur les deux couches afin de réduire par deux le temps d'imprégnation total. La culture a également été faite sur 14 jours et la bioactivité a été comparée à celle du protocole d'imprégnation précédent et à celle des contrôles de collagène. Par souci de clarté, on appellera le protocole initial « protocole long » et le nouveau « protocole court ».

3.1. Impact du protocole court sur la viabilité cellulaire

La viabilité cellulaire a été le premier facteur permettant de comparer les deux procédures d'imprégnation. A jour 1, les cellules paraissent plus allongées lorsque le protocole court est employé en comparaison avec le protocole long (Figure 132). Le profil obtenu est plus proche des contrôles de collagène. Au 7^{ème} jour, les fibroblastes semblent bien allongés et adhérents. Peu de cellules mortes sont observées confirmant que les cellules sont viables. Enfin, au 14^{ème} jour, les cellules vivantes semblent plus nombreuses et allongés similairement au contrôle de collagène. Aucune mortalité n'est recensée.

A ce titre, le protocole court semble adapté puisque la viabilité semble similaire à celle des contrôles de collagène. Aucune mortalité n'a été recensée sur 14 jours de culture et les cellules semblent adhérentes et allongées.

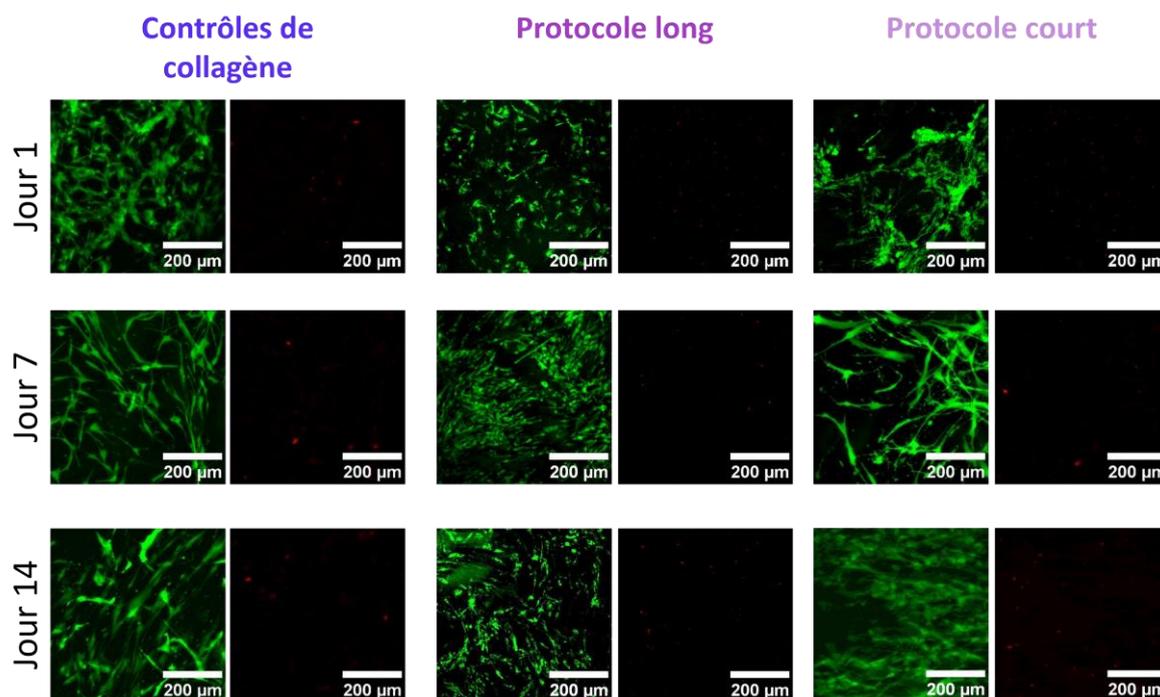


Figure 132 : Viabilité cellulaire évaluée via des essais de Live/Dead pour les deux versions du protocole d'imprégnation et les contrôles de collagène observée au microscope confocal (x25) (vert=vivant / rouge=mort).

3.2. Impact du protocole court sur la prolifération cellulaire

La bioactivité des hydrogels peut être évaluée par mesure de l'activité métabolique des cellules puisque cela illustre l'affinité entre les cellules et leur support. Si le support est bon, l'activité métabolique augmente au cours du temps.

L'impact du changement de protocole d'imprégnation sur l'activité métabolique rendant compte de la prolifération cellulaire a été étudié (Figure 133).

Après 1 jour de culture, les cellules des sandwichs générés par le protocole d'imprégnation court ont une activité métabolique deux fois plus élevée que celles du protocole d'imprégnation long. Néanmoins, celle-ci n'est pas à la hauteur de celle des contrôles de collagène.

Au 7^{ème} jour d'incubation, l'activité métabolique des cellules des hydrogels du protocole court augmente considérablement pour passer de 11% au jour 1 à 25% au jour 7. Celle-ci dépasse même celle des contrôles de collagène qui est d'environ 20%. Elle est multipliée par cinq comparée à celle obtenue pour le protocole long. A ce stade, la plus-value d'un tel protocole semble avérée.

Néanmoins, au 14^{ème} jour, malgré une nouvelle augmentation et une activité métabolique toujours supérieure par rapport au protocole long, les performances du protocole court ne sont

pas suffisantes pour assurer le même niveau de bioactivité que les hydrogels de collagène. L'activité métabolique est deux fois plus élevée pour les contrôles de collagène que pour le protocole court d'imprégnation. Cette rupture de pente entre le jour 7 et le jour 14 signifie que la prolifération cellulaire est affaiblie pour les hydrogels formés grâce au protocole court.

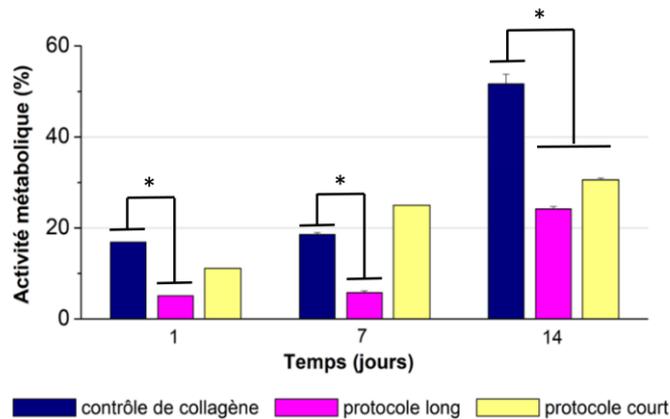


Figure 133 : Evaluation de la prolifération cellulaire via des essais d'Alamar Blue pendant 14 jours de culture (* : $p < 0,05$ (n = 3)).

3.3. Impact du protocole court sur la cohésion des hydrogels

Enfin, la cohésion des hydrogels générés avec les deux protocoles d'imprégnation a été confrontée en mesurant leur élasticité par rhéométrie (Figure 134).

Au 1^{er} jour, le module de stockage est le même pour les trois types d'hydrogel avec une valeur autour de 1,6 kPa. Comme expliqué précédemment cela semble étrange étant donné que le contrôle de collagène n'a pas subi de photoréticulation contrairement aux deux autres.

Après 7 jours de culture, le module de stockage des hydrogels fabriqués par imprégnation courte ne subit pas d'augmentation similaire à celle du protocole long. En effet, un module de stockage de 1,7 kPa est obtenu pour le protocole court contre 2,4 kPa pour le protocole long.

Finalement, après 14 jours, les trois types d'hydrogels voient leurs modules de stockage augmenter. Les hydrogels fabriqués par imprégnation subissent une plus forte augmentation que les hydrogels de collagène allant jusqu'à atteindre 2,6 kPa pour le protocole court et 2,8 kPa pour le protocole long. Ceci traduit une augmentation de l'élasticité du réseau après 14 jours de culture et donc une meilleure cohésion entre les deux couches. Cette cohésion a pu être assurée par la production de MEC comme introduit précédemment mais des quantifications par PCR pourraient nous permettre de le confirmer.

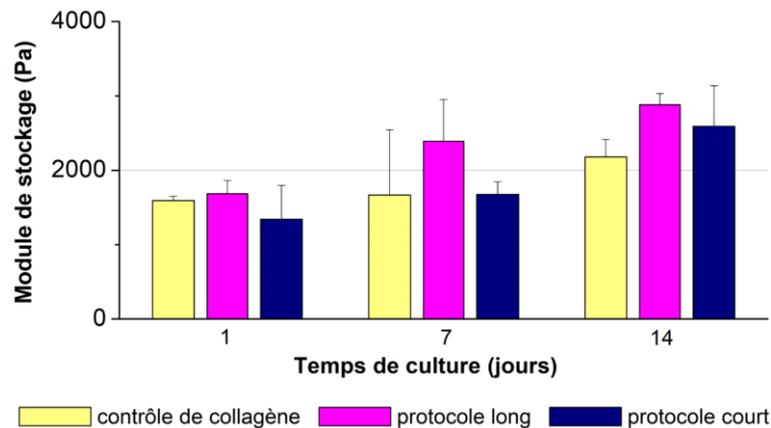


Figure 134 : Module de stockage des sandwich cellularisés sur 14 jours de culture selon le protocole d'imprégnation utilisé.

De manière générale, l'adaptation du protocole d'imprégnation en réduisant le temps d'élaboration paraît être un bon moyen pour augmenter la viabilité cellulaire au niveau de celle des contrôles de collagène. Les cellules sont adhérentes et allongés tout comme précédemment. La prolifération cellulaire semble également meilleure sur 14 jours de culture que celle du protocole d'imprégnation long traduisant de la pertinence de l'ajustement. Finalement, des hydrogels cohésifs sont également formés pour lesquels un renforcement a lieu après 14 jours de prolifération traduisant peut-être la production de MEC par les fibroblastes.

Un doute subsiste quant à ce nouveau protocole d'imprégnation : l'efficacité de la photoréticulation. En effet, en plus d'avoir le même module de stockage que les contrôles de collagène qui sont seulement fibrillés, la photoréticulation des deux couches en une seule étape peut potentiellement perturber la présence de l'ultrastructure initialement désirée. Une possibilité subsiste quant à l'efficacité de la photoréticulation qui est performée sur les deux couches en simultanée. Ceci pourrait mener à un gradient de réticulation non homogène selon si la surface de l'hydrogel ou la partie basse est sondée. De plus, l'imprégnation globale pourrait perturber la microporosité du réseau fibrillaire en comblant la jonction intercouche spécifique aux cellules. De par un confinement ressenti plus important et une plus grande présence de THA dans cette jonction, cela pourrait affecter les cellules. Cette dernière hypothèse pourrait être à l'origine de la baisse de prolifération cellulaire des hydrogels fabriqués par imprégnation courte après 14 jours de culture.

Conclusion sur le développement d'un modèle d'Annulus Fibrosus par impression 3D

Dans cette partie, nous semble parvenu à développer deux encres correspondant aux deux protocoles sélectionnés à l'issue de la Partie 3. La première repose sur l'utilisation d'une encre dense de collagène qui, une fois imprimée et fibrillée, est imprégnée avec un bain de THA et d'éosine. Le THA encapsulé dans l'hydrogel fibrillé est ensuite photo-réticulé sous lumière verte. Le second protocole repose sur la formulation d'une encre collagène/THA avec un ratio 4 :1 représentatif du tissu natif en présence de sels avec inclusion d'éosine. L'impression 3D et la fibrillogénèse de l'encre sont suivies directement d'une exposition à la lumière verte pour amorcer la réticulation chimique du THA.

Les deux protocoles ont été optimisés afin d'obtenir des propriétés physiques optimales en termes de modules de stockage, d'anisotropie et de structure et une cytotoxicité faible sur des fibroblastes.

A l'issue de ce travail d'optimisation, la bioactivité des deux types de matériaux a pu être étudiée en déposant des fibroblastes au-dessus d'une lamelle d'hydrogel. Pour cela, les performances des protocoles standard et d'imprégnation ont été comparées à des contrôles de collagène connus pour être une référence en termes de bioactivité. Une prolifération cellulaire pendant 21 jours de culture a été mise en évidence en plus d'une bonne adhérence et d'un alignement des fibroblastes le long des filaments imprimés. Les trois matériaux ont la même bioactivité à ce stade.

Afin de mimer l'environnement natif des cellules d'AF, des sandwichs composés d'hydrogels imprimés dans lesquels des fibroblastes sont confinées entre deux lamelles ont été générés pour les trois types de matériaux. Leur comportement a été étudié sur 14 jours de culture à l'issue desquels le protocole standard s'est avéré meilleur que le protocole d'imprégnation ou même le contrôle de collagène. En plus de sa facilité de fabrication, les hydrogels ne sont pas cytotoxiques pour les fibroblastes contrairement au protocole d'imprégnation. Il s'agit du protocole pour lequel nous avons obtenu la meilleure viabilité cellulaire et la meilleure prolifération sur 14 jours. Ces deux paramètres ont été même supérieurs aux hydrogels de collagène pur.

La morphologie cellulaire dans ces hydrogels est caractéristique de celle des fibroblastes malgré le confinement entre les deux lamelles d'hydrogels, ce qui est d'ailleurs valable pour les deux autres types d'hydrogels. Nous avons également mis en évidence que l'alignement des

fibroblastes était guidé par l'anisotropie de l'hydrogel support pour toutes les conditions même si le protocole standard a permis un alignement plus précoce.

Enfin, la production de MEC semble avoir été effective au 14^{ème} jour du fait de l'augmentation des propriétés rhéologiques des sandwichs, montrant une amélioration de la cohésion entre les couches. Un module de stockage en cisaillement de 2 kPa a été obtenu après 14 jours de culture. Ces résultats restent à confirmer par une étude en PCR quantitative sur l'expression de protéines de la MEC telles que le collagène de type I ou par le marquage du collagène de la matrice.

Concernant le protocole d'imprégnation, nous pensons que sa légère cytotoxicité peut être dû aux conditions de photoréticulation. Nos collaborateurs suisses ont démontré dans le cadre d'une thèse en cours de développement que lorsque la photoréticulation à l'éosine était effectuée sur l'hydrogel sorti de son bain de fibrillation, la toxicité était supérieure à quand elle était effectuée dans un liquide. Pour le protocole standard, la photoréticulation est conduite dans un bain liquide sous la LED de l'imprimante 3D, les radicaux sont diffusés rapidement à travers le liquide évitant les stress oxydants imposés aux cellules. A contrario, une photoréticulation dans l'air est conduite pour le protocole d'imprégnation lors duquel les radicaux peuvent donc être piégés dans le réseau ne pouvant être éliminés. Les cellules subissent alors un stress oxydant beaucoup plus important qui peut leur être néfaste et affecter la bioactivité du protocole d'imprégnation.

Nous avons démontré dernièrement qu'une solution pouvait néanmoins permettre d'améliorer la viabilité cellulaire du protocole d'imprégnation tout en gagnant en praticité technique. En effectuant l'imprégnation du sandwich en une seule étape finale une fois les deux couches imprimées avec les cellules confinées, nous arrivons à augmenter la viabilité cellulaire au même niveau que les contrôles de collagène. Les fibroblastes sont alignés et en forme de fuseaux et leur prolifération est légèrement augmentée même si elle reste inférieure à celle des hydrogels contrôles de collagène. Néanmoins, cela ne suffit toujours pas à atteindre les performances de bioactivité du protocole

Conclusions & perspectives

Lors de cette thèse, nous avons pour objectif principal d'élaborer un modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus reproduisant à la fois les propriétés physiques et biochimiques du tissu natif. Après avoir étudié la structure et le fonctionnement du disque sain et dégénéré, nous avons pu mettre en évidence les propriétés mécaniques, structurales et biochimiques nécessaires à l'élaboration d'un tel modèle. L'Annulus Fibrosus étant un tissu fibreux et hydraté composé principalement de collagène de type I et de glycosaminoglycanes tels que l'acide hyaluronique (HA), nous avons choisi d'utiliser ces deux biopolymères pour notre matériau. La formation d'hydrogels composés de ces derniers nous a semblé être la meilleure forme pour modéliser l'AF. En effet, le collagène gélifie facilement par remontée de pH. Par contre, comme l'acide hyaluronique ne peut pas former de gel sous sa forme originelle, il a fallu le fonctionnaliser avec de la tyramine pour pouvoir le réticuler chimiquement et former un hydrogel. A l'issue de cette étape, de l'acide hyaluronique fonctionnalisé avec de la tyramine (THA) à 6% est obtenu. Lorsque ces deux biopolymères sont mélangés, leurs charges opposées provoquent des interactions électrostatiques menant à la formation de complexes polyioniques. Des mélanges hétérogènes sont alors obtenus ne permettant pas d'atteindre des propriétés structurales et mécaniques optimales. C'est pourquoi une première partie de cette thèse a été consacrée à étudier et à inhiber les phénomènes de complexation entre collagène I et THA.

Lors de cette étude physico chimique, différents pH et forces ioniques ont été utilisés. La gamme de pH explorés a été comprise entre 1 et 5,5 et la force ionique a été modulée en ajoutant ou non du NaCl à 400 mM pour écranter les charges. En solution, les complexes polyioniques ont été inhibés à pH 1 avec et sans ajout de sel dû à la neutralisation de l'acide hyaluronique. Un pH 5,5 proche du point isoélectrique du collagène et en présence de sels a également permis d'inhiber la complexation grâce à la formation de fibrilles de collagène en solution. En amorçant la fibrillogénèse du collagène, cela affaiblit les phénomènes de complexation.

La gélification du collagène a ensuite été déclenchée par remontée de pH afin de déterminer si la formation du réseau fibrillaire était perturbée par la présence d'acide hyaluronique. Il a été démontré que la structure fibrillaire du collagène était impactée par la présence d'acide hyaluronique seulement quand des complexes polyioniques étaient formés en solution c'est-à-dire à pH 2,5, 4 et 4,5. Lorsque les complexes étaient affaiblis ou inhibés, la structure fibrillaire du collagène était restaurée. Il a été confirmé par infrarouge qu'à pH 1 avec ou sans sel et à pH 2,5 et 5,5 en présence de sels, aucun complexe n'était formé puisque l'acide

hyaluronique était sous sa forme libre. Pour ces conditions des hydrogels de collagène fibrillaires homogène étaient formés.

Afin d'augmenter les propriétés mécaniques des hydrogels collagène/THA, une dernière étape de gélification de l'acide hyaluronique par réticulation chimique post fibrillogénèse du collagène a été effectuée. Celle-ci a d'abord été faite par voie enzymatique avec de la HRP et du H_2O_2 mais aucune augmentation des propriétés mécaniques et thermiques n'a été observée attestant de l'inefficacité de la HRP. Cette inefficacité est potentiellement liée à la faible diffusion de la HRP dans les gels de collagène ou à la perte de THA durant les lavages de neutralisation post-fibrillogénèse. Des stratégies d'optimisation de cette voie de réticulation ont alors été testées. Un protocole inversé lors duquel la réticulation enzymatique du THA a été effectuée avant la fibrillogénèse a été testé mais son efficacité a semblé limitée, ne permettant pas d'augmenter considérablement les propriétés physiques des hydrogels. Comme autre stratégie, une étape d'imprégnation de l'hydrogel de collagène par le THA a été effectuée. Le protocole d'imprégnation a permis d'améliorer les propriétés mécaniques des hydrogels en comparaison avec le protocole standard sans imprégnation dû à la diffusion de THA au sein du réseau fibrillaire de collagène pour compenser sa perte lors des lavages. Néanmoins, les propriétés physiques n'étant pas suffisamment renforcés par rapport aux hydrogels de collagène purs. Enfin un procédé de photoréticulation a été testé. La photoréticulation a été effectuée tout d'abord avec de la riboflavine ce qui a conduit à la formation d'un réseau interpénétré dont les propriétés mécaniques n'ont pas été renforcées en raison de l'échauffement causé par la lampe UV. Le couple éosine Y/ la lumière visible a ensuite été testé pour la photoréticulation afin de palier à ce problème d'échauffement. Cette voie de réticulation a conduit à la formation d'un réseau hybride collagène/THA. Les propriétés mécaniques et thermiques ont été augmentées à l'issue de la photoréticulation. Ceci nous a permis de sélectionner la photoréticulation à la lumière visible comme méthode pour obtenir des hydrogels avec des propriétés physiques optimales, c'est-à-dire une structure fibrillaire, des propriétés mécaniques augmentées et une bonne stabilité thermique.

A l'issue de l'étude physicochimique, des conditions de formulation à pH 5,5 en présence de sels accompagnées d'une photoréticulation à l'éosine Y ont été sélectionnées pour l'élaboration du modèle d'Annulus Fibrosus. En plus de générer des hydrogels aux propriétés physiques optimales, il s'agit de la seule condition cytocompatible du fait du pH proche de la neutralité. Notre matériau étant voué à être cellularisé, ceci représente un critère essentiel.

Dans la seconde partie de ma thèse, nous avons démontré qu'il était possible de formuler une encre de collagène et de THA pouvant permettre l'élaboration d'un modèle d'Annulus Fibrosus par impression 3D. Deux stratégies ont été optimisées afin de générer des matériaux

performants structurellement, mécaniquement et thermiquement tout en étant non-cytotoxique. Celles-ci s'appuient sur l'utilisation d'un protocole standard et d'un protocole d'imprégnation de THA découlant de l'étude physicochimique (Partie 3). Deux encres ont été utilisées : une encre dense de collagène (30 mg. mL⁻¹) qui a été imprégnée de THA post impression et fibrillogénèse et une encre dense de collagène (30 mg. mL⁻¹) et de THA (7,5 mg. mL⁻¹) avec un ratio 4 :1 à pH 5 et 200 mM de NaCl. Les paramètres d'impression 3D de ces deux encres ont été optimisés afin qu'une lamelle anisotrope de 330 µm d'épaisseur contenant du collagène et de l'acide hyaluronique soit obtenue. En effet, l'impression de solution dense de collagène et de THA a permis d'instaurer une anisotropie du collagène par le cisaillement lors de l'extrusion qui est ensuite « figée » grâce à des conditions de gélification rapide. La cytocompatibilité des deux procédés a également été optimisée en présence de fibroblastes afin de permettre la survie cellulaire. Pour cela, les paramètres intervenant dans la fibrillogénèse du collagène et la photoréticulation du THA ont été optimisés afin de conserver plus de 80% de l'activité métabolique des fibroblastes après 1 jour de culture.

Suite à cela, les deux types de matériaux ont été cellularisés afin d'évaluer leur bioactivité et leur capacité à modéliser l'Annulus Fibrosus. Ainsi, nous avons montré sur un modèle de monocouches qu'à la fois le protocole standard utilisant l'encre collagène/THA au ratio 4 :1 et le protocole d'imprégnation reposant sur l'utilisation d'une encre de collagène dense suivi d'un bain de THA et d'éosine étaient des bons candidats pour préserver la viabilité des fibroblastes. Les fibroblastes adhèrent sur ces deux matériaux de la même manière que sur les hydrogels de collagène purs. Ils peuvent également proliférer et adopter une morphologie typique en forme de fuseaux allongés. Enfin les cellules s'alignent le long des filaments extrudés à partir du 7^{ème} jour de culture. Après 21 jours de culture, aucune migration des fibroblastes n'a été observée sur ces monocouches par histologie. Toutes ces caractéristiques ont fait que ces hydrogels de collagène/THA obtenus par deux méthodes différentes étaient de bons candidats pour l'élaboration du modèle d'AF.

La seconde étape a été de générer des sandwichs cellularisés composés de fibroblastes cultivés pendant 14 jours entre deux lamelles d'hydrogels pour mimer l'environnement tridimensionnel des cellules *in vivo*. La procédure d'impression 3D est délicate puisqu'elle repose sur le dépôt cellulaire à la surface de la première couche suivi de l'impression d'une seconde couche au-dessus des cellules qui ont adhéré à l'hydrogel que 30 min. Les facteurs intervenant dans le procédé sont des sources potentielles de stress cellulaire et donc de mortalité. Nous sommes parvenus à générer des sandwichs pour les deux types de protocoles. Néanmoins, une meilleure praticité ainsi que de meilleurs résultats en termes de viabilité cellulaire, de prolifération, de morphologie ainsi que d'alignement le long des filaments anisotropes d'hydrogels ont été obtenus pour le protocole standard comparé au protocole d'imprégnation.

Notre modèle d'Annulus Fibrosus repose sur l'utilisation d'une encre dense homogène collagène/THA formulée avec de l'éosine et du sel à pH 5. L'impression de matrices composées de deux couches entre lesquelles des cellules de type fibroblastes sont confinées a été réalisée. Ce nouveau modèle possède une viabilité cellulaire excellente accompagnée d'une prolifération cellulaire plus importante que pour les contrôles de collagène. Ceci atteste de la bioactivité du matériau et en fait un bon support pour les fibroblastes. L'anisotropie générée par le procédé d'impression 3D s'avère essentielle pour guider l'alignement des fibroblastes le long de ces filaments comme c'est le cas dans l'AF. Il nous reste à confirmer que de la MEC a bien été sécrétée par les fibroblastes confinés dans notre biomatériau même si cela semble visible par un suivi rhéologique des propriétés mécaniques. Finalement, un seul objectif n'a pas été atteint. Les propriétés mécaniques de ce nouveau modèle restent insuffisantes. En effet, un module en cisaillement de seulement 2 kPa est atteint après 14 jours de culture sur les sandwichs à deux couches cellularisés alors que celui de l'AF natif est compris entre 100 et 280 kPa soit plus de 100 fois plus important que le nôtre. Néanmoins, le cisaillement n'étant pas le mode préférentiel d'étude des propriétés mécaniques des modèles d'AF, il serait plus judicieux de mesurer le module d'Young en traction afin de comparer notre système au tissu natif.

Plusieurs stratégies peuvent être mises en place afin d'améliorer les propriétés mécaniques. Nous pourrions par exemple monter en concentration ne serait-ce qu'à 40 mg.mL⁻¹ en collagène tout en gardant un ratio 4 :1. A ce moment-là, il serait nécessaire d'optimiser une nouvelle fois les paramètres d'impression 3D tels que la pression d'extrusion et la vitesse de dépôt. La concentration pourrait être augmentée au-delà de 40 mg.mL⁻¹ mais la viscosité de l'encre serait telle que l'imprimabilité en serait considérablement diminuée. L'utilisation d'un deuxième agent de réticulation pourrait aussi être utilisé pour renforcer le réseau.

Le module d'Young du tissu natif repose sur l'empilement de 15 à 20 lamelles orientées à 60° les unes par rapport aux autres. C'est pourquoi il serait judicieux de reproduire notre procédé pour 10 voire 15 couches pour que cela se rapproche des conditions natives et que les propriétés mécaniques mesurées soient vraiment comparables. Des essais de traction et de compression pourraient alors être judicieux pour reproduire les mêmes types de sollicitation complexes que pour l'Annulus Fibrosus.

Une autre perspective essentielle au perfectionnement de notre modèle sera d'inclure une orientation de 60° entre une couche imprimée et la suivante afin de reproduire l'agencement physiologique de l'AF. Cette sorte de contre-plaqué est largement utilisée dans le milieu des composites afin de renforcer les performances mécaniques des matériaux. Cela pourrait donc par conséquent améliorer celles de notre biomatériau en plus de mimer l'AF de manière plus exacte.

Même si notre modèle a démontré de bons résultats en termes de bioactivité, de nombreuses caractérisations restent à être approfondie afin de l'optimiser, notamment poursuivre les caractérisations mécaniques, la quantification de la porosité ainsi que de la production de MEC entre autres. Pour cela une étude de l'expression des gènes de l'AF serait à effectuer. Nous pourrions cibler l'expression du collagène I, des métalloprotéases, de l'agrécan ou encore de la ténomoduline qui est parfois décrite comme marqueur spécifique de l'AF. De plus, les fibroblastes ont été utilisés de manière préliminaire mais il est essentiel de montrer sa bioactivité avec des cellules d'AF ou alors sur des cellules souches mésenchymateuses. Dans ce cas, l'impact des propriétés physiques et biochimiques de notre modèle sur la différenciation des cellules en cellules d'AF pourrait être analysé. Une fois notre modèle amélioré, il serait intéressant de le combiner au modèle de NP développé par nos collaborateurs suisses sur le projet afin de générer un modèle de disque intervertébral complet. Pour cela deux stratégies sont envisageables. La première consiste à imprimer les deux tissus de manière séparée puis de rouler le modèle d'AF autour du modèle de NP comme cela a déjà été fait pour d'autres matériaux. Néanmoins, cette stratégie a le désavantage de générer des matériaux à l'interface non cohésive qui ne reflète pas la réalité. La seconde stratégie, qui me semble plus pertinente, serait d'imprimer le modèle d'AF sous forme de lamelles concentriques. Dans un second temps, l'impression 3D du NP pourrait être conduite *in situ* à l'intérieur de l'AF suivi de sa réticulation afin de générer une interface cohésive pouvant également être réticulée avec notre matériau qui est de même composition chimique. A termes, on pourrait envisager de créer un gradient de composition entre NP et AF afin de mimer la zone de transition.

Production scientifique

1. Communications orales :

S. De Oliveira, G. Miklosic, M. D'este & C. Hélyary, « Optimized collagen/hyaluronan formulations to develop a novel biomimetic ink to synthesize composite hydrogels for tissue engineering », Polymer Network Group 2022, Rome, Italie

S. De Oliveira, G. Miklosic, M. D'este, S. Grastilleur, J. Véziers & C. Hélyary, « Anisotropic collagen/hyaluronan 3D printed hydrogels as novel model of Annulus Fibrosus », ESB 2023, Davos, Suisse

2. Posters :

S. De Oliveira, G. Miklosic, M. D'este, S. Grastilleur, J. Véziers & C. Hélyary, « Formation de complexes polyioniques collagène/acide hyaluronique pour la synthèse d'hydrogels améliorés pour de nouveaux modèles de disque intervertébral », Matériaux 2022, Lille, France

S. De Oliveira, G. Miklosic, M. D'este, S. Grastilleur, J. Véziers & C. Hélyary, « Collagen/hyaluronan polyionic complexes as a new building block to develop a novel bioink to model the intervertebral disc », ESB 2022, Bordeaux, France

3. Articles :

S. De Oliveira, G. Miklosic, J. Véziers, S. Grastilleur, T. Coradin, C. Le Visage, M. D'este & C. Hélyary, « Optimizing the physical properties of collagen/hyaluronan hydrogels by inhibition of polyionic complexes formation at pH close to the collagen isoelectric point », **International Journal of Biological Macromolecules**, soumis, en révision, 2023

Article soumis à « International Journal of Biological Macromolecules »

1 **Optimizing the physical properties of collagen/hyaluronan**
2 **hydrogels by inhibition of polyionic complexes formation at pH**
3 **close to the collagen isoelectric point**

4
5 Stéphanie De Oliveira^a, Gregor Miklosic^b, Joëlle Veziers^c, Sébastien Grastilleur^c,
6 Thibaud Coradin^a, Catherine Le Visage^c, Matteo D'Este^b, Christophe Héлары^{a*}

7
8 ^a Laboratory of Condensed Matter Chemistry of Paris, CNRS, UMR 7574, F-75005, Paris,
9 France.

10 Stéphanie De Oliveira: stephanie.de_oliveira@sorbonne-universite.fr

11 Thibaud Coradin: thibaud.coradin@sorbonne-universite.fr

12

13 ^b AO Research Institute Davos (ARI), Clavadelerstrasse 8, 7270 Davos, Switzerland

14 Matteo D'Este: matteo.deste@aofoundation.org

15 Gregor Miklosic: gregor.miklosic@aofoundation.org

16

17 ^c Nantes Université, Oniris, INSERM, Regenerative Medicine and Skeleton, RMeS, UMR 1229,
18 F-44000 Nantes, France

19 Catherine Le Visage : catherine.levisage@inserm.fr

20 Joëlle Veziers: Joelle.Veziers@univ-nantes.fr

21 Sébastien Grastilleur: sebastien.grastilleur@univ-nantes.fr

22

23

24 * Corresponding authors: Christophe Héлары

25 Email address : christophe.helary@sorbonne-universite.fr

26 Telephone: +33144276539

27 Postal address: Sorbonne University - Campus Pierre et Marie Curie, 4 place Jussieu, 75252
28 Paris Cedex 05, France

1

29 **Abstract**

30

31 Collagen/hyaluronan hydrogels with physical properties well suited for biomedical
32 applications are challenging to synthesize due to the formation of polyionic complexes (PICs).
33 A systematic physicochemical study was thus performed to determine novel conditions to
34 inhibit the formation of collagen/hyaluronan PICs and obtain biomimetic composite
35 hydrogels. Using a range of pH from 1 to 5.5 and the addition of NaCl, type I collagen and
36 tyramine-substituted hyaluronic acid (THA) solutions were mixed and analyzed by cryo-
37 scanning electron microscopy and ATR-FTIR. PIC formation was inhibited at pH 1 without salt
38 and at pH 2.5 and 5.5 in the presence of 400 mM NaCl. Interestingly, collagen fibrils were
39 observed in solution at pH 5.5 before mixing with THA. After collagen gelling by pH increase,
40 a fibrillar collagen network was only observed when PICs were inhibited. Then, the THA gelling
41 performed by photo-crosslinking increased the rheological properties by four when hydrogels
42 were formed with collagen/THA mixtures at pH 1 or 5.5 with salt. Taken together, these results
43 show that a pH of 5.5, close to the collagen isoelectric point, enables the formation of collagen
44 fibrils in solution, inhibits the PICs formation, and allows the formation of homogenous
45 collagen/THA composite hydrogels compatible with cell survival.

46

47

48 **Keywords**

49 Collagen, hyaluronic acid, polyionic complexes, hydrogels, photocrosslinking, isoelectric
50 point.

51

52

53

54 **1. Introduction**

55 Hydrogels are promising materials for tissue engineering applications as they are highly
56 hydrated with tunable mechanical properties. In addition, they allow for the rapid diffusion of
57 nutrients and oxygen through the scaffold [1]. Last, mechanical irritation on the surrounding
58 tissues after implantation is low [2]. They can be synthesized from natural or synthetic
59 polymers that form physically or chemically crosslinked networks [3].

60 Biopolymers are of great interest in tissue engineering through their biocompatibility and
61 ability to mimic the natural cellular environment [4] [5]. Type I collagen is the main component
62 of mammalian extracellular matrices and is at the origin of the fibrous structure and resistance
63 of tissues. This protein is broadly used for biomedical applications as it is the natural support
64 for cells [6]. Collagen-based hydrogels are usually fabricated from low-concentrated (less than
65 5 mg/mL) solutions by pH increase, up to 7 to form a physical hydrogel composed of collagen
66 fibrils [7]. The main limitation of these biomaterials is their low stability in vivo, mainly due to
67 their fast degradation. In addition, the collagen network contracts under the cellular activities
68 of fibroblasts or stem cells [8,9].

69 Hyaluronic acid is a non-sulfated glycosaminoglycan naturally present in the extracellular
70 matrix. Due to its biological properties, water retention properties, and capability to be
71 chemically modified to modulate its properties, hyaluronan is broadly used in tissue
72 engineering and 3D printing. In its native form, this polysaccharide does not form hydrogels
73 [8]. To fabricate hyaluronan-based hydrogels, it is necessary to functionalize the
74 polysaccharide chain with a cross-linkable function such as Tyramine. Tyramine-substituted
75 hyaluronan (THA) gelation can be performed using several methods including enzymatic
76 (Horseradish Peroxidase/H₂O₂) or photocrosslinking. The Horse Radish Peroxidase (HRP) /
77 H₂O₂ system is an interesting candidate to control the crosslinking density and gelation kinetic.

78 In addition, the mild conditions do not produce cytotoxic by-products [2,9,10].
79 Photocrosslinking relies on the use of photoinitiators which produce reactive species upon
80 light exposure. Visible light is recognized to enable higher cell survival than UVs [11]. Eosin Y
81 used as photoinitiator can be exposed to green LED light to efficiently gel THA. At an optimized
82 concentration and exposure time, it is not cytotoxic for cells and allows fast gelation into
83 covalent networks with tunable properties [10]. The latter depends on molecular weight and
84 degree of substitution by tyramine moieties. However, cell adhesion to THA hydrogels is low
85 and it is therefore often combined with another biopolymer allowing for cell survival [12,13].
86 Collagen/hyaluronic acid composite hydrogels have been broadly studied to develop
87 biomaterials used in tissue engineering. Combining intrinsic properties of both biopolymers is
88 interesting for biomedical applications such as dermal filling, intervertebral disc regeneration,
89 cartilage and bone repair. Due to a strong interaction between positively-charged collagen
90 and negatively-charged hyaluronic acid, polyionic complexes (PICs) readily form in solution
91 [13]. These biopolymers tend to precipitate and are therefore difficult to use to generate
92 composite hydrogels. To circumvent this issue, one strategy is to form one hydrogel first and
93 then add the second biopolymer [14]. However, such an association is not always beneficial
94 to the properties of the composite hydrogel [15]. Collagen fibrillogenesis can be altered within
95 HA hydrogels and HA incorporation into collagen hydrogels can modify mechanical properties
96 [16]. Another strategy is to form a hybrid network following the chemical functionalization of
97 both collagen and HA. In this case, collagen fibrillogenesis is completely inhibited. Without
98 fibrillar structure, these materials do not reproduce the natural topography of extracellular
99 matrices. Last, both polymers can be pre-neutralized before mixing [15]. At pH 7, collagen is
100 close to neutral, thereby limiting electrostatic interactions with HA. However, the pH increase
101 triggers collagen gelling. Hence, collagen/THA solutions have to be immediately used after

4

102 mixing. As a consequence, composite materials cannot be produced by 3D printing,
103 electrospinning or spray drying that require an initial solution stable over the whole processing
104 duration, i.e tens of minutes [17,18]. A few studies investigated how to inhibit PICs formation
105 in solution. Chen et al have shown that the PICs formation could be inhibited by the addition
106 of NaCl in highly acidic conditions (pH 1) [17]. Nevertheless, no studies on hydrogels formation
107 from these acidic solutions have been conducted. Only crosslinked sponges synthesized by
108 freeze drying of acidic collagen/HA solutions have been described. In addition, no systematic
109 studies on the impact of pH and the presence of salt have been performed either.
110 In this study, we investigated polyionic complexation between collagen and tyramine
111 functionalized hyaluronic acid in order to identify conditions for its inhibition. This would allow
112 to generate homogeneous collagen/THA hydrogels with physical properties suitable for
113 biomedical application (structure and mechanical properties). For this purpose, a range of pH
114 was tested in collagen/THA mixtures followed by salt addition to evaluate the physicochemical
115 behavior of these biopolymers in solution. Then, hydrogels were formed by triggering first the
116 collagen gelling using pH increase. Then, THA gelling was carried out using the enzymatic or
117 photo-crosslinking. Last, the physical properties of the as-made collagen/THA composite
118 hydrogels were analyzed in detail.

119 2. Materials and methods

120

121 2.1. Materials

122 Hyaluronan sodium salt from Streptococcus equi with weight average Molecular Weight
123 (MW= 290 kDa) and dispersity index of 1.86 was purchased from Contipro Biotech s.r.o (Czech
124 Republic). 4-(4,6-Dimethoxy-1,3,5-triazin-2-yl)-4-methylmorpholinium chloride (DMTMM)
125 was purchased from TCI Europe N.V. (Tokyo, Japan), Tyramine hydrochloride (Tyr), hydrogen

5

126 peroxide, horseradish peroxidase, NaOH, NaCl and eosin Y were purchased from Merck
127 (France). HCl (37 %), acetic acid (99-100 %), and absolute ethanol were purchased from VWR
128 International (France). 1X PBS was obtained from Thermo Fischer Scientific.

129

130 2.2. Collagen extraction and purification

131 Type I collagen was extracted from tails of Young Wistar male rats as previously described
132 [19]. Basically, rat tails were rinsed with 70% ethanol, placed in a safety cabinet and cut in 1
133 cm sections from their extremity to extract tendons. After several rinses in 1X PBS, tendons
134 were solubilized in 500 mM acetic acid for 24 hours. Then, collagen was purified by
135 precipitation using 0.7 M NaCl. Precipitates were dissolved in a fresh 500 mM acetic acid
136 solution. Salt elimination was performed by dialysis against 500 mM acetic acid. The final
137 solution was centrifuged for 4 hours at 30000 g to remove aggregates and supernatant was
138 stored at 4 °C. The collagen concentration was determined by hydroxyproline titration [20]
139 and purity assessed by SDS-PAGE electrophoresis (MiniProtean TGX, Biorad). Finally, the
140 concentration was set to 6 mg.mL⁻¹ via evaporation under a safety cabinet. Dialysis of the
141 collagen solution was performed against different HCl solutions with concentration from 10⁻¹
142 to 10⁻⁵ M to set the pH value from 1 to 5.5.

143 2.3. Hyaluronic acid functionalization with Tyramine

144 Hyaluronan functionalization was conducted by amidation reaction of the carboxylic acid
145 moieties from HA and the amine group from Tyramine hydrochloride using DMTMM as
146 previously described [21]. For this purpose, hyaluronic acid sodium salt (2g, 5mmol carboxylic
147 groups) was dissolved overnight in 200mL of ultrapure water at a final concentration of 1 %
148 (w/v). HA solution was then warmed up to 37°C using a thermostatic oil bath. 1,38 g of

6

149 DMTMM was added to the HA solution and then a cap was set to keep the system closed. In
150 parallel, Tyramine hydrochloride (5 mmol) was dissolved in 5 mL of MilliQ water and then
151 added dropwise to the mixture. The reaction was conducted at 37 °C under stirring for 24 h.
152 The following day, 32 mL of a saturated NaCl solution was added and stirred for 30 minutes.
153 The tyramine-modified Hyaluronan (THA) precipitation was then performed by adding
154 dropwise 96 % alcohol (600 mL). The precipitate was collected by filtration under vacuum
155 using a Gooch filter P3. After several washes with 80% ethanol (500 mL), 90% ethanol (200
156 mL), 96 % ethanol (200 mL) and absolute ethanol (200 mL), the solid was spread on a glass
157 petri dish, left in the hood overnight and finally dried at 40 °C for 48h. Salt residues were
158 detected with a silver nitrate (0.1 M) and molar degree of substitution was determined using
159 by measuring absorbance at 275 nm of 0,1 % (w/v) THA solution in MilliQ water using a Cary
160 5000 UV-vis-NIR Spectrophotometer (Agilent Technologies). Standards with Tyramine
161 hydrochloride were used to calculate THA degree of functionalization in a concentration range
162 between 0 and 1000 µg/mL. THA was dissolved in different HCl solutions (10^{-1} to 10^{-5} M) to a
163 final 30 mg.mL⁻¹.

164

165 2.4. Mixtures of Collagen and THA

166 The collagen solutions (6 mg.mL⁻¹) and the THA solutions (30 mg.mL⁻¹) prepared with HCl
167 concentrations from 10^{-1} M to 10^{-5} M, with or without NaCl at 400 mM, were used for this
168 experiment. The solutions were stirred for 24h at room temperature prior to their utilization.
169 The following day, collagen (666 µL) and THA (133 µL) were mixed at a 1:1 mass ratio (w/w)
170 with a positive displacement micropipette (Gilson) and stirred for 12 h at room temperature.

171

7

172 2.5. Gelling and fibrillogenesis of collagen/THA solutions

173 Collagen fibrillogenesis and gelling of collagen/THA mixtures was triggered by pH increase. To
174 do so, 200 μL of previously prepared mixture was poured into small molds and placed under
175 ammonia vapors for 24 h. The day after, resulting hydrogels were extensively washed with
176 MilliQ water until a neutral pH was reached.

177

178 2.6. THA crosslinking within Collagen/THA hydrogels.

179 After collagen gelling, THA crosslinking was performed using two different methods to obtain
180 interpenetrated network hydrogels. (i) Enzymatic crosslinking was carried out using Horse
181 Radish Peroxidase (HRP) and Hydrogen Peroxide (H_2O_2). 100 μL of HRP/ H_2O_2 solution, ([HRP] =
182 1.5 $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$, [H_2O_2] = 1.1 mM) was quickly added to collagen/THA hydrogels. Hydrogels were
183 then incubated at room temperature on a stirring plate covered with a tin foil for 24 hours to
184 allow chemical crosslinking (formation of di-tyramine bonds.) The second method was based
185 on photocrosslinking using an eosin Y / green LED light system. Eosin Y was firstly solubilized
186 in DMSO to generate a stock solution concentrated at 200 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ and then diluted in water
187 to reach a final concentration at 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$. Collagen/THA hydrogels were immersed in an
188 Eosin Y bath (2 mL) overnight in a 24 well plate protected from the light. The following day,
189 hydrogels were removed from the eosin bath and photocrosslinked under green LED light for
190 90 min (hydrogels placed at 10 cm from the led lamp). Hydrogels were then washed
191 extensively with MilliQ water until the orange color due to the eosin presence disappeared.

192

193 2.7. Cryogenic Scanning Electron Microscopy (Cryo-SEM) analysis

194 Collagen/THA mixtures were processed for cryo-SEM using the PP3010T, QUORUM cryo
195 preparation system (Laughton, United Kingdom). For this purpose, a drop of each
196 collagen/THA mixture with or without NaCl was placed between two rivets. Then, rivets were
197 set onto a sample holder attached to a shuttle. The freezing step was performed in slush
198 nitrogen, cooled by pressure drop (9×10^{-2} mBar) to approximately -206 °C. After introduction
199 into the preparation chamber, the samples were cryo-fractured, sublimated (4 min at -100 °C),
200 and sputtered with palladium (50 s, 10 μ A).

201 The samples were then introduced into the electron microscope and positioned on the cold
202 stage (-140 °C). Observations were performed on a Gemini SEM 300, ZEISS (Oberkochen,
203 Germany) at 2 kV, 30 μ m diaphragm, using either SE2 detector positioned in the chamber or
204 SE2 detector (Inlens) positioned in the column (n=3).

205

206 2.8. ATR-FTIR analysis

207 ATR-FTIR analyses were conducted on the different collagen/THA fibrillated hydrogels to
208 identify possible interactions between collagen and THA when PICs are formed. To do so,
209 composite hydrogels were freeze-dried for 24 h in 1 mL microfuge tubes. Dried hydrogels were
210 cooled in ice and blended with a mortar. Then, they were analyzed using Attenuated Total
211 Reflectance (ATR) – FTIR method using a Perkin Elmer Spectrum 100 equipment. Samples were
212 deposited on the diamond crystal and pressed to optimize signal intensity (n=3). For each
213 spectrum, 64 scans were collected between 500 and 4000 cm^{-1} with a measure every 1 cm^{-2} .
214 For each condition, three spectra were acquired and the mean was calculated for each sample.

215

216 2.9. Differential Scanning Calorimetry (DSC)

217 DSC was conducted on collagen/THA solutions or hydrogels to measure the denaturation
218 temperature of collagen in different conditions. One mL of mixtures was freeze-dried for 24
219 hours and then rehydrated with 15 μ L of the solvent used for their synthesis (*i.e* the
220 appropriate NaCl and HCl concentrations). Regarding hydrogels, 1 mL of hydrogel was freeze-
221 dried, and 20 μ L of MilliQ water was used to rehydrate them after lyophilization. Then, 5 to
222 10 mg of rehydrated hydrogel or collagen/THA solution was placed within hermetically closed
223 aluminium pans. Samples were analyzed using a modulated DSC TA Q20 (Texas Instrument).
224 Standby temperature was set at 20°C, then increased from 10 °C to 90 °C at a heat speed of
225 10 °C.min⁻¹. Data were analyzed using TA Universal Analysis software (n=3). Denaturation
226 temperatures were calculated using the mean of triplicates for each condition.

227

228 2.10. Rheological measurements

229 Shear oscillatory measurements were performed on collagen/THA hydrogels using an Anton
230 Paar rheometer MCR302 fitted with a 7.5 mm sand-blasted parallel plate upper geometry. All
231 tests were performed at 20 °C with sweep frequency (from 0.1 to 10 Hz). Mechanical spectra,
232 namely storage G' and loss G'' moduli versus frequency, were recorded at an imposed 1%
233 strain, which corresponds to non-destructive conditions, as previously checked with an
234 amplitude sweep (data not shown). In order to test all hydrogels in the same conditions,
235 before each run, the gap between base and geometry was chosen to apply a 0.1 N positive
236 normal force on gels during measurement. At least 3 hydrogels per condition were tested.

237

238 2.11. Scanning Electron Microscopy (SEM) analysis

10

239 Collagen hydrogels were imaged using SEM before and after THA crosslinking. Hydrogels were
240 first fixed using a glutaraldehyde solution at 4% in PBS overnight, then washed three times in
241 a cacodylate 0,1 M/saccharose 0,6 M buffer (1 vol/1 vol) and dehydrated using different
242 ethanol baths with increasing concentration (from 50 % to 100 %). Last, samples were dried
243 using a super critical dryer (Leica). Dried samples were then scratched, stuck onto holders and
244 sputtered with a 15 nm gold layer (n=3). Observations were carried out with a Hitachi S-3400N
245 SEM operating at 10 kV with a probe current around 95 μ A. Images were captured at a
246 magnification of X 20k.

247

248 2.12. Statistical analysis

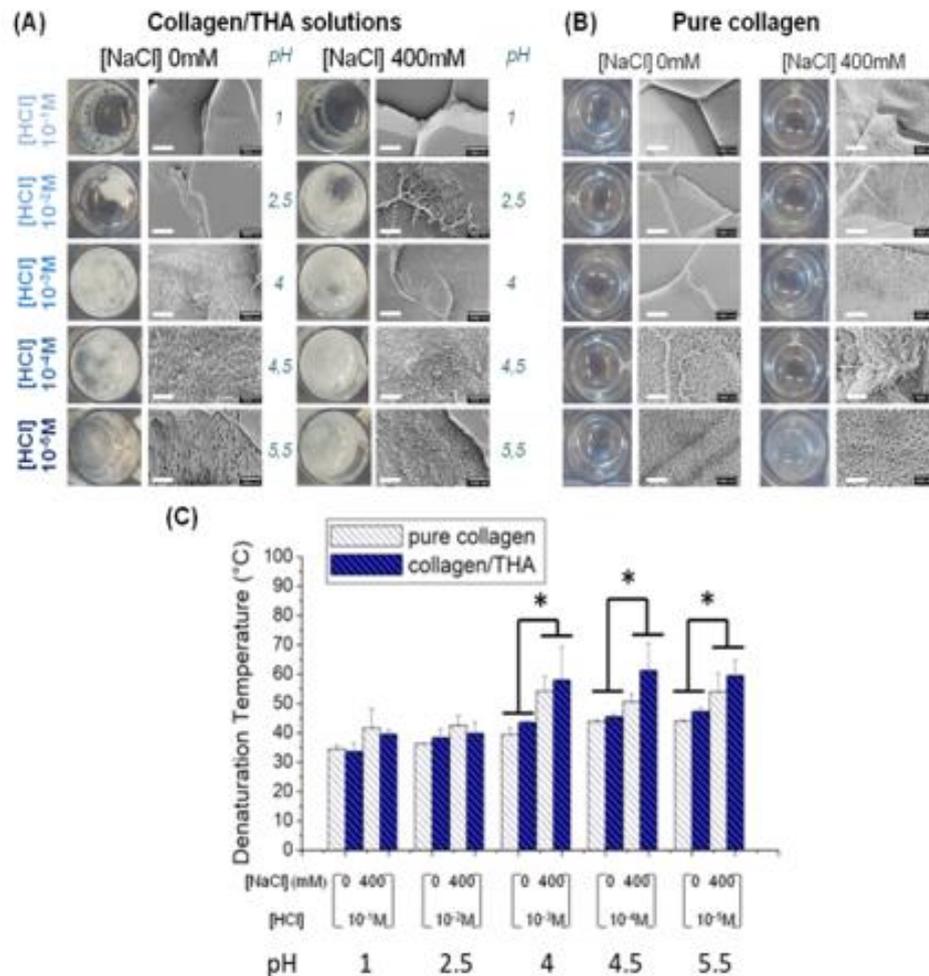
249 All experiments were carried out at least twice, and the results were expressed as mean values
250 \pm standard deviation (SD). The differences between the different formulations were analyzed
251 for each time point using Kruskal-Wallis test. Then, a Dunn Test was used as post-hoc test to
252 determine the differences between groups. A p value < 0.05 was considered significant.

253

254 3. Results and discussion

255

256 3.1. Preparation and characterization of Collagen/ THA solutions



257
 258 **Figure 1 :** (A) Collagen/THA solutions (0.4%/0.4% w/v) observed with CryoSEM (scale bar: 1 μ m) and
 259 their corresponding macroscopic views. (B) Pure collagen hydrogels observed with CryoSEM (Scale bar:
 260 1 μ m). (C) Denaturation temperatures of collagen in the different formulations measured by
 261 Differential Scanning Calorimetry (DSC). *: $p < 0.05$ ($n = 3$)
 262 Mixing THA and collagen at pH 1 generated clear and homogenous solutions (with and without
 263 salt addition) (Figure 1A). From pH 2.5 ([HCl] = $10^{-2}M$), some aggregates appeared in the

264 mixtures, characteristic of the formation of polyionic complexes (PICs). Aggregates were
265 cohesive in the form of compact blocks (Figure 1A). PICs were still visible when the pH was
266 increased up to 5.5. The addition of 400 mM NaCl weakened the PICs cohesion as blocks
267 became granular suspensions (Figure 1A). Surprisingly, pure collagen solutions at pH 5.5 also
268 exhibited a milky aspect with or without salt addition. (Figure 1B).

269 The analysis of collagen/THA solutions by cryo-scanning microscopy revealed sheet-like
270 ultrastructure for the mixtures at pH 1, 2.5 and 4, regardless of the addition of NaCl. At pH 4.5
271 and 5.5, numerous fibrils appeared in the collagen/THA solutions (Figure 1A). Fibrils were also
272 visible in pure collagen solutions at the same pHs, suggesting they were present before mixing.
273 The thermal stability of collagen was analyzed within the mixtures by DSC. The collagen
274 denaturation temperature was not significantly modified in the presence of THA but it was
275 influenced by the presence of NaCl. At pH 1, the denaturation temperature was around 37°C
276 which is similar to that of collagen in acetic acid (Figure 1C). From pH 2.5, the denaturation
277 temperature of collagen in mixtures slightly increased to reach around 40°C at pH 4. At this
278 pH, the addition of 400 mM of NaCl dramatically increased the collagen denaturation
279 temperature up to around 55°C. The same phenomenon was observed for mixtures at pH 4.5
280 and 5.5 with salt (Figure 1C). Interestingly, the same denaturation temperature was measured
281 for pure collagen solutions prepared with 400 mM NaCl from pH 4 to 5.5 (Figure 1C).

282 The observation of a homogenous solution at pH 1 shows that the PICs formation was
283 inhibited in high acidic conditions as previously reported [13]. Carboxylic acid moieties on THA
284 have a pKa around 2.5-3 [22]. Hence, below this pH value, carboxylic acids are protonated,
285 resulting in a neutralization of the macromolecular chain. This neutrality drastically decreases
286 the electrostatic attractions between collagen and hyaluronic acid, thereby preventing
287 complexation. From pH 2.5 without salt, PICs appeared which could be attributed to a strong

288 interaction between positively charged collagen and THA, negatively charged at this pH. The
289 addition of NaCl screened the charges on biopolymer's chains and inhibits the PICs cohesion
290 [17]. At pH 4, the addition of NaCl was not sufficient to prevent this complexation. However,
291 NaCl might contribute to weaken PICs formation by increasing ionic strength in the
292 macromolecular mixture and partially screened electrostatic attractions between
293 biopolymers. For pH 4 and above in presence of salt, the temperature of denaturation
294 increased up to 55°C for pure collagen solutions and collagen/THA mixtures, which is the value
295 for collagen fibrils. This suggests that collagen fibrillogenesis occurred in collagen solutions
296 prior to mixing. Cryo-SEM confirms this hypothesis as fibrils were visible in pure collagen
297 solutions and mixes at pH 4.5 and 5.5. The isoelectric point of collagen being around 6, the
298 presence of fibrils in these solutions is justified [23,24]. It was previously shown that the self-
299 assembly of collagen into fibrils occurs at lower pH, however it leads to immature fibrils with
300 an inferior stability and small size [7]. The self-assembly of collagen into fibrils also occurred
301 at pH 4.5 and 5.5 without salt but the denaturation temperature was lower (around 45°C).
302 This indicates that the presence of salt allowed an appropriate fibrillogenesis and stabilized
303 fibrils thanks to the adequate ionic strength. As the collagen fibril surface is quasi neutral, this
304 could limit its interaction with THA [7]. Hence, the addition of salts prevents PIC's formation
305 at very acid pH (2.5) due to charge screening and at high pH (from 4.5) thanks to the formation
306 of collagen fibrils in solution.

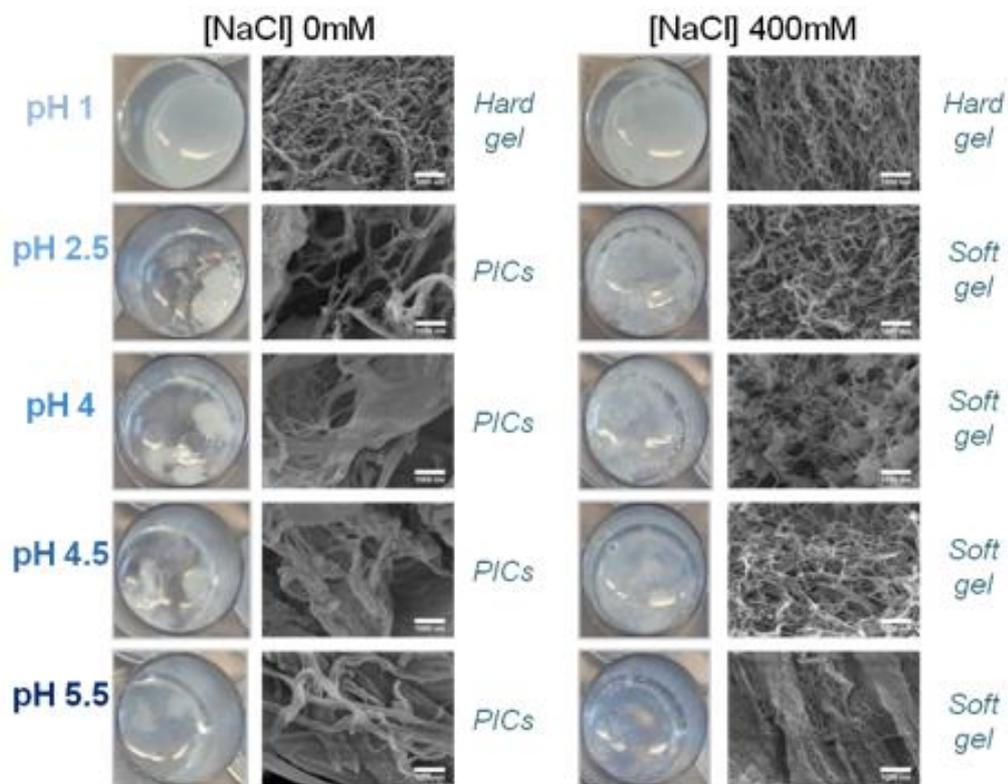
307 Taguchi and collaborators have shown PICs formation can be inhibited in the presence of salt
308 with 400mM NaCl as the optimal salt concentration to hinder electrostatic interactions
309 between collagen and THA at low pH values [13]. Chen et al. extended this study by showing
310 a shielding transitional area around 100 mM NaCl [17]. In this transitional area, ionic strength
311 is too low to screen interactions between both biopolymers but weakens it. Therefore, PIC

312 formation depends on the balance between ionic strength and the strength of attractive

313 interactions between collagen and THA.

314

315 3.2. Collagen gelling and fibrillogenesis within COL/THA hydrogels



316

317 **Figure 2** : Ultrastructure of Collagen/THA hydrogels observed after collagen gelling by scanning
318 electron microscopy (scale bar: 1 μ m).

319

320 The ability of collagen/THA mixtures to gel and form collagen fibrils was investigated. For this

321 purpose, collagen fibrillogenesis and gelling were triggered by neutralization. Hard gels were

15

322 formed from collagen/THA solutions at pH 1 without or with salt (Figure 2). These gels
323 exhibited a homogenous fibrillar network (Figure 2), thereby evidencing that collagen
324 fibrillogenesis occurred properly. These hydrogels exhibited an ultrastructure similar to that
325 of pure collagen hydrogels. For collagen/THA mixtures formed at pH 2.5 to 5.5 without salt
326 addition, PICs were observed and hydrogels were not formed (Figure.2). PICs swelled during
327 the ammonia exposure, but the aggregates were still visible. These materials were populated
328 by thick fibrils or sheets, disorganized and massive (Figure.2). Despite PICs formation in
329 solution, collagen fibrils could be formed, however their morphology seems to be disturbed
330 by the presence of THA.

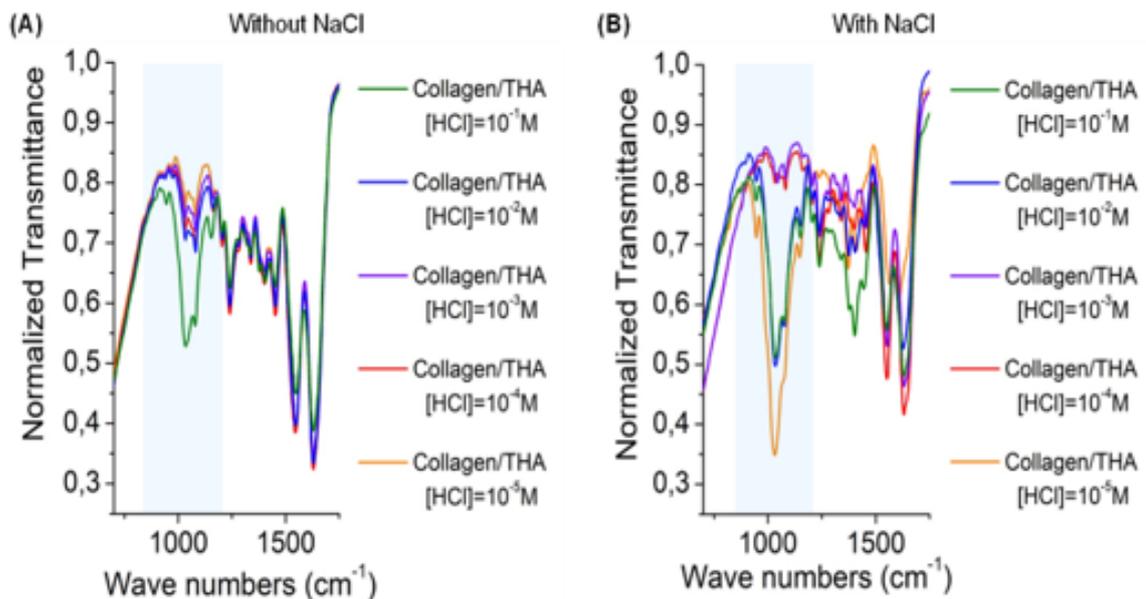
331 Chen et al previously observed this phenomenon by 2D IR mapping and reported a
332 modification in the triple helical structure of collagen due to the presence of HA at low NaCl
333 concentrations [17]. However, the expected amide I bond was visible by increasing the NaCl
334 concentration, evidencing collagen α -helical structure was recovered. Hence, collagen was
335 more prone to form fibrils. In this study, we confirm these results as individual fibrils are
336 observed when 400 mM NaCl was added to collagen/THA mixtures. In addition, soft hydrogels
337 were formed (Figure 2), suggesting that the PICs formation was limited enough to allow
338 collagen gelling.

339 In more details, for initial solutions at pH 1 and pH 2.5 with salt addition, a homogenous
340 fibrillar collagen network was visible similar to that observable in pure collagen hydrogels. For
341 mixtures at pH 4, fibrillogenesis seemed to be disturbed as small aggregates were formed
342 (Figure 2). Better defined collagen fibrils were observed in the pH 4.5 initial conditions while
343 at pH 5.5, hydrogels were populated by well defined collagen fibrils with a regular thickness.
344 Despite different structures, collagen has the same denaturation temperature around 52°C in

345 all gels, indicating that the thermal stability of fibrils was not altered by the ultrastructural
346 modifications (Supporting Information 1).

347

348



349 Figure 3: ATR-FTIR spectra of collagen/THA composite hydrogels after collagen gelling (A) without salt
350 addition (B) and with salt (zoom in the range from 750 to 1750 cm^{-1}).

351

352 The collagen/THA interactions within composite hydrogels were investigated by ATR-FTIR
353 after collagen gelling. We specifically focused on the 750-1750 cm^{-1} wavenumber range that
354 includes characteristic vibration bands of proteins (Amide I at 1650 cm^{-1} , Amide II at 1550 cm^{-1} ,
355 $\delta(\text{CH}_3)$ and $\delta(\text{CH}_2)$ between 1480 and 1350 cm^{-1} , Amide III between 1300 and 1200 cm^{-1})
356 (Supporting information 2). In this region, hyaluronan also exhibits several vibration bands at
357 1620 cm^{-1} and 1420 cm^{-1} corresponding to the carboxylate moieties (Supporting information

17

358 2). In the 1030-1080 cm^{-1} range, two peaks corresponding to d(C-O) and d(C-O-C) of
359 carbohydrate moieties observed for both polymers, but they are of high intensity in THA and
360 of low intensity in acidic collagen (Supporting information 2). In the absence of salt, these
361 peaks are observed in this range for composite hydrogels synthesized from solutions at pH 1
362 (Figure 3A). This is in good agreement with the fact that this is the only condition where the
363 collagen gelling and fibrillogenesis occur without PICs formation (Figure 3A). In parallel, the
364 similarity between all other spectra for solutions at higher pHs suggest that the formed PICs
365 share a common chemical structure (Figure 3A).

366 In contrast, in the presence of salts, spectra show important variations with initial pH (Figure
367 3B). This would point out that, despite the fact that the final pH is the same for all conditions,
368 the presence of the salt in the solutions leads to distinct chemical structures after gel
369 formation. This should reflect that pH conditions have a strong influence on the protonation
370 state of the charged moieties of both polymers but also on their conformation (Figure 3B).
371 Similar to conditions without salts, the peaks in the 1030-1080 cm^{-1} range drastically
372 decreased when the PICs were observed, suggesting the strong interaction with collagen
373 modified the vibration of carbohydrate moieties. At pH 2.5 with NaCl addition, these peaks
374 were visible, suggesting THA was in a free form. This shows that PICs are no longer formed in
375 these conditions and confirms that the addition of salt screens the charges to prevent their
376 formation [17]. At pH 4 and 4.5, the spectra resemble those obtained without salt addition
377 when the PICs are present (Figure 3B). At pH 5.5, the peaks in the 1030-1080 cm^{-1} range were
378 observed, suggesting collagen/THA interactions are weak at a pH close to the collagen
379 isoelectric point.

380 To summarize, well-fibrillated collagen networks were formed where PICS formation could be
381 avoided, *i.e.* at low pH thanks to the screening of polymers charge and at high pH where
382 collagen fibrillogenesis occurs before HA addition.

383 Usually, biomaterials synthesized from stable collagen/THA solution without the presence of
384 PICS are sponges and not hydrogels [17]. Other studies have been carried to form
385 homogeneous collagen/HA hydrogels but they do not take into account the complexation
386 phenomenon [15,25]. These systems were homogeneous due to the specific conditions.
387 Actually, gelation was conducted at cold temperature with a pre-neutralization of collagen
388 concomitant to the THA gelling by enzymatic crosslinking [15]. Cold temperature only slows
389 down gelling of neutralized collagen. As a consequence, it is impossible to use this formulation
390 to develop a homogenous ink for 3D printing or electrospinning as the gelling is not
391 controllable or tunable.

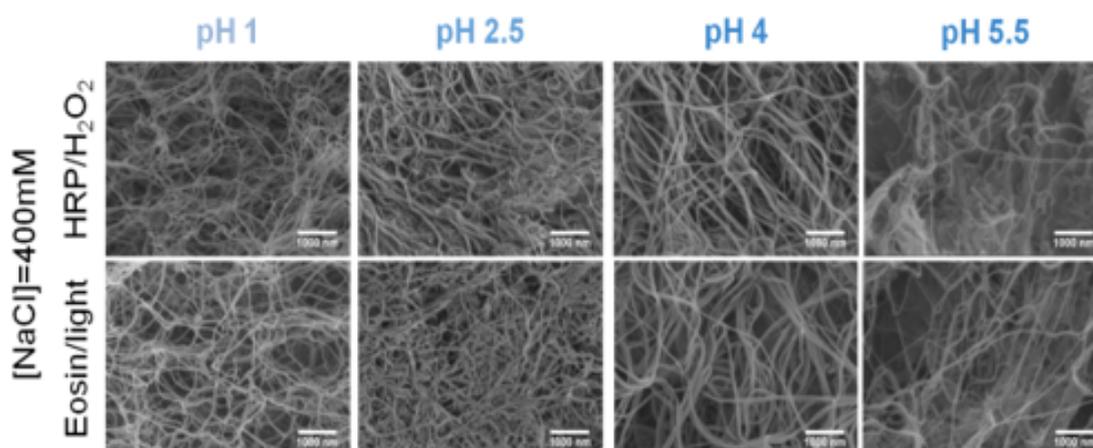
392

393 3.3. THA gelling by enzymatic or photocrosslinking

394 Subsequently to the collagen gelation, THA crosslinking was performed to form the
395 hyaluronan network. The efficacy of photocrosslinking (using eosin Y and green led light) was
396 investigated and compared to enzymatic crosslinking using HRP/H₂O₂. The final goal was to
397 create a double network and reinforce the collagen/THA hydrogel structure. The impact of
398 THA crosslinking on the collagen network was studied through SEM observations (Figure 4).
399 Only the conditions which allow the formation of homogenous hydrogels, *i.e* in presence of
400 400 mM NaCl, are presented on Figure 4. The THA crosslinking did not impact the
401 collagen/THA hydrogel ultrastructure as a homogeneous fibrillar network was observed
402 regardless of the HCl concentration considered. This ultrastructure resembled that of pure

19

403 collagen hydrogels. Hence, the formation of di-tyramine bonds of the THA network does not
404 modify the collagen ultrastructure. The porosity seems to be large enough and the interaction
405 between both biopolymers small enough to generate an interpenetrating network.



406

407 **Figure 4:** Ultrastructure of collagen/THA hydrogels from solutions with salt after enzymatic crosslinking or
408 photocrosslinking (scale bar: 1 μ m).

409

410 The collagen thermal stability was investigated after THA crosslinking. The denaturation
411 temperature was affected by the crosslinking method as shown in Figure 5A. Regarding the
412 enzymatic crosslinking by HRP/H₂O₂, collagen in composite hydrogels underwent
413 denaturation at around 53 °C, *i.e* the same denaturation temperature found in pure collagen
414 hydrogels. This suggests that the formation of the THA gel did not stabilize or destabilize
415 collagen and no covalent bonds were formed between both polymers. In the composites
416 photocrosslinked by green light, the collagen denaturation temperature increased up to 62 °C
417 (Figure 5A). This increase means that photocrosslinking stabilized the collagen network and

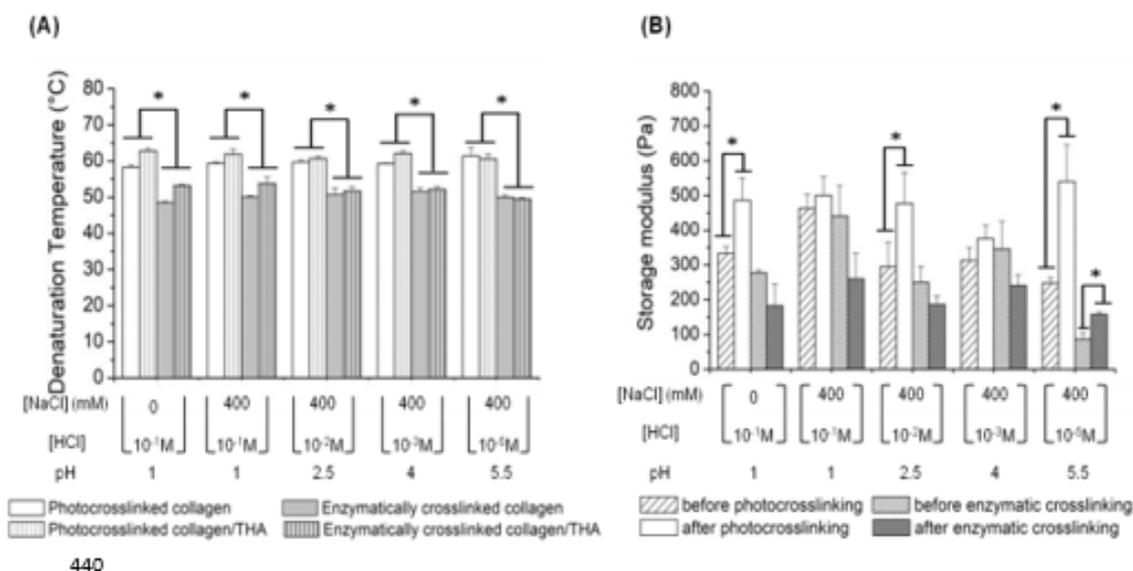
20

418 reinforced it. Since collagen has tyrosine in its sequence [26], amino acid similar to tyramine,
419 a hybrid network could be formed using photocrosslinking. Besides the Tyramine/Tyramine
420 bonds forming the THA network, a hybrid network could be generated by the formation of
421 Tyramine/Tyrosine bonds. In addition, the collagen network could also be reinforced by the
422 creation of Tyrosine/Tyrosine bonds between two collagen fibrils. Altogether, this could
423 explain the higher denaturation temperature measured in photocrosslinked collagen/THA
424 hydrogels. This hypothesis is supported by the increase in denaturation temperature up to
425 59°C in pure collagen hydrogel after photocrosslinking, indicating fibrils were stabilized
426 possibly through new Tyrosine/Tyrosine covalent bonds [27,28]. The difference of collagen
427 denaturation temperature between pure and Collagen/THA hydrogels could be due to the
428 formation of supplementary Tyrosine/Tyramine bounds.

429 Rheological analysis revealed a decrease of storage modulus after enzymatic crosslinking in all
430 conditions except for 10^{-5} M HCl (pH 5.5) (Figure 5B). Hence, HRP/H₂O₂ was inefficient to
431 trigger THA network formation after collagen gelling and altered the hydrogel mechanical
432 properties. The absence of THA network formation could be due to the weak diffusion of HRP
433 within the fibrillated collagen network. Besides, the drop in mechanical properties may reflect
434 partial depolymerization of THA induced by H₂O₂ [29]. The slight increase observed for 10^{-5} M
435 HCl in the presence of salt could be attributed to the preformed fibrils in the solution.
436 Consequently, fewer collagen molecules are available to form a gel, and the porosity could be
437 higher. Then, the HRP diffusion could be facilitated.

438

439



440

441 Figure 3 : (A) Collagen denaturation temperature of fibrillated hydrogels before and after THA
 442 crosslinking analyzed by DSC (B) Storage modulus of fibrillated hydrogels before and after THA
 443 crosslinking measured by rheometry. *: $p < 0.05$ ($n=3$).

444

445 Enzymatic crosslinking using HRP/ H_2O_2 hydrogels has previously been investigated on
 446 collagen/THA [25]. HRP was found effective in these systems because crosslinking was
 447 triggered during the co-gelation of pre-neutralized THA and collagen mixtures. In these
 448 conditions, no polyionic complexes were formed but the gelling was fast and not controllable
 449 after neutralization.

450 The storage modulus increased after photocrosslinking using Eosin Y and green light. Unlike
 451 HRP, eosin is a small molecule, thus it can easily diffuse within the collagen fibrillary network
 452 to the THA molecules. The condition for which the storage modulus gain was the highest were
 453 was at pH 5.5 with salt (10^{-5} M HCl) as the storage modulus doubled. This is correlated to the

22

454 inhibition of PICs and the formation of homogenous gels. Since tyrosine amino acids are
455 located at the fibril surface [30], covalent bonds could be formed between collagen fibrils or
456 with THA, as previously mentioned. These crosslinkings would reinforce the polymeric
457 structure and could explain the increase of mechanical properties. Therefore,
458 photocrosslinking seems to be the optimal way to crosslink THA since it promotes the best
459 structural, thermal and mechanical properties to the as-obtained hydrogel.

460 To fabricate composite hydrogels, several strategies have been tested. To obtain homogenous
461 hydrogels, with suitable physical properties, polyionic complexation has to be inhibited
462 somehow. The most developed materials rely on the use of EDC/NHS, photocrosslinking or
463 enzymatic crosslinking of preneutralized collagen/HA solutions. This one pot technique seems
464 to be the most promising method to target a wide range in swelling and mechanical properties
465 [31–34]. However, fibrillogenesis is inhibited, thus the physiological topography cannot be
466 reproduced. In addition, the high crosslinking between polymers inhibit biological degradation
467 and water retention [15]. Last, long term procedures cannot be performed as collagen gelling
468 rapidly occurs. Hence, our novel procedure to produce collagen/THA hydrogels seems to be
469 promising for biomedical applications.

470

471

472

473 **4. Conclusion**

474 This study describes an original method to inhibit the polyionic complexation between
475 collagen and hyaluronic acid-tyramine, thereby generating homogenous and biomimetic
476 composite hydrogels. Unlike the common strategy based on the utilization of highly acidic

23

477 solutions (pH 1), it is possible to form composite hydrogels using solutions with a pH close to
478 the collagen isoelectric point (pH 5.5). In this condition, stable and mature collagen fibrils are
479 generated in solution, which can homogeneously be mixed with hyaluronic acid without
480 triggering any polyionic complexation. Subsequently, collagen gelling can be performed by pH
481 increase. The method presented is compatible with a secondary crosslinking mechanism by
482 forming di-tyramine bonds using eosin and green light to modulate composite hydrogels'
483 physical and rheological properties without altering their structure. Taken together, these
484 results show collagen and THA can be mixed at pH near physiological conditions, *i.e*
485 compatible with cells survival, then used to synthesize biomaterials for tissue engineering
486 applications.

487

488 **Acknowledgements**

489 This project has been supported by "L'Agence Nationale de la Recherche" (ANR) and the Swiss
490 National Science Foundation (SNSF): INDEED project, SNSF's grant number 310030E_189310
491 and ANR's grant number ANR-19-CE06-0028. We thank Dr. Francisco Fernandes for his helpful
492 advices.

493 **Supporting Information**

494 Supporting Information is available from XX.

495 **Declaration of competing interests**

496 The authors declare no conflict of interests relevant to this work.

497

498

- 501 [1] S. Ullah, X. Chen, Fabrication, applications and challenges of natural biomaterials in tissue
502 engineering, *Applied Materials Today*. 20 (2020) 100656.
503 <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2020.100656>.
- 504 [2] M. Khanmohammadi, M.B. Dastjerdi, A. Ai, A. Ahmadi, A. Godarzi, A. Rahimi, J. Ai, Horseradish
505 peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications, *Biomater. Sci.* 6 (2018) 1286–
506 1298. <https://doi.org/10.1039/C8BM00056E>.
- 507 [3] H. Chamkouri, A Review of Hydrogels, Their Properties and Applications in Medicine, *AJBSR*. 11
508 (2021) 485–493. <https://doi.org/10.34297/AJBSR.2021.11.001682>.
- 509 [4] T. Biswal, Biopolymers for tissue engineering applications: A review, *Materials Today:*
510 *Proceedings*. 41 (2021) 397–402. <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.09.628>.
- 511 [5] S. Van Vlierberghe, P. Dubruel, E. Schacht, Biopolymer-Based Hydrogels As Scaffolds for Tissue
512 Engineering Applications: A Review, *Biomacromolecules*. 12 (2011) 1387–1408.
513 <https://doi.org/10.1021/bm200083n>.
- 514 [6] K.E. Kadler, C. Baldock, J. Bella, R.P. Boot-Handford, Collagens at a glance, *Journal of Cell*
515 *Science*. 120 (2007) 1955–1958. <https://doi.org/10.1242/jcs.03453>.
- 516 [7] F. Gobeaux, G. Mosser, A. Anglo, P. Panine, P. Davidson, M.-M. Giraud-Guille, E. Belamie,
517 Fibrillogenesis in Dense Collagen Solutions: A Physicochemical Study, *Journal of Molecular*
518 *Biology*. 376 (2008) 1509–1522. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.047>.
- 519 [8] J.A. Burdick, G.D. Prestwich, Hyaluronic Acid Hydrogels for Biomedical Applications, *Adv. Mater.*
520 23 (2011) H41–H56. <https://doi.org/10.1002/adma.201003963>.
- 521 [9] R. Wang, X. Huang, B. Zoetebier, P.J. Dijkstra, M. Karperien, Enzymatic co-crosslinking of star-
522 shaped poly(ethylene glycol) tyramine and hyaluronic acid tyramine conjugates provides elastic
523 biocompatible and biodegradable hydrogels, *Bioactive Materials*. 20 (2023) 53–63.
524 <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.05.020>.
- 525 [10] D. Petta, D.W. Grijpma, M. Alini, D. Eglin, M. D'Este, Three-Dimensional Printing of a Tyramine
526 Hyaluronan Derivative with Double Gelation Mechanism for Independent Tuning of Shear
527 Thinning and Postprinting Curing, *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4 (2018) 3088–3098.
528 <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00416>.
- 529 [11] A. Zennifer, S. Manivannan, S. Sethuraman, S.G. Kumbar, D. Sundaramurthi, 3D bioprinting and
530 photocrosslinking: emerging strategies & future perspectives, *Biomaterials Advances*. 134
531 (2022) 112576. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112576>.
- 532 [12] C. Loebel, S.E. Szczesny, B.D. Cosgrove, M. Alini, M. Zenobi-Wong, R.L. Mauck, D. Eglin, Cross-
533 Linking Chemistry of Tyramine-Modified Hyaluronan Hydrogels Alters Mesenchymal Stem Cell
534 Early Attachment and Behavior, *Biomacromolecules*. 18 (2017) 855–864.
535 <https://doi.org/10.1021/acs.biomac.6b01740>.
- 536 [13] T. Taguchi, T. Ikoma, J. Tanaka, An improved method to prepare hyaluronic acid and type II
537 collagen composite matrices, *J. Biomed. Mater. Res.* 61 (2002) 330–336.
538 <https://doi.org/10.1002/jbm.10147>.
- 539 [14] Q. Xu, J.E. Torres, M. Hakim, P.M. Babiak, P. Pal, C.M. Battistoni, M. Nguyen, A. Panitch, L.
540 Solorio, J.C. Liu, Collagen- and hyaluronic acid-based hydrogels and their biomedical
541 applications, *Materials Science and Engineering: R: Reports*. 146 (2021) 100641.
542 <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100641>.
- 543 [15] A. Frayssinet, D. Petta, C. Illoul, B. Haye, A. Markitantova, D. Eglin, G. Mosser, M. D'Este, C.
544 H elary, Extracellular matrix-mimetic composite hydrogels of cross-linked hyaluronan and
545 fibrillar collagen with tunable properties and ultrastructure, *Carbohydrate Polymers*. 236 (2020)
546 116042. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116042>.
- 547 [16] S.T. Kreger, S.L. Voytik-Harbin, Hyaluronan concentration within a 3D collagen matrix
548 modulates matrix viscoelasticity, but not fibroblast response, *Matrix Biology*. 28 (2009) 336–
549 346. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2009.05.001>.

- 550 [17] S. Chen, Q. Zhang, T. Nakamoto, N. Kawazoe, G. Chen, Highly active porous scaffolds of collagen
551 and hyaluronic acid prepared by suppression of polyion complex formation, *J. Mater. Chem. B.*
552 *2* (2014) 5612–5619. <https://doi.org/10.1039/C4TB00780H>.
- 553 [18] E. Łyszczarz, W. Brniak, J. Szafraniec-Szczęsny, T.M. Majka, D. Majda, M. Zych, K. Pielichowski,
554 R. Jachowicz, The Impact of the Preparation Method on the Properties of Orodispersible Films
555 with Aripiprazole: Electrospinning vs. Casting and 3D Printing Methods, *Pharmaceutics*. *13*
556 (2021) 1122. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13081122>.
- 557 [19] M. Camman, P. Joanne, J. Brun, A. Marcellan, J. Dumont, O. Agbulut, C. H elary, Anisotropic
558 dense collagen hydrogels with two ranges of porosity to mimic the skeletal muscle extracellular
559 matrix, *Biomaterials Advances*. *144* (2023) 213219.
560 <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213219>.
- 561 [20] Imanuel. Bergman, Roy. Loxley, Two Improved and Simplified Methods for the
562 Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline., *Anal. Chem.* *35* (1963) 1961–1965.
563 <https://doi.org/10.1021/ac60205a053>.
- 564 [21] C. Loebel, M. D’Este, M. Alini, M. Zenobi-Wong, D. Eglin, Precise tailoring of tyramine-based
565 hyaluronan hydrogel properties using DMTMM conjugation, *Carbohydrate Polymers*. *115*
566 (2015) 325–333. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.097>.
- 567 [22] M. Brown, S. Jones, Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs
568 to the skin, *J Eur Acad Dermatol Venerol.* *19* (2005) 308–318. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x>.
- 570 [23] J.M. Cassel, J.R. Kanagy, Studies on the purification of collagen, *J. RES. NATL. BUR. STAN.* *42*
571 (1949) 557. <https://doi.org/10.6028/jres.042.047>.
- 572 [24] S.-H. Park, T. Song, T.S. Bae, G. Khang, B.H. Choi, S.R. Park, B.-H. Min, Comparative analysis of
573 collagens extracted from different animal sources for application of cartilage tissue
574 engineering, *Int. J. Precis. Eng. Manuf.* *13* (2012) 2059–2066. <https://doi.org/10.1007/s12541-012-0271-4>.
- 575 [25] A. Schwab, C. H elary, R.G. Richards, M. Alini, D. Eglin, M. D’Este, Tissue mimetic hyaluronan
576 bioink containing collagen fibers with controlled orientation modulating cell migration and
577 alignment, *Materials Today Bio.* *7* (2020) 100058.
578 <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100058>.
- 580 [26] J.H. Bowes, R.H. Kenten, The amino-acid composition and titration curve of collagen,
581 *Biochemical Journal.* *43* (1948) 358–365. <https://doi.org/10.1042/bj0430358>.
- 582 [27] M.E. Carnes, C.R. Gonyea, R.G. Mooney, J.W. Njihia, J.M. Coburn, G.D. Pins, Horseradish
583 Peroxidase-Catalyzed Crosslinking of Fibrin Microthread Scaffolds, *Tissue Engineering Part C: Methods*. *26* (2020) 317–331. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2020.0083>.
- 584 [28] X. Zhang, S. Xu, L. Shen, G. Li, Factors affecting thermal stability of collagen from the aspects of
585 extraction, processing and modification, *J Leather Sci Eng.* *2* (2020) 19.
586 <https://doi.org/10.1186/s42825-020-00033-0>.
- 587 [29] K. Yamazaki, K. Fukuda, M. Matsukawa, F. Hara, K. Yoshida, M. Akagi, H. Munakata, C.
588 Hamanishi, Reactive oxygen species depolymerize hyaluronan: involvement of the hydroxyl
589 radical, *Pathophysiology.* *9* (2003) 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0928-4680\(03\)00024-5](https://doi.org/10.1016/S0928-4680(03)00024-5).
- 590 [30] M. Gauza-Włodarczyk, L. Kubisz, D. Włodarczyk, Amino acid composition in determination of
591 collagen origin and assessment of physical factors effects, *International Journal of Biological Macromolecules*. *104* (2017) 987–991. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.013>.
- 592 [31] Network of Excellence in Functional Biomaterials, National University of Ireland, Galway,
593 Ireland, L. Calderon, E. Collin, D. Velasco-Bayon, M. Murphy, D. O’Halloran, A. Pandit, Type II
594 collagen-hyaluronan hydrogel – a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue
595 engineering, *ECM.* *20* (2010) 134–148. <https://doi.org/10.22203/eCM.v020a12>.
- 596 [32] Network of Excellence in Functional Biomaterials, National University of Ireland, Galway,
597 Ireland, L. Calderon, E. Collin, D. Velasco-Bayon, M. Murphy, D. O’Halloran, A. Pandit, Type II
598 collagen-hyaluronan hydrogel – a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue
599 engineering, *ECM.* *20* (2010) 134–148. <https://doi.org/10.22203/eCM.v020a12>.
- 600
601

- 602 [33] H. Ying, J. Zhou, M. Wang, D. Su, Q. Ma, G. Lv, J. Chen, In situ formed collagen-hyaluronic acid
603 hydrogel as biomimetic dressing for promoting spontaneous wound healing, *Materials Science*
604 *and Engineering: C*. 101 (2019) 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.093>.
- 605 [34] T. Zhang, H. Chen, Y. Zhang, Y. Zan, T. Ni, M. Liu, R. Pei, Photo-crosslinkable, bone marrow-
606 derived mesenchymal stem cells-encapsulating hydrogel based on collagen for osteogenic
607 differentiation, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 174 (2019) 528–535.
608 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2018.11.050>.
609

Références

- Acosta, F.L., Metz, L., Adkisson, H.D., Liu, J., Carruthers-Liebenberg, E., Milliman, C., Maloney, M., Lotz, J.C., 2011. Porcine intervertebral disc repair using allogeneic juvenile articular chondrocytes or mesenchymal stem cells. *Tissue Eng Part A* 17, 3045–3055. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0229>
- Adams, M.A., Roughley, P.J., 2006. What is intervertebral disc degeneration, and what causes it? *Spine (Phila Pa 1976)* 31, 2151–2161. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000231761.73859.2c>
- Albaugh, V.L., Mukherjee, K., Barbul, A., 2017. Proline Precursors and Collagen Synthesis: Biochemical Challenges of Nutrient Supplementation and Wound Healing. *J. Nutr.* jn256404. <https://doi.org/10.3945/jn.117.256404>
- Alexa Fluor™ 488 Phalloidin [WWW Document], n.d. URL <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/fr/fr/A12379> (accessed 7.21.23).
- Anselme, K., Bigerelle, M., 2011. Role of materials surface topography on mammalian cell response. *International Materials Reviews* 56, 243–266. <https://doi.org/10.1179/1743280411Y.0000000001>
- Anselme, K., Wakhloo, N.T., Rougerie, P., Pieuchot, L., 2018. Role of the Nucleus as a Sensor of Cell Environment Topography. *Advanced Healthcare Materials* 7, 1701154. <https://doi.org/10.1002/adhm.201701154>
- Arunkumar, K., Anbazhagan, V., Jhonsi, M., Renganathan, R., 2008. A Study on the Fluorescence Quenching of Eosin by certain Organic Dyes. *Zeitschrift Fur Physikalische Chemie-international Journal of Research in Physical Chemistry & Chemical Physics - Z PHYS CHEM* 222, 1013–1021. <https://doi.org/10.1524/zpch.2008.5267>
- Augello, A., De Bari, C., 2010. The Regulation of Differentiation in Mesenchymal Stem Cells. *Human Gene Therapy* 21, 1226–1238. <https://doi.org/10.1089/hum.2010.173>
- Avendano, A., Chang, J.J., Cortes-Medina, M.G., Seibel, A.J., Admasu, B.R., Boutelle, C.M., Bushman, A.R., Garg, A.A., DeShetler, C.M., Cole, S.L., Song, J.W., 2020. Integrated Biophysical Characterization of Fibrillar Collagen-Based Hydrogels. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 6, 1408–1417. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.9b01873>
- Barczyk, M., Carracedo, S., Gullberg, D., 2010. Integrins. *Cell Tissue Res* 339, 269–280. <https://doi.org/10.1007/s00441-009-0834-6>
- Bastow, E.R., Byers, S., Golub, S.B., Clarkin, C.E., Pitsillides, A.A., Fosang, A.J., 2008. Hyaluronan synthesis and degradation in cartilage and bone. *Cell. Mol. Life Sci.* 65, 395–413. <https://doi.org/10.1007/s00018-007-7360-z>
- Bavaresco, B., Comín, R., Salvatierra, N.A., Cid, M.P., 2020. Three-dimensional printing of collagen and hyaluronic acid scaffolds with dehydrothermal treatment crosslinking. *Composites Communications* 19, 1–5. <https://doi.org/10.1016/j.coco.2020.02.001>

Bergman, Imanuel., Loxley, Roy., 1963. Two Improved and Simplified Methods for the Spectrophotometric Determination of Hydroxyproline. *Anal. Chem.* 35, 1961–1965. <https://doi.org/10.1021/ac60205a053>

Bhattacharjee, M., Miot, S., Gorecka, A., Singha, K., Loparic, M., Dickinson, S., Das, A., Bhavesh, N.S., Ray, A.R., Martin, I., Ghosh, S., 2012. Oriented lamellar silk fibrous scaffolds to drive cartilage matrix orientation: Towards annulus fibrosus tissue engineering. *Acta Biomaterialia* 8, 3313–3325. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.05.023>

Bhunja, B.K., Dey, S., Bandyopadhyay, A., Mandal, B.B., 2021. 3D printing of annulus fibrosus anatomical equivalents recapitulating angle-ply architecture for intervertebral disc replacement. *Applied Materials Today* 23, 101031. <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2021.101031>

Bieberle-Hütter, A., Bronneberg, A.C., George, K., Sanden, M.C.M. van de, 2021. Operando attenuated total reflection Fourier-transform infrared (ATR-FTIR) spectroscopy for water splitting. *J. Phys. D: Appl. Phys.* 54, 133001. <https://doi.org/10.1088/1361-6463/abd435>

Bliidi, O., El Omari, N., Balahbib, A., Ghchime, R., el Menyiy, N., Ibrahim, A., Ben Kaddour, K., Bouyahya, A., Chokairi, O., Barkiyou, M., 2021. Extraction Methods, Characterization and Biomedical Applications of Collagen: a Review. *Biointerface Research in Applied Chemistry* 11, 27. <https://doi.org/10.33263/BRIAC115.1358713613>

Bradford, D.S., Cooper, K.M., Oegema, T.R., 1983. Chymopapain, chemonucleolysis, and nucleus pulposus regeneration. *J Bone Joint Surg Am* 65, 1220–1231.

Brodsky, B., Persikov, A.V., 2005. Molecular Structure of the Collagen Triple Helix, in: *Advances in Protein Chemistry*. Elsevier, pp. 301–339. [https://doi.org/10.1016/S0065-3233\(05\)70009-7](https://doi.org/10.1016/S0065-3233(05)70009-7)

Brown, M., Jones, S., 2005. Hyaluronic acid: a unique topical vehicle for the localized delivery of drugs to the skin. *J Eur Acad Dermatol Venerol* 19, 308–318. <https://doi.org/10.1111/j.1468-3083.2004.01180.x>

Buckley, C.T., Hoyland, J.A., Fujii, K., Pandit, A., Iatridis, J.C., Grad, S., 2018. Critical aspects and challenges for intervertebral disc repair and regeneration-Harnessing advances in tissue engineering. *JOR Spine* 1, e1029. <https://doi.org/10.1002/jsp2.1029>

Caliari, S.R., Harley, B.A.C., 2011. The effect of anisotropic collagen-GAG scaffolds and growth factor supplementation on tendon cell recruitment, alignment, and metabolic activity. *Biomaterials* 32, 5330–5340. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.04.021>

Camman, M., 2022. Hydrogels de collagène dense structurés par impression 3D pour modéliser la matrice extracellulaire musculaire et cardiaque dans la Dystrophie Musculaire de Duchenne (These de doctorat). Sorbonne université.

Camman, M., Joanne, P., Brun, J., Marcellan, A., Dumont, J., Agbulut, O., Hélyary, C., 2023. Anisotropic dense collagen hydrogels with two ranges of porosity to mimic the skeletal muscle extracellular matrix. *Biomaterials Advances* 144, 213219. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.213219>

Cassel, J.M., Kanagy, J.R., 1949. Studies on the purification of collagen. *J. RES. NATL. BUR. STAN.* 42, 557. <https://doi.org/10.6028/jres.042.047>

Chen, P., Ning, L., Qiu, P., Mo, J., Mei, S., Xia, C., Zhang, J., Lin, X., Fan, S., 2019. Photo-crosslinked gelatin-hyaluronic acid methacrylate hydrogel-committed nucleus pulposus-like differentiation of adipose stromal cells for intervertebral disc repair. *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine* 13, 682–693. <https://doi.org/10.1002/term.2841>

Chen, S., Zhang, Q., Nakamoto, T., Kawazoe, N., Chen, G., 2014. Highly active porous scaffolds of collagen and hyaluronic acid prepared by suppression of polyion complex formation. *J. Mater. Chem. B* 2, 5612–5619. <https://doi.org/10.1039/C4TB00780H>

Cheng, M., Zhu, G., Zhang, F., Tang, W., Jianping, S., Yang, J., Zhu, L., 2020. A review of flexible force sensors for human health monitoring. *Journal of Advanced Research* 26, 53–68. <https://doi.org/10.1016/j.jare.2020.07.001>

Chetoui, M.-A., 2017. Modélisation du comportement biomécanique du disque intervertébral (phdthesis). Ecole Centrale Marseille ; École nationale d'Ingénieurs de Monastir (Tunisie).

Chiu, C.-H., Leu, J.-D., Lin, T.-T., Su, P.-H., Li, W.-C., Lee, Y.-J., Cheng, D.-C., 2020. Systematic Quantification of Cell Confluence in Human Normal Oral Fibroblasts. *Applied Sciences* 10, 9146. <https://doi.org/10.3390/app10249146>

Choi, K.-C., Kim, J.-S., Kang, B.-U., Lee, C.D., Lee, S.-H., 2011. Changes in Back Pain After Percutaneous Endoscopic Lumbar Discectomy and Annuloplasty for Lumbar Disc Herniation: A Prospective Study. *Pain Medicine* 12, 1615–1621. <https://doi.org/10.1111/j.1526-4637.2011.01250.x>

Choy, W.J., Phan, K., Diwan, A.D., Ong, C.S., Mobbs, R.J., 2018. Annular closure device for disc herniation: meta-analysis of clinical outcome and complications. *BMC Musculoskelet Disord* 19, 290. <https://doi.org/10.1186/s12891-018-2213-5>

Chu, G., Shi, C., Wang, H., Zhang, W., Yang, H., Li, B., 2018. Strategies for Annulus Fibrosus Regeneration: From Biological Therapies to Tissue Engineering. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 6.

Chuah, Y.J., Wu, Y., Cheong, M.L.S., Chia, Y.Q., Tee, C.A., Hee, H.T., Xu, C., Kang, Y., Wang, D.-A., 2021. Development of annulus fibrosus tissue construct with hydrogel coils containing pre-conditioned mesenchymal stem cell. *Journal of Materials Science & Technology* 63, 27–34. <https://doi.org/10.1016/j.jmst.2020.03.051>

Chung, E., Keele, E.M., Miller, E.J., 1974. Isolation and Characterization of the Cyanogen Bromide 13.

Chuta Caceres, E., 2018. Impact de la rhéologie des matériaux cimentaires sur l'aspect des parements et les procédés de mise en place (These de doctorat). Paris Est.

Clouet, J., Fusellier, M., Camus, A., Le Visage, C., Guicheux, J., 2019. Intervertebral disc regeneration: From cell therapy to the development of novel bioinspired endogenous repair strategies. *Advanced Drug Delivery Reviews* 146, 306–324. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.04.017>

Collagen extraction process - ProQuest [WWW Document], n.d. URL <https://www.proquest.com/openview/a37ed8e65f92b52471e9e6ae49cbae8f/1?pq-origsite=gscholar&cbl=816390> (accessed 7.21.23).

College, O., 2013. English: Illustration from Anatomy & Physiology, Connexions Web site. <http://cnx.org/content/col11496/1.6/>, Jun 19, 2013.

Collins, M.N., Birkinshaw, C., 2013. Hyaluronic acid based scaffolds for tissue engineering—A review. *Carbohydrate Polymers* 92, 1262–1279. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.10.028>

Colombier, P., Camus, A., Lescaudron, L., Clouet, J., Guicheux, J., 2014. Intervertebral disc regeneration: a great challenge for tissue engineers. *Trends in Biotechnology* 32, 433–435. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.05.006>

Coppola, D., Oliviero, M., Vitale, G.A., Lauritano, C., D'Ambra, I., Iannace, S., de Pascale, D., 2020. Marine Collagen from Alternative and Sustainable Sources: Extraction, Processing and Applications. *Marine Drugs* 18, 214. <https://doi.org/10.3390/md18040214>

Cowman, M.K., Lee, H.-G., Schwertfeger, K.L., McCarthy, J.B., Turley, E.A., 2015. The Content and Size of Hyaluronan in Biological Fluids and Tissues. *Front. Immunol.* 6. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2015.00261>

Crock, H.V., Goldwasser, M., 1984. Anatomic studies of the circulation in the region of the vertebral end-plate in adult Greyhound dogs. *Spine (Phila Pa 1976)* 9, 702–706. <https://doi.org/10.1097/00007632-198410000-00009>

Darr, A., Calabro, A., 2009. Synthesis and characterization of tyramine-based hyaluronan hydrogels. *J Mater Sci: Mater Med* 20, 33–44. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3540-0>

Définition, causes et symptômes de la lombalgie [WWW Document], n.d. URL <https://www.ameli.fr/hauts-de-seine/assure/sante/themes/lombalgie-aigue/comprendre-lombalgie> (accessed 7.21.23).

Dickinson, P.J., Bannasch, D.L., 2020. Current Understanding of the Genetics of Intervertebral Disc Degeneration. *Frontiers in Veterinary Science* 7.

Ding, D.-C., Shyu, W.-C., Lin, S.-Z., 2011. Mesenchymal Stem Cells. *Cell Transplant* 20, 5–14. <https://doi.org/10.3727/096368910X>

Doench, I., Torres-Ramos, M., Montembault, A., Nunes de Oliveira, P., Halimi, C., Viguier, E., Heux, L., Siadous, R., Thiré, R., Osorio-Madrado, A., 2018. Injectable and Gellable Chitosan Formulations Filled with Cellulose Nanofibers for Intervertebral Disc Tissue Engineering. *Polymers* 10, 1202. <https://doi.org/10.3390/polym10111202>

Donnelly, P.E., Chen, T., Finch, A., Brial, C., Maher, S.A., Torzilli, P.A., 2017. Photocrosslinked tyramine-substituted hyaluronate hydrogels with tunable mechanical properties improve immediate tissue-hydrogel interfacial strength in articular cartilage. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 28, 582–600. <https://doi.org/10.1080/09205063.2017.1289035>

Drury, J.L., Mooney, D.J., 2003. Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials, Synthesis of Biomimetic Polymers* 24, 4337–4351. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00340-5](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00340-5)

Elliott, D.M., Setton, L.A., 2001. Anisotropic and inhomogeneous tensile behavior of the human annulus fibrosus: experimental measurement and material model predictions. *J Biomech Eng* 123, 256–263. <https://doi.org/10.1115/1.1374202>

Entekhabi, E., Haghbin Nazarpak, M., Shafieian, M., Mohammadi, H., Firouzi, M., Hassannejad, Z., 2021. Fabrication and in vitro evaluation of 3D composite scaffold based on collagen/hyaluronic acid sponge and electrospun polycaprolactone nanofibers for peripheral nerve regeneration. *J Biomed Mater Res A* 109, 300–312. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37023>

Essendoubi, M., Gobinet, C., Reynaud, R., Angiboust, J.F., Manfait, M., Piot, O., 2016. Human skin penetration of hyaluronic acid of different molecular weights as probed by Raman spectroscopy. *Skin Res Technol* 22, 55–62. <https://doi.org/10.1111/srt.12228>

Eyre, D.R., 1979. Biochemistry of the Intervertebral Disc, in: Hall, D.A., Jackson, D.S. (Eds.), *International Review of Connective Tissue Research*. Elsevier, pp. 227–291. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-363708-6.50012-6>

Ferreira, A.M., Gentile, P., Chiono, V., Ciardelli, G., 2012. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater* 8, 3191–3200. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>

Fournier, D.E., Kiser, P.K., Shoemaker, J.K., Battié, M.C., Séguin, C.A., 2020. Vascularization of the human intervertebral disc: A scoping review. *JOR SPINE* 3, e1123. <https://doi.org/10.1002/jsp2.1123>

Francisco, A.T., Mancino, R.J., Bowles, R.D., Brunger, J.M., Tainter, D.M., Chen, Y.-T., Richardson, W.J., Guilak, F., Setton, L.A., 2013. Injectable laminin-functionalized hydrogel for nucleus pulposus regeneration. *Biomaterials* 34, 7381–7388. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2013.06.038>

Fraser, J.R.E., Laurent, T.C., Laurent, U.B.G., 1997. Hyaluronan: its nature, distribution, functions and turnover. *Journal of Internal Medicine* 242, 27–33. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2796.1997.00170.x>

Frayssinet, A., 2020. Hydrogels composites collagène/acide hyaluronique cellularisés et biomimétiques pour la régénération du Nucleus Pulposus (These de doctorat). Sorbonne université.

Frayssinet, A., Petta, D., Illoul, C., Haye, B., Markitantova, A., Eglin, D., Mosser, G., D'Este, M., Héлары, C., 2020. Extracellular matrix-mimetic composite hydrogels of cross-linked hyaluronan and fibrillar collagen with tunable properties and ultrastructure. *Carbohydrate Polymers* 236, 116042. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116042>

Freemont, A.J., Watkins, A., Le Maitre, C., Jeziorska, M., Hoyland, J.A., 2002. Current understanding of cellular and molecular events in intervertebral disc degeneration: implications for therapy. *The Journal of Pathology* 196, 374–379. <https://doi.org/10.1002/path.1050>

Fricain, J.-C., De Olivera, H., Devillard, R., Kalisky, J., Remy, M., Kériquel, V., Le Nihounen, D., Grémare, A., Guduric, V., Plaud, A., L'Heureux, N., Amédée, J., Catros, S., 2017. Impression 3D en médecine régénératrice et ingénierie tissulaire. *Med Sci (Paris)* 33, 52–59. <https://doi.org/10.1051/medsci/20173301009>

Gallop, P.M., Blumenfeld, O.O., Seifter, S., 1972. Structure and metabolism of connective tissue proteins. *Annu Rev Biochem* 41, 617–672. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.41.070172.003153>

Gansau, J., Buckley, C., 2018. Incorporation of Collagen and Hyaluronic Acid to Enhance the Bioactivity of Fibrin-Based Hydrogels for Nucleus Pulposus Regeneration. *JFB* 9, 43. <https://doi.org/10.3390/jfb9030043>

Gasparini, L., Mano, J.F., Reis, R.L., 2014. Natural polymers for the microencapsulation of cells. *J R Soc Interface* 11, 20140817. <https://doi.org/10.1098/rsif.2014.0817>

Gluais, M., Clouet, J., Fusellier, M., Decante, C., Moraru, C., Dutilleul, M., Veziers, J., Lesoeur, J., Dumas, D., Abadie, J., Hamel, A., Bord, E., Chew, S.Y., Guicheux, J., Le Visage, C., 2019. In vitro and in vivo evaluation of an electrospun-aligned microfibrillar implant for Annulus fibrosus repair. *Biomaterials* 205, 81–93. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2019.03.010>

Gobeaux, F., n.d. PHASES DENSES DE COLLAGÈNE DE TYPE I:TRANSITION ISOTROPE/CHOLESTÉRIQUE, FIBRILLOGENÈSE ET MINÉRALISATION 261.

Gobeaux, F., Mosser, G., Anglo, A., Panine, P., Davidson, P., Giraud-Guille, M.-M., Belamie, E., 2008. Fibrillogenesis in Dense Collagen Solutions: A Physicochemical Study. *Journal of Molecular Biology* 376, 1509–1522. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2007.12.047>

Han, W.M., Nerurkar, N.L., Smith, L.J., Jacobs, N.T., Mauck, R.L., Elliott, D.M., 2012. Multi-scale structural and tensile mechanical response of annulus fibrosus to osmotic loading, in: *ASME 2012 Summer Bioengineering Conference, SBC 2012*. Presented at the ASME 2012 Summer Bioengineering Conference, SBC 2012, pp. 1159–1160. <https://doi.org/10.1115/SBC2012-80471>

Hanley, E.N., David, S.M., 1999. Current Concepts Review - Lumbar Arthrodesis for the Treatment of Back Pain*. *JBJS* 81, 716.

Happey, F., Johnson, A.G., Naylor, A., Turner, R.L., 1964. PRELIMINARY OBSERVATIONS CONCERNING THE FINE STRUCTURE OF THE INTERVERTEBRAL DISC. *J Bone Joint Surg Br* 46, 563–567.

Hassib, H.B., Abdel-Kader, N.S., Issa, Y.M., 2012. Kinetic Study of the Hydrolysis of Schiff Bases Derived from 2-Aminothiophenol. *J Solution Chem* 41, 2036–2046. <https://doi.org/10.1007/s10953-012-9920-6>

Hassler, O., 1969. The human intervertebral disc. A micro-angiographical study on its vascular supply at various ages. *Acta Orthop Scand* 40, 765–772. <https://doi.org/10.3109/17453676908989540>

Heary, R.F., 2001. Intradiscal Electrothermal Annuloplasty: The IDET Procedure. *Clinical Spine Surgery* 14, 353.

Heino, J., 2007. The collagen family members as cell adhesion proteins. *Bioessays* 29, 1001–1010. <https://doi.org/10.1002/bies.20636>

Heino, J., Huhtala, M., Käpylä, J., Johnson, M.S., 2009. Evolution of collagen-based adhesion systems. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 41, 341–348. <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2008.08.021>

Helary, C., Ovtracht, L., Godeau, G., Coulomb, B., Giraud Guille, M., 2005. Myofibroblasts in Dense Model Collagen Matrices: Migration, Proliferation, Apoptosis. *Wound Repair and Regeneration* 13, A20–A20. <https://doi.org/10.1111/j.1067-1927.2005.1301171.x>

Heo, J., Koh, R.H., Shim, W., Kim, H.D., Yim, H.-G., Hwang, N.S., 2016. Riboflavin-induced photo-crosslinking of collagen hydrogel and its application in meniscus tissue engineering. *Drug Deliv. and Transl. Res.* 6, 148–158. <https://doi.org/10.1007/s13346-015-0224-4>

Hohaus, C., Ganey, T.M., Minkus, Y., Meisel, H.J., 2008. Cell transplantation in lumbar spine disc degeneration disease. *Eur Spine J* 17 Suppl 4, 492–503. <https://doi.org/10.1007/s00586-008-0750-6>

Hong, B.M., Park, S.A., Park, W.H., 2019. Effect of photoinitiator on chain degradation of hyaluronic acid. *Biomater Res* 23, 21. <https://doi.org/10.1186/s40824-019-0170-1>

Horton, W.G., 1958. Further observations on the elastic mechanism of the intervertebral disc. *J Bone Joint Surg Br* 40-B, 552–557. <https://doi.org/10.1302/0301-620X.40B3.552>

Hospodiuk, M., Dey, M., Sosnoski, D., Ozbolat, I.T., 2017. The bioink: A comprehensive review on bioprintable materials. *Biotechnology Advances* 35, 217–239. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2016.12.006>

Hu, W., Wang, Z., Xiao, Y., Zhang, S., Wang, J., 2019. Advances in crosslinking strategies of biomedical hydrogels. *Biomater. Sci.* 7, 843–855. <https://doi.org/10.1039/C8BM01246F>

Humphries, J.D., Byron, A., Humphries, M.J., 2006. Integrin ligands at a glance. *Journal of Cell Science* 119, 3901–3903. <https://doi.org/10.1242/jcs.03098>

Humzah, M.D., Soames, R.W., 1988. Human intervertebral disc: Structure and function. *Anat. Rec.* 220, 337–356. <https://doi.org/10.1002/ar.1092200402>

Iatridis, J.C., Weidenbaum, M., Setton, L.A., Mow, V.C., 1996. Is the nucleus pulposus a solid or a fluid? Mechanical behaviors of the nucleus pulposus of the human intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 21, 1174–1184. <https://doi.org/10.1097/00007632-199605150-00009>

Inoue, H., Takeda, T., 1975. Three-Dimensional Observation of Collagen Framework of Lumbar Intervertebral Discs. *Acta Orthopaedica Scandinavica* 46, 949–956. <https://doi.org/10.3109/17453677508989283>

Jacobs, N.T., Smith, L.J., Han, W.M., Morelli, J., Yoder, J.H., Elliott, D.M., 2011. Effect of orientation and targeted extracellular matrix degradation on the shear mechanical properties of the annulus fibrosus. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 4, 1611–1619. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.03.016>

Jahn, M., Baynes, J.W., Spiteller, G., 1999. The reaction of hyaluronic acid and its monomers, glucuronic acid and N-acetylglucosamine, with reactive oxygen species. *Carbohydrate Research* 321, 228–234. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(99\)00186-X](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(99)00186-X)

Joshi, A., Fussell, G., Thomas, J., Hsuan, A., Lowman, A., Karduna, A., Vresilovic, E., Marcolongo, M., 2006. Functional compressive mechanics of a PVA/PVP nucleus pulposus replacement. *Biomaterials* 27, 176–184. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.06.003>

Kadler, K.E., Baldock, C., Bella, J., Boot-Handford, R.P., 2007. Collagens at a glance. *Journal of Cell Science* 120, 1955–1958. <https://doi.org/10.1242/jcs.03453>

Kadler, K.E., Hojima, Y., Prockop, D.J., 1987. Assembly of collagen fibrils de novo by cleavage of the type I pC-collagen with procollagen C-proteinase. Assay of critical concentration demonstrates that collagen self-assembly is a classical example of an entropy-driven process. *Journal of Biological Chemistry* 262, 15696–15701. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)47783-6](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)47783-6)

Kandil, K., Zaïri, Fahmi, Derrouiche, A., Messenger, T., Zaïri, Fahed, 2019. Interlamellar-induced time-dependent response of intervertebral disc annulus: A microstructure-based chemo-viscoelastic model. *Acta Biomater* 100, 75–91. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.10.005>

Kang, M.S., Kwon, M., Lee, S.Y., Lee, S.H., Jo, H.J., Kim, B., Kim, K.S., Han, D.-W., 2022. In Situ Crosslinkable Collagen-Based Hydrogels for 3D Printing of Dermis-Mimetic Constructs. *ECS J. Solid State Sci. Technol.* 11, 045014. <https://doi.org/10.1149/2162-8777/ac6897>

Kapural, L., Mekhail, N., Korunda, Z., Basali, A., 2004. Intradiscal Thermal Annuloplasty for the Treatment of Lumbar Discogenic Pain in Patients with Multilevel Degenerative Disc Disease. *Anesthesia & Analgesia* 99, 472. <https://doi.org/10.1213/01.ANE.0000133245.67491.90>

Khanmohammadi, M., Dastjerdi, M.B., Ai, A., Ahmadi, A., Godarzi, A., Rahimi, A., Ai, J., 2018. Horseradish peroxidase-catalyzed hydrogelation for biomedical applications. *Biomater. Sci.* 6, 1286–1298. <https://doi.org/10.1039/C8BM00056E>

Khunmanee, S., Jeong, Y., Park, H., 2017. Crosslinking method of hyaluronic-based hydrogel for biomedical applications. *J Tissue Eng* 8, 204173141772646. <https://doi.org/10.1177/2041731417726464>

Kim, D.H., Martin, J.T., Elliott, D.M., Smith, L.J., Mauck, R.L., 2015. Phenotypic stability, matrix elaboration and functional maturation of nucleus pulposus cells encapsulated in photocrosslinkable hyaluronic acid hydrogels. *Acta Biomaterialia* 12, 21–29. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.10.030>

Kim, J.-K., Lee, J.-S., Jung, H.-J., Cho, J.-H., Heo, J.-I., Chang, Y.-H., 2007. Preparation and Properties of Collagen/Modified Hyaluronic Acid Hydrogel for Biomedical Application. *j nanosci nanotechnol* 7, 3852–3856. <https://doi.org/10.1166/jnn.2007.047>

Knezevic, Md, PhD, N.N., Mandalia, Do, S., Raasch, Md, J., Knezevic, Md, I., Candido, K.D., 2017. Treatment of chronic low back pain – new approaches on the horizon. *JPR Volume* 10, 1111–1123. <https://doi.org/10.2147/JPR.S132769>

Knudson, C.B., 2003. Hyaluronan and CD44: Strategic players for cell-matrix interactions during chondrogenesis and matrix assembly. *Birth Defect Res C* 69, 174–196. <https://doi.org/10.1002/bdrc.10013>

Kroeber, M.W., Unglaub, F., Wang, H., Schmid, C., Thomsen, M., Nerlich, A., Richter, W., 2002. New In Vivo Animal Model to Create Intervertebral Disc Degeneration and to Investigate the Effects of Therapeutic Strategies to Stimulate Disc Regeneration: *Spine* 27, 2684–2690. <https://doi.org/10.1097/00007632-200212010-00007>

Kühn, K., 1987. The Classical Collagens: Types I, II, and III, in: *Structure and Function of Collagen Types*. Elsevier, pp. 1–42. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-481280-2.50005-2>

Kuo, J.-W., Prestwich, G.D., 2011. Hyaluronic Acid, in: *Comprehensive Biomaterials*. Elsevier, pp. 239–259. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-055294-1.00073-8>

Laffleur, F., Röggla, J., Idrees, M.A., Griessinger, J., 2014. Chemical Modification of Hyaluronic Acid for Intraoral Application. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 103, 2414–2423. <https://doi.org/10.1002/jps.24060>

Laffleur, F., Schmelzle, F., Ganner, A., Vanicek, S., 2017. In Vitro and Ex Vivo Evaluation of Novel Curcumin-Loaded Excipient for Buccal Delivery. *AAPS PharmSciTech* 18, 2102–2109. <https://doi.org/10.1208/s12249-016-0676-y>

Lai, V.K., Nedrelow, D.S., Lake, S.P., Kim, B., Weiss, E.M., Tranquillo, R.T., Barocas, V.H., 2016. Swelling of Collagen-Hyaluronic Acid Co-Gels: An In Vitro Residual Stress Model. *Ann Biomed Eng* 44, 2984–2993. <https://doi.org/10.1007/s10439-016-1636-0>

Lapčík, L., Lapčík, L., De Smedt, S., Demeester, J., Chabreček, P., 1998. Hyaluronan: Preparation, Structure, Properties, and Applications. *Chem. Rev.* 98, 2663–2684. <https://doi.org/10.1021/cr941199z>

Lavignolle, B., 2020. The Intervertebral Disc, in: Vital, J.M., Cawley, D.T. (Eds.), *Spinal Anatomy: Modern Concepts*. Springer International Publishing, Cham, pp. 207–216. https://doi.org/10.1007/978-3-030-20925-4_14

Lee, K.Y., Mooney, D.J., 2012. Alginate: properties and biomedical applications. *Prog Polym Sci* 37, 106–126. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2011.06.003>

Lim, K.S., Levato, R., Costa, P.F., Castilho, M.D., Alcalá-Orozco, C.R., van Dorenmalen, K.M.A., Melchels, F.P.W., Gawlitta, D., Hooper, G.J., Malda, J., Woodfield, T.B.F., 2018. Bio-resin for high resolution lithography-based biofabrication of complex cell-laden constructs. *Biofabrication* 10, 034101. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/aac00c>

Lombalgie. Statistique - Risques - INRS [WWW Document], n.d. URL <https://www.inrs.fr/risques/lombalgies/statistique.html> (accessed 7.21.23).

Long, R.G., Torre, O.M., Hom, W.W., Assael, D.J., Iatridis, J.C., 2016. Design Requirements for Annulus Fibrosus Repair: Review of Forces, Displacements, and Material Properties of the Intervertebral Disk and a Summary of Candidate Hydrogels for Repair. *Journal of Biomechanical Engineering* 138, 021007. <https://doi.org/10.1115/1.4032353>

Lotz, J.C., 2004. Animal Models of Intervertebral Disc Degeneration: Lessons Learned. *Spine* 29, 2742–2750. <https://doi.org/10.1097/01.brs.0000146498.04628.f9>

Malandrino, A., Lacroix, D., Hellmich, C., Ito, K., Ferguson, S.J., Noailly, J., 2014. The role of endplate poromechanical properties on the nutrient availability in the intervertebral disc. *Osteoarthritis and Cartilage* 22, 1053–1060. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2014.05.005>

Matinong, A.M.E., Chisti, Y., Pickering, K.L., Haverkamp, R.G., 2022. Collagen Extraction from Animal Skin. *Biology* 11, 905. <https://doi.org/10.3390/biology11060905>

Meyers, M.A., Chen, P.-Y., Lin, A.Y.-M., Seki, Y., 2008. Biological materials: Structure and mechanical properties. *Progress in Materials Science* 53, 1–206. <https://doi.org/10.1016/j.pmatsci.2007.05.002>

Miri, A.K., Nieto, D., Iglesias, L., Goodarzi Hosseinabadi, H., Maharjan, S., Ruiz-Esparza, G.U., Khoshakhlagh, P., Manbachi, A., Dokmeci, M.R., Chen, S., Shin, S.R., Zhang, Y.S., Khademhosseini, A., 2018. Microfluidics-Enabled Multimaterial Maskless Stereolithographic Bioprinting. *Advanced Materials* 30, 1800242. <https://doi.org/10.1002/adma.201800242>

Mohammadi, F., Mohammadi Samani, S., Tanideh, N., Ahmadi, F., 2018. Hybrid Scaffolds of Hyaluronic Acid and Collagen Loaded with Prednisolone: an Interesting System for Osteoarthritis. *Adv Pharm Bull* 8, 11–19. <https://doi.org/10.15171/apb.2018.002>

Moll, J.M., Wright, V., 1971. Normal range of spinal mobility. An objective clinical study. *Ann Rheum Dis* 30, 381–386.

Montanari, E., D'Arrigo, G., Di Meo, C., Virga, A., Coviello, T., Passariello, C., Matricardi, P., 2014. Chasing bacteria within the cells using levofloxacin-loaded hyaluronic acid nanohydrogels. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* 87, 518–523. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2014.03.003>

Moroni, L., Burdick, J.A., Highley, C., Lee, S.J., Morimoto, Y., Takeuchi, S., Yoo, J.J., 2018. Biofabrication strategies for 3D in vitro models and regenerative medicine. *Nat Rev Mater* 3, 21–37. <https://doi.org/10.1038/s41578-018-0006-y>

Morris, E.R., Rees, D.A., Welsh, E.J., 1980. Conformation and dynamic interactions in hyaluronate solutions. *Journal of Molecular Biology* 138, 383–400. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(80\)90294-6](https://doi.org/10.1016/0022-2836(80)90294-6)

Musculoskeletal health [WWW Document], n.d. URL <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/musculoskeletal-conditions> (accessed 7.21.23).

Necas, J., Bartosikova, L., Brauner, P., Kolar, J., 2008. Hyaluronic acid (hyaluronan): a review. *Vet. Med.* 53, 397–411. <https://doi.org/10.17221/1930-VETMED>

Nerurkar, N.L., Baker, B.M., Sen, S., Wible, E.E., Elliott, D.M., Mauck, R.L., 2009. Nanofibrous biologic laminates replicate the form and function of the annulus fibrosus. *Nature Mater* 8, 986–992. <https://doi.org/10.1038/nmat2558>

Nerurkar, N.L., Elliott, D.M., Mauck, R.L., 2010. Mechanical design criteria for intervertebral disc tissue engineering. *Journal of Biomechanics* 43, 1017–1030. <https://doi.org/10.1016/j.jbiomech.2009.12.001>

Nerurkar, N.L., Han, W., Mauck, R.L., Elliott, D.M., 2011. Homologous structure-function relationships between native fibrocartilage and tissue engineered from MSC-seeded nanofibrous scaffolds. *Biomaterials* 32, 461–468. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.09.015>

Nesti, L.J., Li, W.-J., Shanti, R.M., Jiang, Y.J., Jackson, W., Freedman, B.A., Kuklo, T.R., Giuliani, J.R., Tuan, R.S., 2008. Intervertebral Disc Tissue Engineering Using a Novel

Hyaluronic Acid–Nanofibrous Scaffold (HANFS) Amalgam. *Tissue Engineering Part A* 14, 1527–1537. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2008.0215>

Network of Excellence in Functional Biomaterials, National University of Ireland, Galway, Ireland, Calderon, L., Collin, E., Velasco-Bayon, D., Murphy, M., O'Halloran, D., Pandit, A., 2010. Type II collagen-hyaluronan hydrogel – a step towards a scaffold for intervertebral disc tissue engineering. *eCM* 20, 134–148. <https://doi.org/10.22203/eCM.v020a12>

Newell, N., Little, J., Christou, A., Adams, M., Adam, C., Masouros, S., 2017. Biomechanics of the human intervertebral disc: A review of testing techniques and results. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials* 69, 420–434. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2017.01.037>

Nikitovic, D., Kouvidi, K., Karamanos, N.K., Tzanakakis, G.N., 2013. The Roles of Hyaluronan/RHAMM/CD44 and Their Respective Interactions along the Insidious Pathways of Fibrosarcoma Progression. *BioMed Research International* 2013, 1–12. <https://doi.org/10.1155/2013/929531>

Noble, P.W., 2002. Hyaluronan and its catabolic products in tissue injury and repair. *Matrix Biology* 21, 25–29. [https://doi.org/10.1016/S0945-053X\(01\)00184-6](https://doi.org/10.1016/S0945-053X(01)00184-6)

Noreen, R., 2011. FTIR imaging of collagens in gliomas (These de doctorat). Bordeaux 1.

Noshchenko, A., Hoffecker, L., Lindley, E.M., Burger, E.L., Cain, C.M.J., Patel, V.V., 2015. Long-term Treatment Effects of Lumbar Arthrodeses in Degenerative Disk Disease. *Journal of Spinal Disorders and Techniques* 28, E493–E521. <https://doi.org/10.1097/BSD.0000000000000124>

Ortega, N., Werb, Z., 2002. New functional roles for non-collagenous domains of basement membrane collagens. *Journal of Cell Science* 115, 4201–4214. <https://doi.org/10.1242/jcs.00106>

Parisi, C., Qin, K., Fernandes, F.M., 2021. Colonization versus encapsulation in cell-laden materials design: porosity and process biocompatibility determine cellularization pathways. *Phil. Trans. R. Soc. A* 379, 20200344. <https://doi.org/10.1098/rsta.2020.0344>

Park, S.-H., Song, T., Bae, T.S., Khang, G., Choi, B.H., Park, S.R., Min, B.-H., 2012. Comparative analysis of collagens extracted from different animal sources for application of cartilage tissue engineering. *Int. J. Precis. Eng. Manuf.* 13, 2059–2066. <https://doi.org/10.1007/s12541-012-0271-4>

Parker, S.L., Grahovac, G., Vukas, D., Vilendecic, M., Ledic, D., McGirt, M.J., Carragee, E.J., 2016. Effect of an Annular Closure Device (Barricaid) on Same-Level Recurrent Disk Herniation and Disk Height Loss After Primary Lumbar Discectomy: Two-year Results of a Multicenter Prospective Cohort Study. *Clin Spine Surg* 29, 454–460. <https://doi.org/10.1097/BSD.0b013e3182956ec5>

Pattappa, G., Li, Z., Peroglio, M., Wismer, N., Alini, M., Grad, S., 2012. Diversity of intervertebral disc cells: phenotype and function: Diversity of intervertebral disc cells. *J. Anat.* 221, 480–496. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2012.01521.x>

Petta, D., Grijpma, D.W., Alini, M., Eglin, D., D'Este, M., 2018. Three-Dimensional Printing of a Tyramine Hyaluronan Derivative with Double Gelation Mechanism for

Independent Tuning of Shear Thinning and Postprinting Curing. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 4, 3088–3098. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00416>

Picaud, L., Trichet, L., Ronsin, O., Haye, B., Génois, I., Baumberger, T., Mosser, G., 2018. Pure dense collagen threads from extrusion to fibrillogenesis stability. *Biomed. Phys. Eng. Express* 4, 035008. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/aaab78>

Poldervaart, M.T., Goversen, B., de Ruijter, M., Abbadessa, A., Melchels, F.P.W., Öner, F.C., Dhert, W.J.A., Vermonden, T., Alblas, J., 2017. 3D bioprinting of methacrylated hyaluronic acid (MeHA) hydrogel with intrinsic osteogenicity. *PLoS ONE* 12, e0177628. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0177628>

Ponsonnet, L., Comte, V., Othmane, A., Lagneau, C., Charbonnier, M., Lissac, M., Jaffrezic, N., 2002. Effect of surface topography and chemistry on adhesion, orientation and growth of fibroblasts on nickel–titanium substrates. *Materials Science and Engineering: C, Proceedings of the 3rd Maghreb-Europe Meeting on Materials and their Applications for Devices and Physical, Chemical and Biological Sensors, MADICA 2001, Hammamet, Tunisia, 29-30 October 2001* 21, 157–165. [https://doi.org/10.1016/S0928-4931\(02\)00097-8](https://doi.org/10.1016/S0928-4931(02)00097-8)

Priyadarshani, P., Li, Y., Yao, L., 2016. Advances in biological therapy for nucleus pulposus regeneration. *Osteoarthritis and Cartilage* 24, 206–212. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.08.014>

Published clinical evidence [WWW Document], n.d. . Barricaid. URL <https://barricaid.com/fda-approved-annular-closure-device/published-clinical-evidence/> (accessed 7.20.23).

Purcell, B.P., Lobb, D., Charati, M.B., Dorsey, S.M., Wade, R.J., Zellars, K.N., Doviak, H., Pettaway, S., Logdon, C.B., Shuman, J.A., Freels, P.D., Gorman III, J.H., Gorman, R.C., Spinale, F.G., Burdick, J.A., 2014. Injectable and bioresponsive hydrogels for on-demand matrix metalloproteinase inhibition. *Nature Mater* 13, 653–661. <https://doi.org/10.1038/nmat3922>

Raj, P.P., 2008. Intervertebral Disc: Anatomy-Physiology-Pathophysiology-Treatment. *Pain Practice* 8, 18–44. <https://doi.org/10.1111/j.1533-2500.2007.00171.x>

Rheometry | Rheology, n.d. . Covalent Metrology Analytical Labs. URL <https://covalentmetrology.com/techniques/rheometry-rheology/> (accessed 7.21.23).

Ricard-Blum, S., 2011. The Collagen Family. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* 3, a004978–a004978. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a004978>

Roberts, J.J., Naudiyal, P., Lim, K.S., Poole-Warren, L.A., Martens, P.J., 2016. A comparative study of enzyme initiators for crosslinking phenol-functionalized hydrogels for cell encapsulation. *Biomater Res* 20, 30. <https://doi.org/10.1186/s40824-016-0077-z>

Roberts, S., Menage, J., Urban, J.P., 1989. Biochemical and structural properties of the cartilage end-plate and its relation to the intervertebral disc. *Spine (Phila Pa 1976)* 14, 166–174. <https://doi.org/10.1097/00007632-198902000-00005>

Romaniyanto, Mahyudin, F., Sigit Prakoeswa, C.R., Notobroto, H.B., Tinduh, D., Ausrin, R., Rantam, F.A., Suroto, H., Utomo, D.N., Rhatomy, S., 2022. An update of current therapeutic approach for Intervertebral Disc Degeneration: A review article. *Annals of Medicine and Surgery* 77, 103619. <https://doi.org/10.1016/j.amsu.2022.103619>

Sakai, S., Moriyama, K., Taguchi, K., Kawakami, K., 2010. Hematin is an Alternative Catalyst to Horseradish Peroxidase for In Situ Hydrogelation of Polymers with Phenolic Hydroxyl Groups In Vivo. *Biomacromolecules* 11, 2179–2183. <https://doi.org/10.1021/bm100623k>

Sato, N., Taniguchi, T., Goda, Y., Kosaka, H., Higashino, K., Sakai, T., Katoh, S., Yasui, N., Sairyo, K., Taniguchi, H., 2016. Proteomic Analysis of Human Tendon and Ligament: Solubilization and Analysis of Insoluble Extracellular Matrix in Connective Tissues. *J. Proteome Res.* 15, 4709–4721. <https://doi.org/10.1021/acs.jproteome.6b00806>

scanning electron microscope, n.d. . Liberal Dictionary. URL <https://www.tekportal.net/scanning-electron-microscope/> (accessed 7.21.23).

Schroeder, Y., Huyghe, J.M., van Donkelaar, C.C., Ito, K., 2010. A biochemical/biophysical 3D FE intervertebral disc model. *Biomech Model Mechanobiol* 9, 641–650. <https://doi.org/10.1007/s10237-010-0203-0>

Schroeder, Y., Wilson, W., Huyghe, J.M., Baaijens, F.P.T., 2006. Osmoviscoelastic finite element model of the intervertebral disc. *Eur Spine J* 15, 361–371. <https://doi.org/10.1007/s00586-006-0110-3>

Schwab, A., Héлары, C., Richards, R.G., Alini, M., Eglin, D., D'Este, M., 2020. Tissue mimetic hyaluronan bioink containing collagen fibers with controlled orientation modulating cell migration and alignment. *Materials Today Bio* 7, 100058. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100058>

Schwab, Andrea, Levato, R., D'Este, M., Piluso, S., Eglin, D., Malda, J., 2020. Printability and Shape Fidelity of Bioinks in 3D Bioprinting. *Chem. Rev.* 120, 11028–11055. <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.0c00084>

Seidlits, S.K., Khaing, Z.Z., Petersen, R.R., Nickels, J.D., Vanscoy, J.E., Shear, J.B., Schmidt, C.E., 2010. The effects of hyaluronic acid hydrogels with tunable mechanical properties on neural progenitor cell differentiation. *Biomaterials* 31, 3930–3940. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.125>

Serbo, J.V., Kuo, S., Lewis, S., Lehmann, M., Li, J., Gracias, D.H., Romer, L.H., 2016. Patterning of Fibroblast and Matrix Anisotropy within 3D Confinement is Driven by the Cytoskeleton. *Advanced Healthcare Materials* 5, 146–158. <https://doi.org/10.1002/adhm.201500030>

Skardal, A., Zhang, J., McCoard, L., Xu, X., Oottamasathien, S., Prestwich, G.D., 2010. Photocrosslinkable Hyaluronan-Gelatin Hydrogels for Two-Step Bioprinting. *Tissue Engineering Part A* 16, 2675–2685. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2009.0798>

Smith, L.J., Fazzalari, N.L., 2006. Regional variations in the density and arrangement of elastic fibres in the annulus fibrosus of the human lumbar disc. *J Anatomy* 209, 359–367. <https://doi.org/10.1111/j.1469-7580.2006.00610.x>

Stern, R., Kogan, G., Jędrzejewski, M.J., Šoltés, L., 2007. The many ways to cleave hyaluronan. *Biotechnology Advances* 25, 537–557. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.001>

Sun, B., Lian, M., Han, Y., Mo, X., Jiang, W., Qiao, Z., Dai, K., 2021. A 3D-Bioprinted dual growth factor-releasing intervertebral disc scaffold induces nucleus pulposus and annulus fibrosus reconstruction. *Bioactive Materials* 6, 179–190. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.06.022>

Sun, W., Starly, B., Daly, A.C., Burdick, J.A., Groll, J., Skeldon, G., Shu, W., Sakai, Y., Shinohara, M., Nishikawa, M., Jang, J., Cho, D.-W., Nie, M., Takeuchi, S., Ostrovidov, S., Khademhosseini, A., Kamm, R.D., Mironov, V., Moroni, L., Ozbolat, I.T., 2020. The bioprinting roadmap. *Biofabrication* 12, 022002. <https://doi.org/10.1088/1758-5090/ab5158>

Taguchi, T., Ikoma, T., Tanaka, J., 2002. An improved method to prepare hyaluronic acid and type II collagen composite matrices. *J. Biomed. Mater. Res.* 61, 330–336. <https://doi.org/10.1002/jbm.10147>

Tamoud, A., Zaïri, Fahmi, Mesbah, A., Zaïri, Fahed, 2022. A fully three-dimensional model of interpenetrating collagen fibrillar networks for intervertebral disc mechanics. *International Journal of Mechanical Sciences* 223, 107310. <https://doi.org/10.1016/j.ijmecsci.2022.107310>

Tampier, C., Drake, J.D.M., Callaghan, J.P., McGill, S.M., 2007. Progressive Disc Herniation: An Investigation of the Mechanism Using Radiologic, Histochemical, and Microscopic Dissection Techniques on a Porcine Model. *Spine* 32, 2869. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e31815b64f5>

Tavakoli, J., Diwan, A.D., Tipper, J.L., 2020. The ultrastructural organization of elastic fibers at the interface of the nucleus and annulus of the intervertebral disk. *Acta Biomaterialia* 114, 323–332. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.021>

Tavakoli, J., Tipper, J.L., 2022. Detailed mechanical characterization of the transition zone: New insight into the integration between the annulus and nucleus of the intervertebral disc. *Acta Biomaterialia* 143, 87–99. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2022.03.002>

Tavianatou, A.G., Caon, I., Franchi, M., Piperigkou, Z., Galesso, D., Karamanos, N.K., 2019. Hyaluronan: molecular size-dependent signaling and biological functions in inflammation and cancer. *The FEBS Journal* 286, 2883–2908. <https://doi.org/10.1111/febs.14777>

Taylor, T.K., Ghosh, P., Bushell, G.R., 1981. The contribution of the intervertebral disk to the scoliotic deformity. *Clin Orthop Relat Res* 79–90.

Techniques d'échantillonnage par FTIR : Réflectance totale atténuée (ATR) - FR [WWW Document], n.d. URL <https://www.thermofisher.com/fr/fr/home/industrial/spectroscopy-elemental-isotope-analysis/spectroscopy-elemental-isotope-analysis-learning-center/molecular-spectroscopy-information/ftir-information/ftir-sample-handling-techniques/ftir-sample-handling-techniques-attenuated-total-reflection-atr.html> (accessed 7.21.23).

Tendulkar, G., Chen, T., Ehnert, S., Kaps, H.-P., Nüssler, A.K., 2019. Intervertebral Disc Nucleus Repair: Hype or Hope? *International Journal of Molecular Sciences* 20, 3622. <https://doi.org/10.3390/ijms20153622>

Terzi, A., Gallo, N., Bettini, S., Sibillano, T., Altamura, D., Madaghiele, M., De Caro, L., Valli, L., Salvatore, L., Sannino, A., Giannini, C., 2020. Sub- and Supramolecular X-Ray Characterization of Engineered Tissues from Equine Tendon, Bovine Dermis, and Fish Skin Type-I Collagen. *Macromolecular Bioscience* 20, 2000017. <https://doi.org/10.1002/mabi.202000017>

The Impact of Engineered Mechanical Confinement on Mesenchymal Stem Cell and Lung Fibroblast Mechanobiology - ProQuest [WWW Document], n.d. URL <https://www.proquest.com/openview/acc3f4c20272d233e6875ae4c8480706/1?pq-origsite=gscholar&cbl=18750&diss=y> (accessed 7.23.23).

Thie, M., Schlumberger, W., Rauterberg, J., Robenek, H., 1989. Mechanical confinement inhibits collagen synthesis in gel-cultured fibroblasts. *Eur J Cell Biol* 48, 294–302.

Tian, H., He, Z., Sun, C., Yang, C., Zhao, P., Liu, L., Leong, K.W., Mao, H.-Q., Liu, Z., Chen, Y., 2018. Uniform Core-Shell Nanoparticles with Thiolated Hyaluronic Acid Coating to Enhance Oral Delivery of Insulin. *Adv. Healthcare Mater.* 7, 1800285. <https://doi.org/10.1002/adhm.201800285>

Tong, W., Lu, Z., Qin, L., Mauck, R.L., Smith, H.E., Smith, L.J., Malhotra, N.R., Heyworth, M.F., Caldera, F., Enomoto-Iwamoto, M., Zhang, Y., 2017. Cell therapy for the degenerating intervertebral disc. *Translational Research* 181, 49–58. <https://doi.org/10.1016/j.trsl.2016.11.008>

Tonti, O.R., Larson, H., Lipp, S.N., Luetkemeyer, C.M., Makam, M., Vargas, D., Wilcox, S.M., Calve, S., 2021. Tissue-specific parameters for the design of ECM-mimetic biomaterials. *Acta Biomater* 132, 83–102. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.04.017>

Torre, O.M., Mroz, V., Bartelstein, M.K., Huang, A.H., Iatridis, J.C., 2019. Annulus fibrosus cell phenotypes in homeostasis and injury: implications for regenerative strategies. *Annals of the New York Academy of Sciences* 1442, 61–78. <https://doi.org/10.1111/nyas.13964>

Tsanaktsidou, E., Kammona, O., Kiparissides, C., 2019. On the synthesis and characterization of biofunctional hyaluronic acid based injectable hydrogels for the repair of cartilage lesions. *European Polymer Journal* 114, 47–56. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2019.02.024>

Turley, E.A., Noble, P.W., Bourguignon, L.Y.W., 2002. Signaling Properties of Hyaluronan Receptors. *Journal of Biological Chemistry* 277, 4589–4592. <https://doi.org/10.1074/jbc.R100038200>

van den Brink, W., Flüh, C., Miller, L.E., Klassen, P.D., Bostelmann, R., 2019. Lumbar disc reherniation prevention with a bone-anchored annular closure device: 1-year results of a randomized trial. *Medicine (Baltimore)* 98, e17760. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000017760>

Van Den Hooff, A., 1964. HISTOLOGICAL AGE CHANGES IN THE ANULUS FIBROSUS OF THE HUMAN INTERVERTEBRAL DISK. WITH A DISCUSSION OF THE PROBLEM OF DISK HERNIATION. *Gerontologia* 50, 136–149. <https://doi.org/10.1159/000211249>

Vasvani, S., Kulkarni, P., Rawtani, D., 2020. Hyaluronic acid: A review on its biology, aspects of drug delivery, route of administrations and a special emphasis on its approved marketed products and recent clinical studies. *International Journal of Biological Macromolecules* 151, 1012–1029. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.066>

Vernengo, J., Fussell, G.W., Smith, N.G., Lowman, A.M., 2008. Evaluation of novel injectable hydrogels for nucleus pulposus replacement. *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials* 84B, 64–69. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30844>

Voorhaar, L., Hoogenboom, R., 2016. Supramolecular polymer networks: hydrogels and bulk materials. *Chem. Soc. Rev.* 45, 4013–4031. <https://doi.org/10.1039/C6CS00130K>

Wade, K.R., Robertson, P.A., Broom, N.D., 2012. On the Extent and Nature of Nucleus-Annulus Integration: *Spine* 37, 1826–1833. <https://doi.org/10.1097/BRS.0b013e3182637f04>

Wang, L., Li, J., Zhang, D., Ma, S., Zhang, J., Gao, F., Guan, F., Yao, M., 2020. Dual-enzymatically crosslinked and injectable hyaluronic acid hydrogels for potential application in tissue engineering. *RSC Adv.* 10, 2870–2876. <https://doi.org/10.1039/C9RA09531D>

Wang, Sz., Rui, Yf., Lu, J., Wang, C., 2014. Cell and molecular biology of intervertebral disc degeneration: current understanding and implications for potential therapeutic strategies. *Cell Proliferation* 47, 381–390. <https://doi.org/10.1111/cpr.12121>

Wu, H.-C., Yao, R.-F., 1976. Mechanical behavior of the human annulus fibrosus. *Journal of Biomechanics* 9, 1–7. [https://doi.org/10.1016/0021-9290\(76\)90132-9](https://doi.org/10.1016/0021-9290(76)90132-9)

Xin, X., Borzacchiello, A., Netti, P.A., Ambrosio, L., Nicolais, L., 2004. Hyaluronic-acid-based semi-interpenetrating materials. *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition* 15, 1223–1236. <https://doi.org/10.1163/1568562041753025>

Xu, Q., Torres, J.E., Hakim, M., Babiak, P.M., Pal, P., Battistoni, C.M., Nguyen, M., Panitch, A., Solorio, L., Liu, J.C., 2021. Collagen- and hyaluronic acid-based hydrogels and their biomedical applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports* 146, 100641. <https://doi.org/10.1016/j.mser.2021.100641>

Yamazaki, K., Fukuda, K., Matsukawa, M., Hara, F., Yoshida, K., Akagi, M., Munakata, H., Hamanishi, C., 2003. Reactive oxygen species depolymerize hyaluronan: involvement of the hydroxyl radical. *Pathophysiology* 9, 215–220. [https://doi.org/10.1016/S0928-4680\(03\)00024-5](https://doi.org/10.1016/S0928-4680(03)00024-5)

Ye, Q., Zünd, G., Benedikt, P., Jockenhoovel, S., Hoerstrup, S.P., Sakyama, S., Hubbell, J.A., Turina, M., 2000. Fibrin gel as a three dimensional matrix in cardiovascular tissue engineering. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery* 17, 587–591. [https://doi.org/10.1016/S1010-7940\(00\)00373-0](https://doi.org/10.1016/S1010-7940(00)00373-0)

Yelin, E., Weinstein, S., King, T., 2016. The burden of musculoskeletal diseases in the United States. *Semin Arthritis Rheum* 46, 259–260. <https://doi.org/10.1016/j.semarthrit.2016.07.013>

Ying, H., Zhou, J., Wang, M., Su, D., Ma, Q., Lv, G., Chen, J., 2019. In situ formed collagen-hyaluronic acid hydrogel as biomimetic dressing for promoting spontaneous wound healing. *Materials Science and Engineering: C* 101, 487–498. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.03.093>

Zabow, G., Dodd, S.J., Koretsky, A.P., 2015. Shape-changing magnetic assemblies as high-sensitivity NMR-readable nanoprobos. *Nature* 520, 73–77. <https://doi.org/10.1038/nature14294>

Zhang, Q., Zhou, Y., Yue, W., Qin, W., Dong, H., Vasanthan, T., 2021. Nanostructures of protein-polysaccharide complexes or conjugates for encapsulation of bioactive compounds. *Trends in Food Science & Technology* 109, 169–196. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.026>

Zheng, Z., Hu, J., Wang, H., Huang, J., Yu, Y., Zhang, Q., Cheng, Y., 2017. Dynamic Softening or Stiffening a Supramolecular Hydrogel by Ultraviolet or Near-Infrared Light. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 9, 24511–24517. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b07204>

Zhou, P., Chu, G., Yuan, Z., Wang, H., Zhang, W., Mao, Y., Zhu, X., Chen, W., Yang, H., Li, B., 2021. Regulation of differentiation of annulus fibrosus-derived stem cells using heterogeneous electrospun fibrous scaffolds. *Journal of Orthopaedic Translation* 26, 171–180. <https://doi.org/10.1016/j.jot.2020.02.003>

Zhu, M., Feng, Q., Sun, Y., Li, G., Bian, L., 2017. Effect of cartilaginous matrix components on the chondrogenesis and hypertrophy of mesenchymal stem cells in hyaluronic acid hydrogels: Effect of Cartilaginous Matrix Components on Chondrogenesis and Hypertrophy of Human MSCs. *J. Biomed. Mater. Res.* 105, 2292–2300. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.33760>

N.d. URL <https://www.scienova.com/dialyse/>] (accessed 7.21.23).

Résumé

La dégénérescence du disque intervertébral est une pathologie irréversible entraînant des maux de dos intenses. Les disques intervertébraux sont composés de trois parties : le Nucleus Pulposus (NP) situé au centre, entouré par l'Annulus Fibrosus (AF) et deux plateaux cartilagineux de part et d'autre. La dégénérescence du disque est caractérisée par une baisse d'hydratation du NP qui devient fibreux et ne joue plus son rôle d'absorbeur de chocs. Les forces exercées par le NP sur l'AF vont le rompre provoquant l'écoulement du NP ce qui génère une hernie discale. De nombreux traitements ont été développés mais ils ne permettent pas de freiner la dégénérescence du disque. Ceci est dû en partie à une méconnaissance de la maladie. La plupart des modèles animaux sont quadrupèdes et ne reproduisent pas les caractéristiques de la pathologie humaine. C'est pourquoi il est essentiel de développer de nouveaux modèles *in vitro* utilisant des cellules humaines. De plus, des biomatériaux à bases de polymères naturels semblent être les plus adéquats pour le développement de tels modèles car ils sont le support naturel des cellules.

Ce projet de thèse a eu pour but de développer un nouveau modèle d'Annulus Fibrosus. Pour cela, deux biopolymères présents dans le tissu natif ont été sélectionnés : l'acide hyaluronique qui apporte l'hydratation au disque et le collagène qui sert de support aux cellules.

Dans un premier temps, une encre imprimable reproduisant la matrice extracellulaire de l'AF a été développée. Pour cela, une étude physicochimique a été effectuée sur les interactions collagène I/acide hyaluronique (HA). Lorsqu'ils sont mélangés, ces deux biopolymères forment des complexes polyioniques (CPI) du fait de leurs charges opposées. Ces CPI précipitent et ne permettent pas d'obtenir une encre homogène. L'inhibition des CPI est efficace à des pH très acides (pH 1) en présence de sels mais ces conditions sont incompatibles avec la survie cellulaire. En modulant le pH et la force ionique, nous avons découvert une nouvelle méthode pour formuler une encre collagène/HA homogène. En se plaçant proche du point isoélectrique du collagène (pH 5,5) et en présence de NaCl, des fibrilles de collagène se forment en solution. Dans ces conditions, les interactions avec l'HA sont inhibées et les CPI ne se forment pas. Il est ensuite possible de former des hydrogels de collagène fibrillaire par remontée de pH à 7 et de photo réticuler l'HA pour obtenir des hydrogels avec des propriétés physiques optimisées.

Le second objectif était de générer le modèle *in vitro* d'Annulus Fibrosus. L'AF étant un tissu anisotrope, nous avons procédé à une impression 3D de solutions denses de collagène pour induire son alignement. Deux stratégies ont été adoptées pour cette étude. (i) L'encre

précédemment formulée en phase diluée a été utilisée à plus haute concentration (30 mg.mL⁻¹ en collagène, 7,5 mg.mL⁻¹ en HA) avec un ratio collagène/HA de 4 pour 1 comme c'est le cas dans l'AF. Cette encre est imprimée en bain de gélification (PBS 2X, NaOH 10-3M) et photoréticulée sous lumière verte en présence d'éosine Y. (ii) Une seconde encre a été formulée composée de collagène concentré imprimée dans le bain de gélification. Après imprégnation avec l'HA, la photoréticulation a été effectuée. Les deux méthodes ont permis d'obtenir des lamelles d'hydrogels anisotropes avec une structure ressemblant à celle de l'AF et des propriétés rhéologiques intéressantes ($G' = 6\text{kPa}$). Ces lamelles ont été cellularisées avec des fibroblastes en reproduisant leur environnement natif confiné entre deux couches imprimées. La viabilité cellulaire et la morphologie des cellules étaient similaires à celles observées dans l'AF après 14 jours de culture. Si les propriétés mécaniques n'ont pas été atteintes, la bioactivité, la structure et l'anisotropie des matériaux développés lors de cette thèse ont été proches du tissu natif, les validant en tant que modèle 3D de l'Annulus Fibrosus.

Abstract

The intervertebral disc degeneration is an irreversible pathology leading to low back pain. The intervertebral disc is composed of three tissues: the Nucleus Pulposus located in the center, surrounded by the Annulus Fibrosus (AF) and two cartilaginous plates located above and below. Disc degeneration is characterized by a hydration loss of the Nucleus Pulposus (NP), which becomes fibrous and no longer acts as a shock absorber. The forces exerted by the NP on the AF break it, causing the leakage of the NP leading to disc herniation.

Several drug and surgical treatments have been developed but none stops or slows down the disc degeneration. This is due to a lack of knowledge of this disease. Most animal models are quadrupedal and do not reproduce the characteristics of the human pathology. This is why it is essential to develop novel *in vitro* models using human cells. Furthermore, biomaterials based on natural polymers are the most suitable for the development of three-dimensional *in vitro* models because these biopolymers are the natural support of cells.

In order to mimic a complete intervertebral disc, it is essential to reproduce the three parts of this tissue. This thesis project aimed to develop a novel model of Annulus Fibrosus. For this purpose, two biopolymers present in the native tissue were selected: hyaluronic acid which gives hydration to the disc and collagen which is the natural support of cells.

The first objective of this thesis was devoted to the formulation of a printable ink to reproduce the AF extracellular matrix. To do this, a physicochemical study was carried out on collagen/hyaluronic acid (HA) interactions. After mixing, these two biopolymers form polyionic complexes (PICs) and precipitate due to their opposite charges. So, a homogeneous ink cannot be obtained. Inhibition of PICs formation is effective at very acidic pH (pH 1) in with salt addition. Nevertheless, these conditions are incompatible with cell survival. By modulating the pH and ionic strength, we discovered a new method to formulate a homogeneous collagen/HA ink. Using a collagen solution close to its isoelectric point (pH 5.5) in presence of NaCl, we triggered the formation of collagen fibrils in solution. Interactions with HA are inhibited in these conditions and PICs are not formed. Then, a fibrillary collagen hydrogel can be formed by raising the pH to 7 and HA can be crosslinked to obtain hydrogels with optimized physical properties.

The second objective was to design the *in vitro* model of Annulus Fibrosus. Since AF is an anisotropic tissue, we 3D printed dense collagen solutions to induce alignment. Indeed, the shearing of dense solutions during printing aligns collagen. Two strategies were tested in this

study. (i) The ink previously formulated was used at high concentration (30 mg.mL⁻¹ for collagen, 7.5 mg.mL⁻¹ for HA) with a 4:1 collagen/hyaluronic acid ratio to resemble the AF. This ink was printed in a gelation bath (2X PBS, 10⁻³M NaOH) and photocrosslinked under green light (eosin Y used as photo initiator). (ii) A second ink was used, only composed of concentrated collagen and printed in the same gelling bath. Then, an impregnation process with HA was carried out followed by the photocrosslinking with green light. The two methods allowed the production of anisotropic lamellae with structural features resembling those of the AF and interesting rheological properties ($G' = 6\text{kPa}$). These lamellae were cellularized with fibroblasts confined between two printed layers. Cell viability and morphology were similar to that observed within the native tissue. If the physiological mechanical properties were not reached, biocompatibility, bioactivity, structure and anisotropy of these biomaterials were close to the AF, this allows to validate them as a novel 3D model of Annulus Fibrosus.

