

Caractérisation et optimisation d'hydrogels de chitosane bioactifs et injectables pour applications biomédicales

par

Ève HUI

MÉMOIRE PRÉSENTÉ À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
COMME EXIGENCE PARTIELLE À L'OBTENTION DE LA MAÎTRISE
AVEC MÉMOIRE EN GÉNIE TECHNOLOGIE DE LA SANTÉ
M. Sc. A

MONTREAL, LE 28 AOÛT 2017

ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE
UNIVERSITÉ DU QUÉBEC



Ève Hui, 2017



Cette licence [Creative Commons](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/) signifie qu'il est permis de diffuser, d'imprimer ou de sauvegarder sur un autre support une partie ou la totalité de cette œuvre à condition de mentionner l'auteur, que ces utilisations soient faites à des fins non commerciales et que le contenu de l'œuvre n'ait pas été modifié.

PRÉSENTATION DU JURY
CE MÉMOIRE A ÉTÉ ÉVALUÉ
PAR UN JURY COMPOSÉ DE :

Mme Sophie Lerouge, directrice de mémoire
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

M. Eric Wagnac, président du jury
Département de génie mécanique à l'École de technologie supérieure

M. Jean DaSilva, membre du jury externe
Département de radiologie, radio-oncologie et médecine nucléaire et Département de pharmacologie et physiologie à l'Université de Montréal

IL A FAIT L'OBJET D'UNE SOUTENANCE DEVANT JURY ET PUBLIC

LE 23 AOÛT 2017

À L'ÉCOLE DE TECHNOLOGIE SUPÉRIEURE

REMERCIEMENTS

Tout d'abord, je souhaite remercier infiniment ma directrice de recherche, Sophie Lerouge, de m'avoir offert l'opportunité d'effectuer mon projet de maîtrise dans son laboratoire. Merci de m'avoir laissé la liberté de m'approprier mon sujet de recherche. Grâce à votre confiance, je me suis vraiment épanouie durant mon projet et j'ai eu la chance d'être en contact avec plusieurs industries et de diriger un projet *in vivo* du début à la fin. J'ai énormément appris grâce à vous.

Je tiens par la suite à remercier Marion Maire pour sa précieuse aide technique et pour sa disponibilité. Merci d'avoir été là pour me soutenir dans mon projet de recherche mais également personnellement. Merci pour ton écoute et tes conseils, l'amitié qui nous lie compte à mes yeux et j'espère qu'elle continuera même si nos chemins professionnels se séparent.

Merci énormément à Mélusine Bouchet d'avoir été présente depuis mon arrivée au laboratoire et d'avoir été ma première véritable amie à mon arrivée au Québec. Même si nous ne partageons pas vraiment de points communs concernant nos projets de recherche, tu étais pour moi une bouffée d'oxygène au labo. Je n'oublierai jamais tous les moments et fous rires que nous avons eu ensemble et je suis sûre qu'il y en aura encore beaucoup.

Je tiens ensuite à remercier le service de l'animalerie du CHUM ainsi que le Dr Qi qui m'ont apporté une aide technique précieuse durant mon projet *in vivo*. Merci infiniment pour votre confiance et pour l'amour que vous portez à tous vos animaux. Vous m'avez donné une autre vision de ce que sont les essais animaux.

Merci aux entreprises Rhéolution Inc, OligoMedic Inc. ainsi que Advanced Biomatrix, de m'avoir donné l'opportunité de collaborer avec vous. Je me suis rendue compte à quel point la communication était importante entre les laboratoires, les entreprises et les cliniciens.

VI

Je souhaite remercier tous mes amis et collègues du laboratoire, Nick, Francesco, Yasaman, Fatima, Maedeh, Capucine, Sepideh, Atma et Caroline. Je vous souhaite de merveilleuses choses et que tous vos projets professionnels et personnels se concrétisent.

Enfin, merci à ma famille, à tous mes amis et surtout ma meilleure amie Manon et à mon chéri Anthony de m'avoir soutenue et d'avoir cru en moi, même dans les moments les plus difficiles.

CARACTÉRISATION ET OPTIMISATION D'HYDROGELS DE CHITOSANE BIOACTIFS ET INJECTABLES POUR APPLICATIONS BIOMÉDICALES

Ève HUI

RÉSUMÉ

Les adhérences post-opératoires sont des complications qui se manifestent après environ 97% des chirurgies abdominales et peuvent engendrer des obstructions intestinales et des douleurs chroniques. Les stratégies pour les prévenir se classent en trois catégories : les agents pharmacologiques, qui sont souvent peu efficaces, les barrières physiques qui sont non injectables et difficiles à manipuler, et les barrières fluides qui ont des propriétés mécaniques trop faibles et une cinétique de dégradation souvent non adaptée.

Des hydrogels de chitosane thermosensibles ayant de bonnes propriétés mécaniques ont récemment été développés grâce à la combinaison d'agents gélifiants. Ces gels sont liquides à température ambiante et peuvent gélifier rapidement à 37°C. Le premier objectif de cette étude consistait à déterminer la formulation la plus adaptée pour prévenir les adhérences et évaluer son potentiel *in vivo* chez le rat, en comparaison avec Interceed®, une barrière physique commercialisée. Les résultats montrent que l'incidence des adhérences a été statistiquement réduite grâce à l'administration du gel de chitosane mais ce traitement était moins efficace qu'Interceed®. Cette dernière ne peut cependant pas être utilisée en chirurgie mini-invasive car elle n'est pas injectable. L'efficacité de notre hydrogel pourrait avoir été limitée par une cinétique de dégradation trop lente mais une optimisation du DDA du chitosane, pourrait rendre ces résultats encore plus prometteurs.

Dans un second temps, le potentiel de cet hydrogel pour la régénération du cartilage a été évalué en comparant ses propriétés physico-chimiques, rhéologiques et mécaniques à celles d'un produit déjà sur le marché pour la régénération du cartilage, JointRep™ (OligoMedic Inc.).

L'un des aspects les plus critiques de l'ingénierie tissulaire est de développer des biomatériaux capables de soutenir la croissance cellulaire. Le collagène est le composant le plus abondant de la matrice extracellulaire et est un substrat pour les cellules. Le troisième objectif de ce projet consistait à évaluer les propriétés mécaniques et biologiques d'hydrogels de chitosane/collagène pour l'ingénierie tissulaire. Lors des essais Live/Dead, l'ajout de collagène semble améliorer la survie et la prolifération des fibroblastes cependant une optimisation des hydrogels de chitosane/collagène serait nécessaire afin de conjuguer bonne cytocompatibilité et propriétés mécaniques.

Mots-clés : Hydrogels de chitosane, Collagène, Ingénierie tissulaire, Adhérences abdominales, Régénération du cartilage

CHARACTERIZATION AND OPTIMIZATION OF BIOACTIVE AND INJECTABLE CHITOSAN HYDROGELS FOR BIOMEDICAL APPLICATIONS

Ève HUI

ABSTRACT

Postoperative adhesions are a complication that occurs after nearly 97% of abdominal surgeries and can cause intestinal obstructions and chronic pain. Strategies to prevent them are divided into three categories: pharmacological agents, which are often ineffective, physical barriers that are non-injectable and difficult to handle, and fluid barriers that have weak mechanical properties and a degradation kinetic that is often not appropriate.

Thermosensitive chitosan hydrogels with strong mechanical properties have been recently developed thanks to a combination of gelling agents. These gels are liquid at room temperature and can rapidly gel at 37°C. The first objective of this study is to determine the best formulation of chitosan hydrogel to prevent adhesions and evaluate its potential in vivo in a rat model by comparing its efficacy with a commercialized physical barrier, Interceed®. The results showed that the incidence of adhesions was statistically reduced thanks to the administration of the chitosan gel but this treatment was less effective than Interceed®. However, Interceed® cannot be used in minimally invasive surgery because it is not injectable. The effectiveness of our hydrogel may have been limited by its slow degradation kinetics but an optimization of the DDA of chitosan could make these results even more promising.

Secondly, the potential of chitosan hydrogels for the regeneration of cartilage was evaluated by comparing their physico-chemical, rheological and mechanical properties with those of a commercialized product, JointRep™ (OligoMedic Inc.).

One of the most critical aspects of tissue engineering is to develop biomaterials capable of supporting cell growth. Collagen is the most abundant component of the extracellular matrix and is a substrate for cells. The third objective of this project is to evaluate the mechanical and biological properties of chitosan/collagen hydrogels for tissue engineering. After Live/Dead assays, the addition of collagen seemed to improve cell survival and proliferation, however an optimization of chitosan/collagen hydrogels would be necessary in order to combine good cytocompatibility and mechanical properties.

Keywords: Chitosan Hydrogels, Collagen, Tissue Engineering, Abdominal Adhesions, Cartilage regeneration

TABLE DES MATIÈRES

		Page
INTRODUCTION		1
CHAPITRE 1	CONTEXTE BIOMÉDICAL ET ÉTAT DE L'ART	3
1.1	Biomatériaux injectables pour des applications médicales.....	3
1.1.1	Introduction aux hydrogels	3
1.1.2	Critères pour la conception d'hydrogels injectables et propriétés	5
1.2	Hydrogels injectables pour la prévention des adhérences tissulaires	8
1.2.1	Adhérences tissulaires : incidence et pathophysiologie.....	8
1.2.2	Les stratégies de prévention existantes et leurs limites	10
1.2.3	Cahier des charges de la barrière idéale.....	15
1.3	Hydrogels injectables pour la régénération du cartilage.....	17
1.3.1	Anatomie et incidence de l'arthrose	17
1.3.2	Pathophysiologie.....	19
1.3.3	Stratégies de traitement existantes et leurs limites	20
1.3.4	Vers la régénération du cartilage	22
1.3.5	Cahier des charges du produit idéal	25
1.4	Les hydrogels de chitosane	26
1.4.1	Le chitosane	26
1.4.2	Les hydrogels de chitosane	27
1.4.3	Avantages et limites des hydrogels de chitosane du LBeV pour la prévention des adhérences tissulaires et la régénération du cartilage	30
1.5	Les hydrogels de chitosane-collagène	33
1.5.1	Le collagène	33
1.5.2	Avantages et limites des hydrogels de collagène.....	35
1.5.3	Les hydrogels de chitosane-collagène	37
1.6	Résumé du contexte et objectifs de l'étude.....	39
CHAPITRE 2	MATÉRIEL ET MÉTHODES.....	41
2.1	Préparation des hydrogels de chitosane	41
2.1.1	Purification du chitosane.....	41
2.1.2	Solubilisation du chitosane	41
2.1.3	Préparation des agents gélifiants.....	42
2.1.4	Préparation des hydrogels de chitosane	43
2.2	Synthèse des hydrogels de collagène et chitosane-collagène	43
2.2.1	PureCol® EZ gel.....	44
2.2.2	Préparation des hydrogels de chitosane-collagène	44
2.3	Présentation et préparation du produit JointRep™	46
2.4	Caractérisations mécaniques.....	47
2.4.1	Étude rhéologique	47
2.4.2	Injectabilité et étalement sur une surface.....	48
2.4.3	Propriétés mécaniques en compression non-confinée	49

2.4.4	Cinétique de dégradation	49
2.5	Caractérisation physicochimique	50
2.5.1	Microscopie Électronique à Balayage (MEB)	50
2.5.2	pH et Osmolalité	51
2.6	Relargage de l'héparine	51
2.7	Évaluation de la viabilité cellulaire <i>In vitro</i>	52
2.7.1	Encapsulation cellulaire	52
2.7.2	Viabilité cellulaire par coloration Alamar Blue	52
2.7.3	Essais Live/Dead	53
2.8	Modèle <i>In vivo</i> pour la prévention des adhérences tissulaires	53
2.8.1	Protocole expérimental	53
2.8.2	Analyse des adhérences	57
CHAPITRE 3	RÉSULTATS	59
3.1	Évaluation du potentiel d'hydrogels de chitosane pour la prévention des adhérences tissulaires	59
3.1.1	Caractérisations <i>In vitro</i>	60
3.1.2	Essais <i>In vivo</i>	69
3.2	Caractérisation <i>In vitro</i> du produit JointRep™ pour la régénération du cartilage	76
3.2.1	Étude rhéologique	76
3.2.2	Propriétés mécaniques en compression non-confinée	79
3.2.3	pH et Osmolalité	80
3.2.4	Évaluation de la morphologie et de la porosité par MEB	80
3.3	Caractérisation des hydrogels de chitosane-collagène	81
3.3.1	Étude rhéologique	81
3.3.2	Propriétés mécaniques en compression non-confinée	84
3.3.3	pH et Osmolalité	86
3.3.4	Évaluation de la morphologie et de la porosité par MEB	87
3.3.5	Évaluation de la viabilité cellulaire <i>In vitro</i>	89
CHAPITRE 4	DISCUSSIONS, LIMITES ET PERSPECTIVES	93
4.1	Évaluation du potentiel d'hydrogels de chitosane pour la prévention des adhérences tissulaires	93
4.2	Caractérisation du produit JointRep™ pour la régénération du cartilage	97
4.3	Caractérisation d'hydrogels de chitosane-collagène	101
CONCLUSIONS	105
ANNEXE I	PROTOCOLE DE PURIFICATION DU CHITOSANE	107
ANNEXE II	PROTOCOLE DE PRÉPARATION DES AGENTS GÉLIFIANTS	109
ANNEXE III	QUANTIFICATION DE L'HÉPARINE PAR DMMB	111
ANNEXE IV	PHOTOGRAPHIES DES TISSUS APRÈS SACRIFICES ET SUVIS DES RATS	113

ANNEXE V	ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DE L'HÉPARINE	117
	LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES.....	119

LISTE DES TABLEAUX

	Page
Tableau 1.2.1 : Liste non exhaustive de barrières solides pour la prévention des adhérences postopératoires	12
Tableau 1.2.2 : Liste non exhaustive de barrières fluides ou de gels pour la prévention des adhérences tissulaire (Ward & Panitch, 2011)	14
Tableau 1.3.1 : Constituants de la MEC du cartilage hyalin (Sridhar, 2009)	18
Tableau 1.3.2 : Principaux matériaux utilisés pour la transplantation de cellules pour le traitement de l'arthrose (Sridhar, 2009; Vinatier et al., 2009)	24
Tableau 1.4.1: Exemples d'hydrogels de chitosane développés pour la prévention des adhérences tissulaires.....	31
Tableau 1.5.1 : Les différents types de collagène (Pariente, Villars, & Conort, 2005)	33
Tableau 1.5.2 : Avantages et désavantages des hydrogels de collagène	36
Tableau 1.5.3 : Avantages des gels hydrides de chitosane-collagène.....	39
Tableau 2.1.1: Abréviations et détails des compositions des différentes formulations d'hydrogels testées (Chit=2% (m/v) pour tous les gels)	42
Tableau 2.2.1: Caractéristique du produit PureCol®EZ gel (0.5%).....	44
Tableau 2.2.2 : Concentrations initiales et finales de chitosane et de PureCol® utilisées pour préparer les gels contenant différents ratios volumiques de chitosane/collagène	45
Tableau 2.3.1: Quantité de sels utilisée pour préparer la solution tampon et caractéristiques des composants du produit JointRep™	47
Tableau 2.8.1: Répartition des rates suivant les groupes de traitement	54
Tableau 2.8.2 : Détails des scores utilisés pour évaluer la sévérité des adhérences	57
Tableau 3.1.1 : t _{gel} de différentes formulations de gels de chitosane à 22°C (moyenne, n=3)	63
Tableau 3.1.2 : Score des adhérences et surface adhérente résiduelle suivant les groupes, sans traitement, avec Interceed® et avec le gel SHC0075BGP01.....	69

Tableau 3.2.1 :	pH et osmolalité du produit JointRep™ ainsi que des gels SHC0075PB004 et SHC0075BGP01	80
Tableau 3.3.1 :	t _{gel} pour différentes formulations de chitosane-collagène (n=2 ou 3).....	83
Tableau 3.3.2 :	Viabilité de cellules L929 encapsulées dans des hydrogels de chitosane/collagène après coloration Live/Dead évaluée par fluorescence (x15).....	91
Tableau 4.1.1 :	Tableau récapitulatif des critères du cahier des charges pour la prévention des adhérences abdominales	94
Tableau 4.2.1 :	Tableau récapitulatif des critères du cahier des charges pour la régénération du cartilage.....	98
Tableau 4.3.1 :	Tableau récapitulatif des propriétés des hydrogels de chitosane-collagène	102

LISTE DES FIGURES

	Page
Figure 1.1	Classification des hydrogels selon leur sources polymériques et leurs propriétés, tiré de (Berger, 2014).....4
Figure 1.2	Mécanisme de guérison du péritoine (Kamel, 2010).....10
Figure 1.3	Schématisation de la structure du chitosane26
Figure 1.4	Schématisation de la structure chimique du BGP29
Figure 1.5	Schématisation des interactions cellules-matrice.....35
Figure 1.6	Schématisation de la structure du chitosane, du collagène et de leurs interactions (Q. Dang et al., 2017).....38
Figure 2.1	Photographie de la méthode de mélange43
Figure 2.2	Exemple de préparation d'1 ml de gel pour un ratio volumique de chitosane/collagène de 75/2545
Figure 2.3	Photographies du mur abdominal et du caecum abrasés55
Figure 2.4	Placement du produit Interceed® (gauche) et du gel de chitosane (droite).....56
Figure 3.1	Évolution des modules de conservation (G') et de perte (G'') en fonction du temps, pendant 1h à 37°C, pour la formulation SHC0075PB004 (moyenne, n=3)60
Figure 3.2	Évolution du module de conservation G' pour différentes formulations d'hydrogels de chitosane, à 37°C pendant 1h (moyenne ± ET, n=3).....61
Figure 3.3	Évolution du module de conservation G' pour différentes formulations d'hydrogels de chitosane, à 22°C pendant 1h (moyenne ± ET, n=3).....61
Figure 3.4	Injection de gels sur une surface à 37C64
Figure 3.5	Manipulation de gels après injection sur une surface à 37°C64
Figure 3.6	A) Modules d'Young sécants à 30% et 50% de déformation pour les gels SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 (moyenne ± ET, n=3). B) Courbes de contrainte en fonction de la déformation des gels SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 (moyenne, n=3).....65

Figure 3.7	Cinétique de dégradation du gel SHC0075PB004 préparé avec deux DDA (haut : HDDA 94% et bas : LDDA 85%), après immersion dans du PBS (contrôle) ou dans une solution de lysozyme 1mg/ml (moyenne \pm ET, n=5, N=2).....	66
Figure 3.8	Relargage d'héparine pendant 15 jours (moyenne, n=3).....	67
Figure 3.9	Viscosité complexe initiale et après 3 min à 22°C	68
Figure 3.10	Photographies du gel SHC0075BGP01 injecté sur les intestins d'un rat (gauche) et du gel retiré après 10 min de gélification (droite).....	68
Figure 3.11	Adhérence de grade 2.....	70
Figure 3.12	Coloration brune du caecum et gel de chitosane après 14 jours	71
Figure 3.13	Coupes histologiques du mur abdominal (gauche) et du caecum (droite) dans le groupe sain SHAM. Coloration H&E.....	72
Figure 3.14	Coupe histologique d'une adhérence (sans traitement).....	73
Figure 3.15	Coupes histologiques de tissus de rats dans le groupe Interceed®. À gauche, cas où il n'y a pas eu d'adhérence. À droite, cas où il y a eu adhérence légère. Coloration H&E	74
Figure 3.16	Coupes histologiques de tissus provenant d'un rat dans le groupe gel de chitosane SHC0075BGP01. À gauche, adhérence avec de minimes restes d'hydrogel (zone délimitée par trait jaune). À droite, adhérence avec reste massif d'hydrogel. Coloration H&E	74
Figure 3.17	Coupes histologiques de tissus de rats dans le groupe gel de chitosane SHC0075BGP01. À gauche : pas d'adhérence sans reste d'hydrogel. À droite, pas d'adhérence avec reste d'hydrogel. Coloration H&E	75
Figure 3.18	A) Évolution du module de conservation G' du produit JointRep™ pendant 2h à 37°C. B) Comparaison des modules de conservation G' de JointRep™ avec nos formulations SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 (moyenne \pm ET, n=3)	77
Figure 3.19	Évolution du module G' de JointRep™ et des formulations SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 à 22°C pendant 1h (moyenne, n = 1 ou 3).....	78
Figure 3.20	Évolution du module G' de JointRep™ et des formulations SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 en fonction de la température (n=1).....	78

Figure 3.21	A) Contrainte en fonction de la déformation du produit JointRep™ lors des tests de compression non confinée. B) Comparaison des modules d'Young sécants à 30% et 50% de déformation du produit JointRep™ avec les hydrogels du LBeV (Moyenne + ET, n=3). \$: $p < 0,05$ lors du test ANOVA79
Figure 3.22	Photographies prises par MEB après 24h de gélification et deux jours de lyophilisation. A) JointRep™ (x100). B) SHC0075PB004 (x100)81
Figure 3.23	A) Évolution du module de conservation de cinq formulations de gels de chitosane-collagène PureCol® 0.5% (m/v), pendant 1h à 37°C. B) Évolution du module de conservation de deux formulations de gels de chitosane-collagène PureCol® 0.5% (m/v), pendant 1h à 37°C (moyenne, n = 2 ou 3)82
Figure 3.24	Évolution du module de conservation de formulations d'hydrogels de chitosane avec et sans collagène (moyenne, n = 2 ou 3)84
Figure 3.25	A) Courbes de contrainte en fonction de la déformation de cinq formulations d'hydrogels de chitosane-collagène. B) Focus sur les formulations 0,5%Chit-0,38%Coll et 0,5%Coll (moyenne, n=3 ou 4).....85
Figure 3.26	Modules d'Young sécants en compression à 30% et 50% de déformations pour différentes formulations de chitosane/PureCol0,5% (m/v) (moyenne + ET, n=3 ou 4). \$: $p < 0,05$ comparé au module d'Young à 50% de déformation pour le gel 2% chit86
Figure 3.27	A) pH et B) Osmolalité de différentes formulations d'hydrogels de chitosane/collagène après 24h de gélification à 37°C (moyenne \pm ET, n=3)87
Figure 3.28	Photographies prises par MEB A) r = 100/0 (Chit/Coll). B) r = 75/25 (Chit/Coll). C) r = 50/50 (Chit/Coll). D) r = 25/75 (Chit/Coll). E) r = 0/100 (Chit/Coll)88
Figure 3.29	Cytocompatibilité par Alamar Blue, d'hydrogels de chitosane/collagène évaluée par l'activité métabolique des cellules L929 encapsulées (moyenne \pm ET, n=3, N=3). Test ANOVA : $p < 0,05$. * = $p < 0,01$ entre jour 1 et 7. \$ = $p < 0,01$ comparé au jour 7 des autres formulations90

LISTE DES ABRÉVIATIONS, SIGLES ET ACRONYMES

MEC	Matrice Extracellulaire
FDA	Food and Drug Administration
DDA	Degré de désacétylation
DA	Degré d'acétylation
LBeV	Laboratoire de Biomatériaux Endovasculaires
BGP	Béta Glycérophosphate
PB	Phosphate Buffer (tampon phosphate)
SHC	Sodium Hydrogen Carbonate (bicarbonate de sodium)
GAG	Glycosaminoglycanes
PLGA	Acide poly(lactique-co-glycolique)
PLA	Acide polylactique
PEG	Polyéthylène glycol
PCL	Polycaprolactone
PG	Polyglucosamine
GC	Carbonate de Glucosamine
G	Chlorhydrate de Glucosamine
C	Carbonate de Sodium Na_2CO_3
DMMB	Diméthyl-méthylène blue
HDDA	High Degree Of Deacetylation (haut degré de désacétylation)
LDDA	Low Degree Of Deacetylation (faible degré de désacétylation)
MEB	Microscope Électronique à Balayage
H&E	Hématoxyline et Éosine
HCl	Chlorure d'hydrogène

LISTE DES SYMBOLES ET UNITÉS DE MESURE

G'	Module de conservation (Pa)
G''	Module de perte (Pa)
t_{gel}	Température de gélification (sec)

INTRODUCTION

Étant donné que la plupart des tissus humains ont une capacité de régénération limitée, les dommages causés par des traumatismes, des maladies dégénératives ou des anomalies congénitales peuvent entraîner des handicaps irréversibles et même la mort. Ainsi, les patients atteints de lésions tissulaires graves doivent essentiellement compter sur des implants artificiels ou sur la transplantation de tissus pour retrouver toutes leurs fonctions, cependant, ces stratégies de traitement sont très invasives et ont une durée de vie limitée.

Pour surmonter cette problématique, l'ingénierie tissulaire et la médecine régénératrice sont d'un intérêt croissant et permettent de restaurer des tissus ou des organes en implantant des matrices contenant ou non les cellules du patient. L'ingénierie tissulaire est donc un domaine multidisciplinaire qui combine le génie des matériaux, la science des cellules souches et la biochimie. Afin de pouvoir utiliser ces nouvelles stratégies de traitement en chirurgie mini-invasive, il existe encore un besoin criant de biomatériaux injectables par aiguille ou cathéter mais se rigidifiant *in vivo* et atteignant des propriétés mécaniques suffisantes pour remplacer le tissu cible.

Les polymères naturels, tels que le chitosane, ont largement été utilisés dans le domaine de l'ingénierie tissulaire car ils proviennent de sources naturelles et peuvent former des hydrogels qui miment la matrice extracellulaire (MEC) des tissus. De plus, les hydrogels de chitosane sont reconnus pour être biocompatibles, biodégradables et thermosensibles. Ainsi, dans les années 2000, Chenite et al. ont développé une formulation de chitosane combinée avec du bétap glycérophosphate (BGP) qui forme un hydrogel physique en conditions physiologiques (Chenite, Buschmann, Wang, Chaput, & Kandani, 2001; Chenite et al., 2000). En effet, l'ajout de glycérophosphate dans une solution aqueuse et acide de chitosane, permet de la neutraliser à température ambiante et entraîne une gélification à température corporelle. En raison de ces caractéristiques intéressantes, ce système a trouvé un large intérêt dans le domaine biomédical.

L'inconvénient de ces hydrogels est qu'ils ont des propriétés mécaniques assez faibles et surtout, ils ne sont pas totalement biocompatibles et causeraient une mort cellulaire à des concentrations de BGP requises pour une gélification rapide (Ahmadi & de Bruijn, 2008; Ceccaldi et al., 2017; Monette, Ceccaldi, Assaad, Lerouge, & Lapointe, 2016; Riva et al., 2011; Zhou, Jiang, Cao, Li, & Chen, 2015). De nouveaux hydrogels de chitosane thermosensibles ont été développés au Laboratoire de Biomatériaux Endovasculaires (LBeV) pour résoudre cette problématique. L'**objectif général** de cette maîtrise consiste à caractériser les hydrogels de chitosane développés au LBeV et évaluer leur potentiel pour deux applications particulières, la prévention des adhérences tissulaires et la régénération du cartilage.

Le **premier objectif** consistera à évaluer ces hydrogels en vue de la prévention des adhérences tissulaires et à tester la formulation la plus prometteuse *in vivo*, en la comparant avec un produit sur le marché, Interceed® (Ethicon). Le **deuxième objectif** consistera à comparer nos hydrogels avec le produit JointRep™, commercialisé par la compagnie OligoMedic Inc, qui est utilisé pour la régénération du cartilage. Enfin, en **troisième partie**, nous étudierons les bénéfices de la combinaison du chitosane avec du collagène, en termes de viabilité cellulaire et propriétés mécaniques.

Le premier chapitre de ce mémoire de maîtrise présente la revue de littérature. Cette dernière introduit tout d'abord les hydrogels en général et les hydrogels injectables plus particulièrement et traite ensuite deux problématiques cliniques, la prévention des adhérences tissulaires et la régénération du cartilage. Par la suite, les hydrogels de chitosane et de collagène seront présentés ainsi que les avantages et limites de leurs utilisations pour les deux applications ciblées. Le chapitre 2 présente le matériel et les méthodes utilisés pour caractériser les hydrogels de chitosane et chitosane/collagène *in vitro* et *in vivo*, et les résultats sont présentés au chapitre 3 et discutés au chapitre 4.

CHAPITRE 1

CONTEXTE BIOMÉDICAL ET ÉTAT DE L'ART

1.1 Biomatériaux injectables pour des applications médicales

1.1.1 Introduction aux hydrogels

Un hydrogel est une matrice polymérique et hydrophile tridimensionnelle capable d'absorber une grande quantité d'eau et de liquides biologiques. On distingue les hydrogels physiques des hydrogels chimiques. Les premiers, dont le réseau est maintenu par le biais de liaisons faibles (hydrophobes, hydrogènes, ioniques), ne sont pas permanents car les liaisons se font et se défont continuellement dépendamment du milieu (pH, température, force ionique). Les hydrogels chimiques, au contraire, possèdent un réseau qui est maintenu par des réticulations covalentes fournissant un caractère permanent à ces matériaux (Caló & Khutoryanskiy, 2015; Coutu, 2012; Coutu, Fatimi, Berrahmoune, Soulez, & Lerouge, 2013; Hoffman, 2012; Shetye, Godbole, Bhilegaokar, & Gajare, 2015; Thiele, Ma, Bruekers, Ma, & Huck, 2014; Ullah, Othman, Javed, Ahmad, & Akil, 2015). La réticulation de l'hydrogel peut se faire lors de sa préparation *in vitro*, ou bien directement dans l'organisme *in vivo* (réticulation *in situ*) (Ahmed, 2015).

On peut également classifier les hydrogels dépendamment de l'origine du polymère utilisé : naturelle (chitosane, collagène, cellulose, héparine etc), synthétique (polyéthylène, acide poly méthacrylique, polyéthylène glycol, etc) ou hydride (Ahmed, 2015; Caló & Khutoryanskiy, 2015; Shetye et al., 2015; Thiele et al., 2014; J. A. Yang, Yeom, Hwang, Hoffman, & Hahn, 2014). D'autres méthodes de classification des hydrogels sont présentées en Figure 1.1. Grâce à leur grande teneur en eau, leur porosité, leur souplesse et leur capacité à supporter la prolifération cellulaire, les hydrogels miment parfaitement les tissus vivants naturels et sont donc des biomatériaux très prometteurs, hormis leurs faibles propriétés mécaniques (Caló & Khutoryanskiy, 2015; Koetting, Peters, Steichen, & Peppas, 2015; Sivashanmugam, Arun Kumar, Vishnu Priya, Nair, & Jayakumar, 2015).

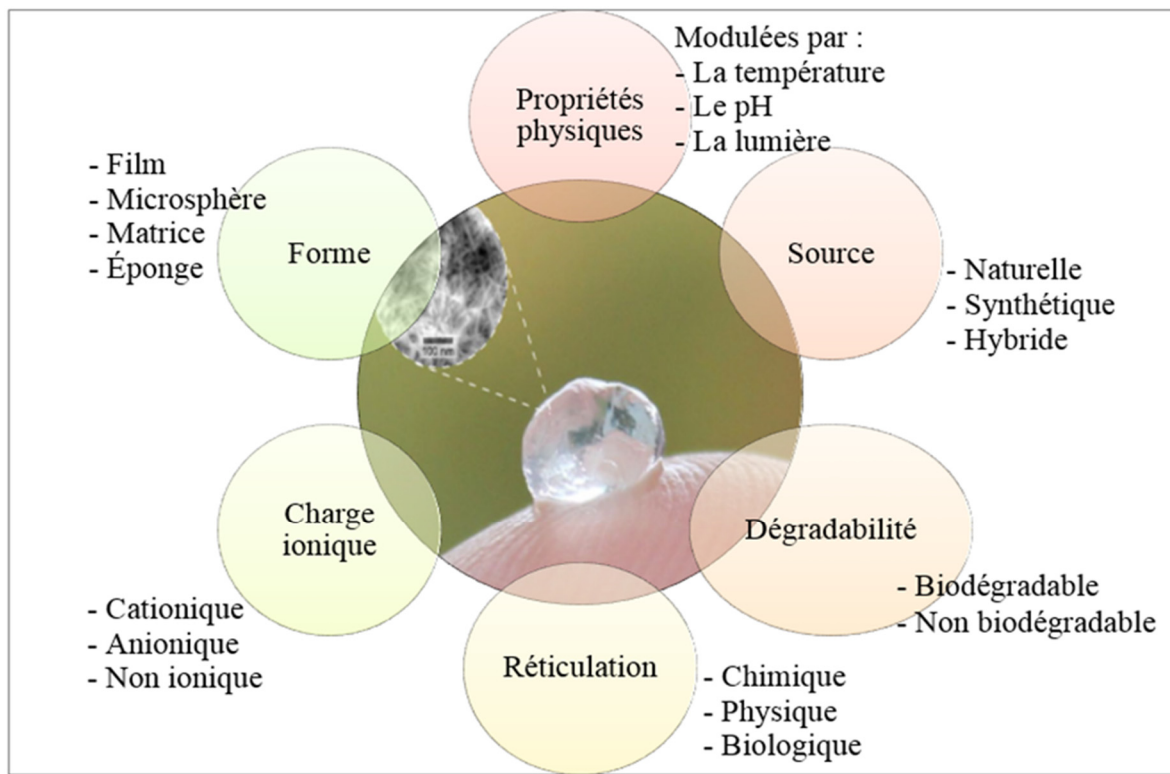


Figure 1.1 : Classification des hydrogels selon leur sources polymériques et leurs propriétés, tiré de (Berger, 2014)

Dans le cadre de cette maîtrise, on s'intéresse particulièrement aux hydrogels injectables, qui ont plusieurs avantages considérables (Sivashanmugam et al., 2015; J. A. Yang et al., 2014):

- Ils s'administrent facilement car ils peuvent être injectés à l'endroit souhaité à l'aide de seringues et d'aiguilles,
- Ils sont compatibles avec la chirurgie mini-invasive, qui permet de réduire les saignements opératoires, la douleur, les cicatrices, les risques d'infection et le temps d'hospitalisation,
- Ils peuvent atteindre des défauts tissulaires profonds et/ou peu accessibles,
- Il est facile d'y incorporer des agents pharmacologiques, des gènes, voire des cellules si leur composition convient,
- Ils s'adaptent parfaitement aux défauts à combler/remplacer, même complexes, du fait qu'ils possèdent une faible viscosité de départ qui leur permet d'être injectés et de durcir *in situ*.

Les hydrogels injectables sont ainsi utilisés pour des applications très diverses, dont deux seront détaillées plus particulièrement dans ce rapport. De façon générale, ils sont prometteurs pour l'ingénierie tissulaire qui se définit par l'utilisation de cellules, de matrices et de facteurs biochimiques afin de rétablir, de remplacer ou d'améliorer des tissus biologiques endommagés (Ahmed, 2015; Caló & Khutoryanskiy, 2015; Shetye et al., 2015; Sivashanmugam et al., 2015; Ullah et al., 2015; Upadhyay, 2017). Il existe un grand nombre de méthodes de préparation des hydrogels injectables mais dans le cadre de cette étude, nous nous intéresserons à des hydrogels répondant à des stimuli tels que la température et le pH (Sivashanmugam et al., 2015; Ullah et al., 2015; J. A. Yang et al., 2014). Ces hydrogels 'intelligents' subissent des changements de leur structure, de leur réseau polymérique et de leurs propriétés mécaniques lorsque le pH, la température et/ou la force ionique varient.

1.1.2 Critères pour la conception d'hydrogels injectables et propriétés

Etant donné que les tissus de notre corps possèdent des caractéristiques et des fonctions très différentes, il est important de pouvoir caractériser adéquatement les matériaux qui vont les remplacer. De plus, la nature chimique et le mécanisme de formation du gel influencent fortement la compatibilité du biomatériau à contenir des cellules viables. Les paramètres primordiaux qui définissent la structure et les propriétés biologiques et mécaniques des hydrogels sont les suivants:

Propriétés de gonflement : le taux de gonflement à l'équilibre d'un hydrogel détermine sa capacité à absorber l'eau, et influence notamment ses propriétés mécaniques. Les propriétés de gonflement sont gouvernées par le type de polymère, sa concentration, la densité de réticulation et les facteurs environnementaux tels que la température, le pH et la force ionique (Ebara et al., 2014; Shetye et al., 2015). En effet, les chaînes polymériques interagissent avec les molécules d'eau et tendent à se dilater. Au contraire, le réseau polymérique, réticulé physiquement ou chimiquement, applique des forces attractives qui retiennent les chaînes. L'équilibre est atteint lorsque les forces de répulsion et d'attraction se compensent (Ebara et al., 2014).

Propriétés mécaniques : l'hydrogel doit pouvoir résister aux contraintes corporelles sans pour autant être fragile et cassant. De plus, en ingénierie tissulaire, on cherche généralement à remplacer le tissu cible par un biomatériau ayant des propriétés mécaniques équivalentes. Comme les tissus mous, les hydrogels présentent un caractère viscoélastique qui rend délicate la caractérisation de leurs propriétés mécaniques. En effet, dans l'hydrogel, la phase liquide peut se déplacer au sein du réseau polymérique et les propriétés mécaniques dépendent alors notamment de la vitesse de déformation, du temps et de la température. La rigidité des hydrogels est communément évaluée à titre comparatif grâce à leur module élastique (module d'Young) par des essais en cisaillement et/ou en compression, et plus rarement en tension (Ebara et al., 2014; Sivashanmugam et al., 2015). La rigidité des gels peut être influencée par de nombreux paramètres tels que la concentration en polymère, la méthode de préparation, le taux de gonflement et le mode et degré de réticulation (Ebara et al., 2014).

Cinétique de gélification : un temps de gélification relativement court permet d'éviter la fuite de l'hydrogel hors du site dans lequel il est injecté, mais il doit cependant être suffisamment long pour permettre la migration du liquide jusqu'au site d'intérêt. La rhéologie permet d'évaluer le module de conservation G' et le module de perte G'' en fonction du temps. G' représente la composante élastique en cisaillement et la portion réversible de la déformation, alors que G'' représente la composante visqueuse de la solution en cisaillement et la portion irréversible de la déformation suite à une sollicitation. Lorsque $G' < G''$, le matériau possède des propriétés attribuables aux liquides et lorsque le processus de gélification commence, G' va dépasser G'' , le matériau possédant alors des propriétés qui se rapprochent des solides (J. Cho, Heuzey, Bégin, & Carreau, 2006).

Porosité: la porosité est un des paramètres les plus importants pour assurer la migration, l'attachement et la prolifération des cellules ainsi que pour le transport des nutriments et l'incorporation de médicaments. La taille de pores idéale est cependant encore débattue et dépend du type cellulaire (de quelques micromètres à quelques centaines de micromètres) (Loh & Choong, 2013). Différentes techniques existent pour créer de la porosité (réticulation, lyophilisation, gaz CO₂) et l'analyse de la morphologie des gels peut être évaluée par microscopie électronique à balayage (Sivashanmugam et al., 2015). Cependant, cette technique présente des limites car elle analyse un hydrogel sec dont la structure et la porosité peuvent avoir été modifiée par le procédé de séchage (lyophilisation).

Biocompatibilité : étant donné qu'ils vont être en contact avec des tissus humains, il est important que les hydrogels n'engendrent pas de réponses inflammatoires ou immunitaires. Pour cela des tests de cytotoxicité et de toxicité *in vivo* sont exigés. La biocompatibilité se définit comme l'absence de réponses adverses de l'hôte aux niveaux local et systémique, ainsi qu'une réaction biologique appropriée pour l'application ciblée. Dans le cas où l'hydrogel sert de matrice pour injecter des cellules, il faut également qu'il permette une bonne survie et prolifération cellulaires.

Biodégradabilité : la vitesse de dégradation doit être comparable à la vitesse de régénération du tissu natif. Une dégradation trop lente empêcherait le tissu de se réparer et une dégradation trop rapide occasionnerait une perte des propriétés du tissu qui doit être remplacé. La capacité des hydrogels à se résorber peut être provoquée par voies enzymatique, hydrolytique ou environnementale (pH, température, etc...).

Dans les sections suivantes, nous décrirons deux applications particulièrement intéressantes, la prévention des adhérences tissulaires et la régénération du cartilage, pour lesquelles il n'existe pas encore de traitements efficaces qui puissent être appliqués en chirurgie mini-invasive. Nous préciserons les critères du cahier des charges d'un hydrogel injectable idéal pour ces deux applications. Par la suite, nous détaillerons plus particulièrement les hydrogels de chitosane et leur potentiel pour ces applications.

1.2 Hydrogels injectables pour la prévention des adhérences tissulaires

1.2.1 Adhérences tissulaires : incidence et pathophysiologie

Les adhérences tissulaires sont des processus pathologiques qui consistent en l'union des surfaces opposées d'une blessure. Celles qui nous intéressent ici sont les adhérences intrapéritonéales qui sont un fardeau pour la santé publique. Elles se produisent suite à des chirurgies pelviennes et abdominales (cholécystectomie, gastrectomie, appendicectomie, etc) et apparaissent dans 67% à 93% des cas et jusqu'à 97% lors de chirurgies gynécologiques ouvertes (Alonso, Alves, Watanabe, Rodrigues, & Hussni, 2014; Diamond & Freeman, 2001; Ergul & Korukluoglu, 2008; Gao et al., 2013; Liakakos, Thomakos, Fine, Dervenis, & Young, 2001; Ward & Panitch, 2011). Ces adhésions sont des liaisons entre les surfaces des cavités péritonéales ou pelviennes formées durant la cicatrisation; elles peuvent se présenter sous forme de films fins de tissus conjonctifs jusqu'à d'épais tissus fibreux vascularisés (Hellebrekers, Trimpos-Kemper, Trimbos, Emeis, & Kooistra, 2000).

Les adhérences intrapéritonéales peuvent aboutir à des complications sérieuses telles que des occlusions intestinales, des douleurs chroniques, des infections, et un risque d'infertilité (Alonso et al., 2014; Cheong, Laird, Shelton, Ledger, & Cooke, 2001; Ergul & Korukluoglu, 2008; Gao et al., 2013; Hellebrekers et al., 2000; Kamel, 2010; Liakakos et al., 2001). En effet, on estime à 40% le nombre d'occlusions intestinales liées à des adhérences tissulaires et 60 à 70% touchent l'intestin grêle (Cheong et al., 2001; Schnuriger et al., 2011). Opérer sur des tissus adhérents s'avère alors très risqué : perte de sang, dommages graves aux organes, augmentation du temps de chirurgie et des risques associés.

Les adhérences postopératoires sont une grande cause de frustrations chez les chirurgiens car l'origine de leur formation est, encore de nos jours, mal comprise. Connaître les mécanismes de formation des adhérences est cependant indispensable pour développer des stratégies efficaces afin de les prévenir.

La Figure 1.2 résume les processus menant aux adhérences tissulaires. La membrane péritonéale est constituée de cellules mésothéliales (le mésothélium), qui sont très sensibles au moindre traumatisme et sécrètent des interleukines (IL2 et IL6) et différents facteurs de croissance et marqueurs tumoraux (TGF β et TNF α) (Alonso et al., 2014). Lorsque ce tissu subit une agression, la réponse vasculaire entraîne un processus complexe qui fait intervenir plusieurs types cellulaires, cytokines, facteurs de coagulation et protéases (Alonso et al., 2014; Cheong et al., 2001; Kamel, 2010; Schnuriger et al., 2011; Ward & Panitch, 2011). L'agrégation des plaquettes active le début de la coagulation tandis que la libération de cytokines au sein de cet environnement inflammatoire stimule la migration cellulaire.

La réaction inflammatoire qu'induit la blessure provoque la formation d'un exsudat riche en fibrine qui fait partie du processus de réparation tissulaire, en fournissant une matrice pour la propagation des fibroblastes et des nouveaux vaisseaux sanguins, tout en connectant les tissus abîmés entre eux (Alonso et al., 2014; Hellebrekers et al., 2000). Cependant, la dissolution de la fibrine lors de la fibrinolyse est une étape clé dans la formation des adhésions. Ce processus clôtur la coagulation, sert à empêcher la formation de thrombose et encourage la guérison. Cependant, si elle ne se produit pas durant les 5 à 7 jours suivant l'opération, la matrice de fibrine temporaire va perdurer et devenir plus organisée pour ensuite former des adhérences (Alonso et al., 2014; Cheong et al., 2001; Hellebrekers et al., 2000; Kamel, 2010; Liakakos et al., 2001).

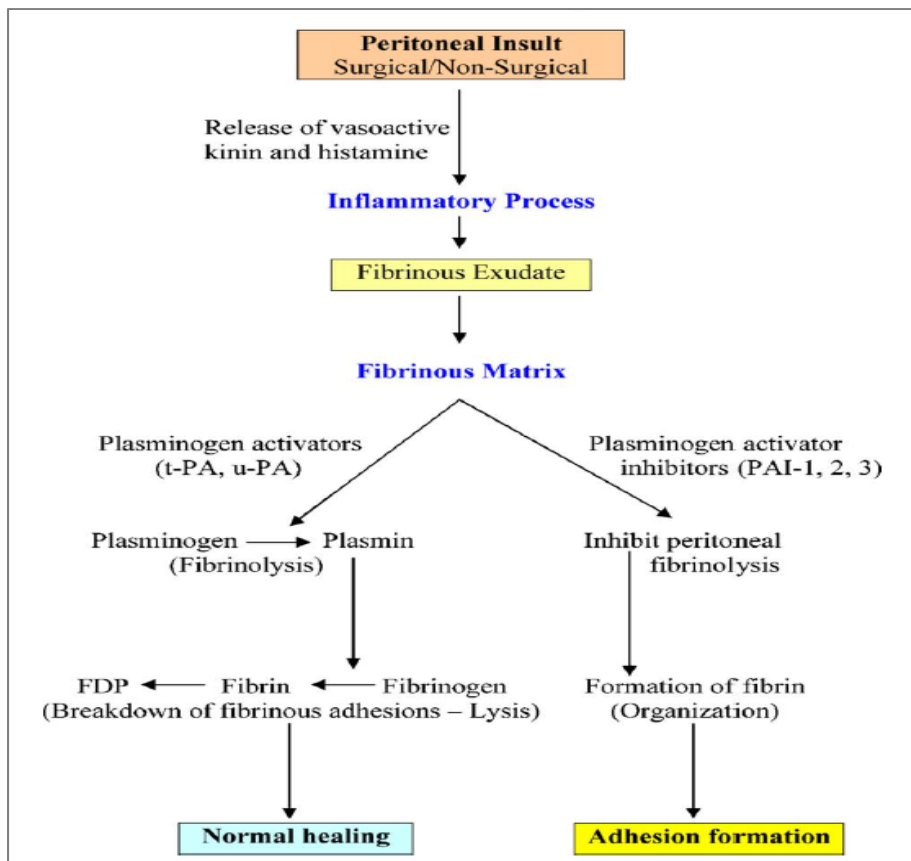


Figure 1.2: Mécanisme de guérison du péritoine (Kamel, 2010)

1.2.2 Les stratégies de prévention existantes et leurs limites

La prévention des adhérences intrapéritonéales peut s'effectuer par diverses stratégies (Alonso et al., 2014; Cheong et al., 2001; Ergul & Korukluoglu, 2008; Kamel, 2010; L. Li et al., 2014; Schnuriger et al., 2011; Ward & Panitch, 2011; Yeo & Kohane, 2008; E. Zhang et al., 2017) :

Techniques chirurgicales : une approche par laparoscopie (technique d'endoscopie médicale qui utilise un tube optique et une caméra) entraîne un risque d'apparition d'adhérences bien plus faible qu'une chirurgie ouverte (laparotomie). De plus, des procédures antiseptiques très strictes doivent être suivies afin d'éviter tout risque d'infection supplémentaire. L'utilisation de gants synthétiques sans poudres, le maintien de l'homéostasie physiologique, une irrigation abondante ainsi que l'utilisation de sutures biocompatibles sont exigées.

Agents pharmacologiques : anticoagulants (héparine), anti-inflammatoires (aspirine, acide rétiné, hydrocortisone, ibuprofène, etc), agents fibrinolytiques (papaine, pepsine, trypsine, imidazole, lysozyme, polyglutamate, etc), antibiotiques (céphalosporines, céfazolin, etc), hormone (progestérone, œstrogène). L'inconvénient de ces agents pharmacologiques est qu'ils peuvent se répandre sur des zones non désirées et engendrer des complications. Leur administration par voies orale ou intraveineuse rend leur action encore plus limitée.

Barrières mécaniques solides : les barrières solides constituent la catégorie de prévention la plus efficace car elles forment une séparation physique entre les tissus endommagés (Alonso et al., 2014; Ward & Panitch, 2011). Seprafilm® ou Interceed®, présentées dans le Tableau 1.2.1, sont les seules barrières de prévention d'adhérences approuvées par la FDA (Food and Drug Administration) aux États-Unis. Seprafilm® est approuvée pour la prévention des adhérences abdominales et pelviennes, et Interceed® est approuvée pour la prévention des adhérences gynécologiques (Ward & Panitch, 2011).

L'inconvénient principal de ces barrières mécaniques solides est qu'il est difficile de les manipuler pour leur donner la forme que l'on désire, car elles sont très collantes. En effet, il est alors parfois impossible de recouvrir la surface nécessaire (L. Li et al., 2014). De plus, ces matériaux sont souvent non compatibles avec un traitement par laparoscopie ce qui est pourtant un critère indispensable si l'on veut avoir recours à une chirurgie mini-invasive. Aussi, lorsqu'ils ne sont pas biodégradables (Preclude® ou Gore-Tex®), l'utilisation de ces matériaux nécessite une deuxième intervention pour le retirer, ce qui peut occasionner encore plus de complications et de risques d'adhérences.

Tableau 1.2.1 : Liste non exhaustive de barrières solides pour la prévention des adhérences postopératoires

Nom du produit	Composition	Avantages	Désavantages
Seprafilm®	Acide hyaluronique + Carboxyméthyl cellulose	Anti-adhérence avérée pour des modèles de rats, lapins et chiens. Peut être utilisé en présence de sang	Effets contestés chez l'homme, manipulation difficile (collant et cassant), non compatible en laparoscopie, peut causer inflammation, abcès, embolie pulmonaire
Interceed®	Cellulose oxydée	Biodégradable sous 2 semaines, facile à manipuler, s'adapte au contour, pas besoin de suture, compatible en laparoscopie	Manipulation difficile, peut engendrer des adhérences s'il est plié ou superposé, produit inefficace en cas d'infiltration sanguine
Preclude® Gore-Tex®	Polytétrafluoroéthylène expansé (ePTFE)	Plus efficace qu'Interceed® pour certains modèles animaux. Très peu réactif	Performances dépendantes du modèle, difficile à manipuler, requiert des sutures, non biodégradable, non applicable en laparoscopie
Repel®	Oxyde d'éthylène + Acide lactique	Efficacité comparable à Seprafilm®	Pas affecté par la présence de sang

Dans ce projet de maîtrise, l'efficacité d'une formulation d'hydrogel de chitosane va être comparée avec le produit Interceed®. Voici quelques détails supplémentaires sur ce produit : Interceed® Adhesion Barrier (TC7, Johnson & Johnson Medical Inc) est un tissu synthétique composé de cellulose oxydée régénérée, qui est un dérivé insoluble de la cellulose.

La cellulose oxydée régénérée est utilisée depuis les années 40 en tant qu'agent hémostatique (AltaylarMedical, 2013). En effet, ce matériau gonfle lorsqu'il s'hydrate au contact du sang ou des fluides et gélifie, formant un caillot sanguin artificiel gélatineux car le pH acide du matériau dégrade les cellules sanguines et active les plaquettes. Malgré le fait qu'Interceed® soit composé de cellulose oxydée régénérée, il ne doit, au contraire, pas être utilisé en présence de sang car le matériau va former un caillot artificiel qui va empêcher une bonne irrigation et donc l'accumulation de fibrine et un risque de formation d'adhérences (Franklin, Trout, & Marks, 2009; Liakakos et al., 2001; Ward & Panitch, 2011).

Interceed® est principalement utilisé en laparotomie, même si son usage en laparoscopie est possible, il est néanmoins difficile à mettre en place et cette méthode n'est pas approuvée par la FDA. Interceed® ne nécessite pas de sutures car son aspect gélatineux fait qu'il colle facilement aux organes et il se dégrade sous une à deux semaines (Schnuriger et al., 2011; Ward & Panitch, 2011). Le brevet US 20130084324 A1 (Adhesion Prevention Fabric) résume l'utilisation de la cellulose oxydée en tant que barrière pour prévenir les adhérences (Gensini, 2011).

Barrières fluides ou gels: les limites des barrières solides ont conduit au développement de barrières fluides ou gels. Elles ont l'avantage de couvrir une plus grande surface de sites à risque que les barrières mécaniques [Tableau 1.2.2].

Au jour d'aujourd'hui, les barrières fluides n'ont pas montré de résultats suffisamment prometteurs pour prévenir les adhérences postopératoires. Seulement Adept® est approuvé par la FDA en chirurgie gynécologique par laparoscopie. Le problème des fluides et des gels est qu'ils ne sont pas assez résistants pour former une barrière efficace (Ward & Panitch, 2011). Aussi, ils sont souvent difficiles à faire perdurer dans le péritoine durant toute la durée du traitement car ce dernier possède une capacité d'absorption de l'eau très importante ce qui occasionne une résorption très rapide de ces barrières hydratées avant que leur efficacité puissent être prouvée (Alonso et al., 2014; L. Li et al., 2014; Ward & Panitch, 2011).

Tableau 1.2.2 : Liste non exhaustive de barrières fluides ou de gels pour la prévention des adhérences tissulaire (Ward & Panitch, 2011)

Nom du produit	Composition	Avantages	Désavantages
Adept®	Icodextrin 4%	Crée une barrière fluide constante entre les tissus. Efficacité contestée suivant les modèles, compatible en laparoscopie. Résorbable.	Peut entraîner hypertension, infection des voies respiratoires, maux de tête, inconfort, inflammation
Hyskon®	Dextran	Crée une barrière fluide constante entre les tissus. Compatible en laparoscopie	Efficacité contestée. Prise de poids, douleurs abdominales, abcès, œdèmes, allergies
Tenalure® Hylagel® Hyalobarrier® CarbylanSX®	Acide hyaluronique	Réduction des adhérences dans de nombreux modèles, peuvent être modifiés pour être injectables. Peu dispendieux. Biorésorbables.	Efficacité contestée. Efficace seulement si appliqué avant la blessure, ne persiste pas assez longtemps pour assurer la guérison
Intergel®	Ferrichyaluronate	Compatible en laparoscopie	Peu efficace, entraîne de nombreuses complications
SprayGel® CoSeal®	Hydrogel de polyéthylène glycol	Efficacité pour quelques modèles animaux	Efficacité contestée chez l'humain
Intercoat®	Carboxyméthylcellulose + polyéthylène oxyde	Efficacité pour quelques modèles animaux	Efficacité contestée chez l'humain

Barrières fluides combinées avant des agents thérapeutiques: la combinaison des gels avec des agents bioactifs a l'avantage de fusionner les bénéfices qu'apportent les deux stratégies séparément. Ainsi, les barrières combinées permettent d'agir à différents niveaux de la pathogénèse de la création des adhérences. Aussi, ce choix permettrait de contrôler la libération de l'agent incorporé en modulant la cinétique de dégradation du gel. Aucune barrière combinée n'est actuellement présente sur le marché mais l'héparine est particulièrement intéressante pour sa combinaison avec une barrière fluide grâce à plusieurs de ses propriétés :

- Cette molécule fait partie de la famille des glycosaminoglycanes et est présente naturellement dans les tissus conjonctifs,
- Elle augmente la stabilité et attire des facteurs de croissance impliqués dans le processus de guérison (Kweon, Song, & Park, 2003),
- Elle possède des propriétés anticoagulantes en se liant avec des protéines plasmatiques et en les activant (l'antithrombine III qui est un inhibiteur des protéases impliquées dans la cascade de la coagulation) (Kweon et al., 2003),
- Elle module plusieurs phases du processus de guérison dont la fibrinolyse (Alonso et al., 2014; Kweon et al., 2003).

1.2.3 Cahier des charges de la barrière idéale

Malgré le fait que le problème des adhérences n'est pas récent, le premier cas post mortem ayant été examiné en 1836 (Ergul & Korukluoglu, 2008), il n'existe pas encore de stratégies parfaites pour prévenir leur apparition ou les guérir. En plus d'être sécuritaire et efficace, voici ce que pourrait être le cahier des charges de la stratégie idéale pour la prévention des adhérences intrapéritonéales (Ergul & Korukluoglu, 2008; Kamel, 2010; L. Li et al., 2014; Shahram et al., 2013; Ward & Panitch, 2011) :

- Elle doit être biocompatible, non-immunogénique et ne pas engendrer d'inflammation
- Elle doit être biorésorbable mais ne doit pas se dégrader avant les 7 jours critiques suivant l'opération. Elle ne doit pas être permanente non plus
- Elle doit pouvoir retenir son eau pour ne pas qu'elle soit absorbée par le péritoine
- La zone endommagée doit être parfaitement recouverte par le matériau
- Elle doit pouvoir prendre la forme de la zone endommagée (même complexe) et doit pouvoir adhérer aux tissus afin d'éviter la pose de sutures qui peuvent être des sites potentiels de création d'adhérences
- Elle doit pouvoir être utilisée par laparoscopie : pour cela, elle doit être injectable et gélifier *in situ*
- Elle doit pouvoir être aussi utilisée en chirurgie ouverte : pour cela, elle doit être facilement manipulable (ne doit pas être trop collante ni cassante mais assez rigide)
- Elle ne doit pas voir ses propriétés modifiées en présence de sang ou de fluides
- Elle doit être assez solide pour servir de barrière et empêcher les tissus d'adhérer
- Elle doit pouvoir être combinée à un agent thérapeutique tel que l'héparine pour assurer une prévention encore plus efficace
- Elle doit pouvoir être fabriquée en grande quantité de façon reproductible
- Elle doit pouvoir être stockée quelques mois sans voir ses propriétés altérées
- Elle doit pouvoir être préparée et utilisée facilement par les chirurgiens

Les hydrogels thermosensibles et notamment les hydrogels de chitosane dont nous parlerons plus tard, semblent être des candidats très prometteurs pour la prévention des adhérences postopératoires car leur condition liquide à température ambiante leur permet d'être utilisables en chirurgie mini-invasive, qui réduit ainsi le risque d'adhérences. Il est également possible d'y incorporer des agents tels que l'héparine, ils gélifient ensuite à température corporelle et peuvent former un film rigide sur les tissus endommagés.

1.3 Hydrogels injectables pour la régénération du cartilage

1.3.1 Anatomie et incidence de l'arthrose

L'arthrose articulaire est une des principales causes de douleurs, de perte de fonctions et d'handicap chez les adultes (Arden & Nevitt, 2006; Hebdorn & Häuselmann, 2002; Krasnokutsky, Attur, Palmer, Samuels, & Abramson, 2008). Elle se définit comme une maladie dégénérative du cartilage hyalin (ou articulaire) au niveau des articulations synoviales (genoux, hanches, épaules, doigts, cervicales, pieds).

Le cartilage hyalin se différencie des cartilages fibreux (disques intervertébraux, ligaments) et élastiques (oreilles, larynx). C'est un tissu conjonctif, non vascularisé et non innervé, composé d'un seul type de cellules, les chondrocytes, qui synthétisent la MEC contenant différentes macromolécules, principalement des protéoglycanes (glycosaminoglycanes ou GAGs) et du collagène. Le collagène présent dans la MEC est principalement du collagène de type II qui donne au tissu sa résistance à la torsion et à la tension (Chung, 2009; Sridhar, 2009).

Les chondrocytes baignent dans une MEC constituée d'environ 65 à 85% d'eau (Sridhar, 2009). C'est une des raisons pour laquelle le cartilage peut subir des charges compressives importantes. Cette grande quantité de liquide permet également de transporter les nutriments aux cellules et d'assurer la lubrification des articulations. Les constituants de la MEC du cartilage hyalin sont présentés dans le Tableau 1.3.1.

Contrairement aux tissus musculaires qui comportent environ 35% de cellules, le cartilage en contient seulement environ 3 à 5% (Sridhar, 2009). De plus, après que la formation de l'os soit complétée, les chondrocytes perdent leur activité métabolique et leur capacité à proliférer et les cellules mortes ne sont pas remplacées (Sridhar, 2009). Tous ces facteurs font du cartilage un tissu à faible capacité de régénération.

Tableau 1.3.1 : Constituants de la MEC du cartilage hyalin (Sridhar, 2009)

Constituants de la MEC	Pourcentage du tissu cartilagineux (en masse)
Fluide interstitiel	65-85%
Collagène	10-30%
Protéoglycanes	3-10%
Glycoprotéines autre que le collagène	1-3%

L'arthrose touche principalement les personnes de plus de 65 ans (environ 50%), presque 80% des plus de 75 ans et affecte plus de 20 millions d'individus aux États-Unis (Arden & Nevitt, 2006; Medscape, 2016). Cette maladie engendre aux États-Unis un coût faramineux de 100 milliards de dollars par an (Ammar et al., 2015) et les coûts ne cessent d'augmenter dû au vieillissement de la population (Lohmander, 2000; Medscape, 2016; Mobasheri & Batt, 2016). Au Canada, les dépenses directes engendrées par la prise en charge de l'arthrose étaient de 900 millions de dollars et les coûts indirects (mortalité prématurée, jours d'invalidité, etc) étaient de 3,5 milliards en 1998 (Québec, 2007). L'âge, le sexe, la ménopause, la nutrition, la densité osseuse et la génétique sont des facteurs systémiques qui s'ajoutent aux facteurs mécaniques tels que l'obésité, les blessures, une faiblesse musculaire et l'usure répétitive (sports extrêmes, etc) (Lohmander, 2000). En plus de la douleur, cette maladie présente différents symptômes tels que l'apparition d'ostéophytes (excroissances osseuses entourant l'articulation), un rétrécissement de l'espace articulaire, une sclérose osseuse (augmentation de la densité et épaissement de l'os), une formation de kystes et un contour osseux anormal (Arden & Nevitt, 2006). La maladie se décline en 5 stades, d'après les analyses radiographiques selon le système de Kellgren-Lawrence (Arden & Nevitt, 2006; Québec, 2007):

- Stade 0 : pas de signes d'arthrose
- Stade 1 : suspicion d'arthrose, quelques petits ostéophytes
- Stade 2 : arthrose minime, ostéophytes bien visibles sans diminution de l'espace articulaire
- Stade 3 : arthrose modérée, diminution de l'espace articulaire
- Stade 4 : arthrose sévère, espace articulaire gravement réduit et sclérose osseuse

Ce système de classement présente des limitations car il est difficile d'analyser les radiographies de façon objective; aussi, la douleur des patients dépend de l'articulation malade. En effet, une arthrose des genoux va être douloureuse beaucoup plus tôt que pour les autres articulations et parfois bien avant que l'on observe des symptômes sur les radiographies (Arden & Nevitt, 2006).

1.3.2 Pathophysiologie

Il n'est pas encore certain si l'arthrose est une maladie unique ou si elle est la conséquence de plusieurs troubles qui convergent vers un même dysfonctionnement. Ce qui est sûr, c'est que l'arthrose fait intervenir l'articulation au complet, en plus de l'os sous-jacent, des muscles et des ligaments. Ce n'est donc pas une maladie du cartilage seul, ce que la communauté scientifique pensait initialement (Hebdom & Häuselmann, 2002). Dans un cartilage sain, il existe une balance fragile entre la synthèse et la dégradation de la matrice cartilagineuse, cette dernière étant constamment remodelée par l'activité métabolique des chondrocytes (Mobasheri & Batt, 2016; Sridhar, 2009). Dans le cas de l'arthrose, ce métabolisme peut être altéré et déséquilibré, une augmentation de la dégradation de la MEC étant conjuguée à une diminution de la synthèse de matrice cartilagineuse (Hebdom & Häuselmann, 2002; Krasnokutsky et al., 2008; Sandell & Aigner, 2001).

Au stade précoce de l'arthrose, on observe une augmentation de la production de protéoglycanes et de collagène par les chondrocytes afin de réparer les dommages (Z. He, Wang, Hu, & Zhao, 2017; Hebdom & Häuselmann, 2002; Sandell & Aigner, 2001). Ce stade peut durer des années durant lesquelles on note une réparation du cartilage de type hypertrophique (Medscape, 2016). La prolifération excessive des chondrocytes entraîne leur différenciation qui engendre la création d'une MEC anormale, la mort cellulaire et une diminution de la création de matrice.

Dans les stades plus avancés, la quantité de protéoglycanes chute, entraînant un affaiblissement du cartilage et une perte d'élasticité (Krasnokutsky et al., 2008; Sandell & Aigner, 2001). L'érosion du cartilage provoque un relargage de protéoglycanes et de collagène au sein du liquide synoviale induisant une réaction inflammatoire qui contribue à une érosion supplémentaire. Lorsqu'elle s'étend jusqu'à l'os sous-jacent, ce dernier, dépourvu de la protection du cartilage, doit subir les contraintes de l'articulation dont il n'est pas apte à supporter. L'os réagit en recrutant des cellules et en se vascularisant, il devient alors plus épais et dense, fini par scléroser et par développer des ostéophytes.

1.3.3 Stratégies de traitement existantes et leurs limites

La prise en charge de l'arthrose n'est pas tâche facile car le diagnostic est souvent annoncé lors d'un stade déjà critique. En effet, le cartilage étant un tissu non innervé, la douleur apparaît souvent lorsque l'os est déjà atteint (Sridhar, 2009). De plus, le cartilage endommagé a une capacité de régénération très limitée due au fait que ce tissu est sans structure vasculaire; les cellules du sang ou de la moelle osseuse nécessaires pour le régénérer ne peuvent donc pas se rendre jusqu'au cartilage défaillant (Sridhar, 2009; Vinatier, Mrugala, Jorgensen, Guicheux, & Noël, 2009). Le traitement de l'arthrose doit procurer un soulagement de la douleur ainsi qu'une amélioration de la mobilité. Lorsque l'arthrose est très avancée, des stratégies plus ou moins invasives s'imposent (Ammar et al., 2015; Grainger & Cicuttini, 2004; Z. He et al., 2017; Medscape, 2016; Meng et al., 2017; Rai, Dilisio, Dietz, & Agrawal, 2017; Sridhar, 2009) :

- Les traitements non pharmacologiques : chaud et froid, perte de poids, activité physique, physiothérapie
- Les traitements pharmacologiques : acétaminophène, anti-inflammatoires (oraux et locaux), injections de corticoïdes intra articulaires, capsaïcine (local)
- Les microfractures: fracture au niveau de l'os qui entraîne une libération de cellules souches afin de promouvoir la régénération du cartilage. Cependant cette technique entraîne la formation d'un cartilage fibreux dont les propriétés mécaniques sont plus faibles

- La chondroplastie : remodelage du cartilage, suppression des irrégularités, élimination des fragments abîmés
- L'ostéotomie : section d'une partie du tibia (plus rarement du fémur) afin de rééquilibrer les efforts que subit l'articulation
- Les greffes de cartilage autologue
- L'arthroplastie : remplacements partielle ou totale de l'articulation par une prothèse polymérique, métallique ou céramique

Une stratégie non invasive, la viscosuppléance, consiste à injecter une solution d'acide hyaluronique (composant principal du liquide synovial) au niveau du cartilage articulaire qui va aider à la lubrification de l'articulation et à l'absorption des chocs (Ammar et al., 2015; Richette, 2016; Sridhar, 2009). Cependant, aucune étude n'a prouvé que ce traitement réduise de manière significative les symptômes de l'arthrose à long terme et il est recommandé seulement pour les patients souffrant d'arthrose modérée (Ammar et al., 2015; Campbell et al., 2015; Québec, 2007; Richette, 2016).

Tous ces traitements peuvent réduire la douleur et améliorer la mobilité des patients mais sont temporaires et le remplacement total de l'articulation est souvent requis même si cette chirurgie est très invasive et présente de nombreuses complications.

Les autres traitements présentent des effets modérés voire inefficaces (Lohmander, 2000), et étant donné que cette maladie est progressive, le remplacement de l'articulation par une prothèse est toujours finalement recommandée lors d'arthrose sévère (Jordan, 2003).

1.3.4 Vers la régénération du cartilage

Pour pallier au manque de traitement peu invasif et efficace, de nouvelles stratégies sont en développement. De nombreuses équipes travaillent notamment sur le développement de matrices, contenant ou non des cellules, pour régénérer le cartilage. Parmi ces matériaux, plusieurs sont commercialisés, tels que TRUFIT™ CB Plug® (PLGA et sulfate de calcium, Smith&Nephew), Chondromimetic® (collagène, Tigenix), Cartimaix® (membrane de collagène, Matricel), BST Cargel® (solution de chitosane mélangée à un tampon phosphate, Smith&Nephew), ou JointRep™ (solution de polyglucosamine, OligoMedic Inc). Ces derniers ne contiennent pas de cellules et servent de support mécanique au cartilage défaillant, le temps qu'il se répare. Voici plus de détails sur le produit JointRep™ car son potentiel pour la régénération du cartilage va par la suite être comparé avec les hydrogels de chitosane développés au LBeV.

L'hydrogel JointRep™ est constitué d'une solution de chitosane dont le degré de désacétylation (DDA) est de 98% (Duval, Chaput, Chenite, & Selmani, 2013). Étant donné que le DDA est très proche de 100%, la compagnie parle alors de Polyglucosamine (PG). La solution acide de PG est neutralisée par une solution tampon composée de Carbonate de Glucosamine (GC). Le glucosamine se trouve abondamment dans les tissus et les articulations et sa sécurité et son absence de toxicité ont largement été documentées (Chenite, Chaput, Lerouge, Hui, & Selmani, Article inédit non soumis).

JointRep™ est utilisable en chirurgie mini-invasive grâce au fait que ce matériau est injectable et thermogélifiant. Il peut ainsi être injecté par arthroscopie de façon percutanée et il gélifie ensuite afin de former un gel solide et bioadhésif. Une étude clinique sur 6 mois avec des patients âgés de 18 à 75 ans a été révélée et compare l'efficacité du traitement standard par microfractures avec un traitement le combinant à JointRep™. Le temps de réhabilitation passe de 8 à 2 semaines avec JointRep™, la douleur est réduite et le matériau procure un environnement très favorable à la chondrogenèse, qui génère la repousse du cartilage (Duval et al., 2013; OligoMedic).

Ce produit est actuellement sur le marché dans 15 pays et possède le marquage CE pour traiter les dommages de toutes les articulations du corps. Il répond aux standards internationaux ANSI/AAMI/ISO 10993 et n'a montré aucune cytotoxicité, irritation, mutagénicité, sensibilisation cutanée ou toxicité systémique. Une étude supplémentaire est cependant nécessaire pour que OligoMedic Inc. puisse bénéficier de l'accord de la FDA et ainsi commercialiser leur produit en Amérique du Nord (Duval et al., 2013; OligoMedic). Afin de parvenir à cette approbation, notre laboratoire a réalisé des essais mécaniques sur les gels JointRep™ afin d'évaluer leurs comportements rhéologique et mécanique.

D'autres stratégies plus récentes se focalisent sur la thérapie cellulaire. Plusieurs types de cellules peuvent être utilisés, principalement les chondrocytes et les cellules souches mésenchymateuses (MSCs). L'inconvénient des chondrocytes est qu'ils sont difficiles à cultiver *in vitro* (instabilité, dédifférenciation), sont incapables de réparer des dommages profonds et les tissus de donneurs sont rares (Rai et al., 2017; Vinatier et al., 2009). Les MSCs sont un choix de cellules intéressant car elles sont facilement accessibles (tissus adipeux, moelle osseuse) et ont une grande capacité de prolifération *in vitro* (Meng et al., 2017; Vinatier et al., 2009). Après injection au niveau du cartilage, les MSCs se différencient en chondrocytes capables de sécréter de la MEC (J. Yang, Shrike Zhang, Yue, & Khademhosseini, 2017). L'inconvénient de la thérapie cellulaire est que les cellules injectées ne possèdent pas de support qui facilite leur positionnement et leur rétention au niveau du site défectueux, et elle finissent par mourir d'apoptose et de nécrose (Vinatier et al., 2009).

L'ingénierie tissulaire permet de répondre à cette limitation en fournissant une matrice biocompatible et injectable dans laquelle les cellules sont encapsulées (Sridhar, 2009; Vinatier et al., 2009; J. Yang et al., 2017). Des biomatériaux, et notamment des hydrogels, ont alors été développés pour servir de matrice tridimensionnelle aux cellules encapsulées. Ils sont classés suivant deux types : les biomatériaux naturels, composés de protéines ou de polysaccharides, et les biomatériaux synthétiques (Iwasaki et al., 2010; Sridhar, 2009). Le Tableau 1.3.2 présente les principales matrices utilisées et approuvées pour la transplantation de cellules afin de régénérer le cartilage.

Tableau 1.3.2 : Principaux matériaux utilisés pour la transplantation de cellules pour le traitement de l'arthrose (Sridhar, 2009; Vinatier et al., 2009)

Types	Matériau	Exemple de produits commercialisés
A base de protéine	Collagène Fibrine	MACI® (Vericel, USA) Maix® (Matricel, Allemagne) Chondro-Gide® (Geistlich Biomaterials, Suisse) CaReS® (Artro-Kinetics, Austria)
A base de polysaccharide	Alginate Agarose Chitosane Acide hyaluronique Cellulose	Hyalograft® + HYAFF-11® (Fidia Advanced Biopolymers, Italie)
Synthétiques	PLGA (acide polylactique-co-glycolique) PLA (acide poly lactique) PEG (polyéthylène glycol) PCL (polycaprolactone)	Bio-Seed®-C (BioTissue Technologies, Allemagne)

Malgré le fait qu'il y a eu, au cours des dernières années, des avancées considérables dans le domaine de l'ingénierie tissulaire du cartilage, il y a encore de nombreux défis à relever, notamment pour pouvoir développer des hydrogels avec des propriétés mécaniques en compression et en cisaillement suffisamment élevées pour supporter les contraintes que subit l'articulation. Aussi, un aspect critique est d'améliorer l'activité de cellules encapsulées pour qu'elles sécrètent une MEC aussi abondante et fonctionnelle que dans le cartilage natif.

1.3.5 Cahier des charges du produit idéal

La matrice idéale pour régénérer le cartilage doit répondre à plusieurs critères :

- **Critères mécaniques et fonctionnels**

- Doit pouvoir remplacer mécaniquement le cartilage (résistance et propriétés mécaniques adaptées)
- Doit pouvoir adhérer et s'intégrer au cartilage natif
- Doit être injectable pour pouvoir être utilisée en chirurgie mini-invasive (faible viscosité et gélification *in situ*) et doit pouvoir couvrir facilement la zone d'intérêt
- Doit avoir une porosité permettant de diffuser les nutriments et les déchets des cellules
- Doit se résorber dans un délai qui correspond à la création d'un néo cartilage
- Ne doit pas voir ses propriétés mécaniques altérées en présence de sang ou de fluides
- Doit pouvoir être préparée et utilisée facilement par le chirurgien
- Doit pouvoir être fabriquée en grande quantité de façon reproductible
- Doit pouvoir être stockée quelques mois sans altération des propriétés

- **Critères biologiques**

- Doit être biocompatible, non-immunogénique et ne pas engendrer d'inflammation
- Doit permettre l'intégration des molécules de la matrice extracellulaire au sein du cartilage néoformé
- Si des cellules sont encapsulées, la matrice doit stimuler la croissance cellulaire et la production de MEC. Elle ne doit pas modifier le phénotype des cellules ou doit favoriser leur différenciation dans le cas des cellules souches

Dans la section suivante, les hydrogels de chitosane thermosensibles seront présentés et apparaissent particulièrement intéressants en raison de leur injectabilité, leur teneur élevé en eau, leur biodégradabilité, leur porosité et leur biocompatibilité. De plus, la composition du chitosane ressemble beaucoup à celle des GAGs, composants principaux de la MEC du cartilage, ce qui rend leur utilisation comme matrice pour la régénération du cartilage un choix très prometteur.

1.4 Les hydrogels de chitosane

1.4.1 Le chitosane

Le chitosane est un polysaccharide linéaire naturel composé de deux unités monomériques distribuées aléatoirement: un groupement D-glucosamine (Glc) désacétylé et un groupement N-acétyl-D-glucosamine (Glc-N-Ac) acétylé [Figure 1.3] (Croisier & Jérôme, 2013). Chaque chaîne est caractérisée par un degré de désacétylation (DDA) qui indique la redondance du motif Glc dans la chaîne. Réciproquement, le degré d'acétylation (DA) est le pourcentage d'unités acétylées par rapport aux unités totales.

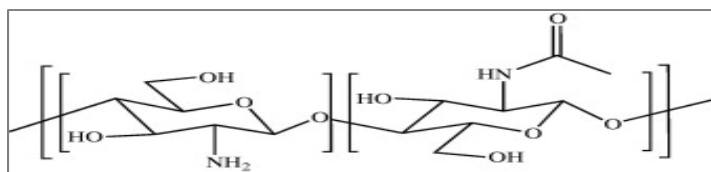


Figure 1.3 : Schématisation de la structure du chitosane

Le chitosane est produit par la désacétylation de la chitine qui est le deuxième polymère naturel le plus abondant après la cellulose, et constitue l'exosquelette des crustacés ou l'endosquelette des céphalopodes (Chenite et al., 2000). On parle de chitosane lorsque le DDA est supérieur à 50% (Bhattarai, Gunn, & Zhang, 2010; Croisier & Jérôme, 2013; Rinaudo, 2008). Le chitosane peut être caractérisé grâce à différents paramètres physico-chimiques:

- Son **degré de désacétylation** qui a un impact sur sa solubilité, son processus de gélification et sa cinétique de dégradation,
- Sa **masse moléculaire** qui dépend de la longueur des chaînes macromoléculaires. La masse moléculaire moyenne du chitosane varie entre 50 et 2000 kDa (Chenite et al., 2001) ou entre 300 et 1000 kDa (Croisier & Jérôme, 2013; Kim et al., 2008) selon les études. La masse moléculaire influence directement la viscosité de la solution de chitosane et donc ses propriétés mécaniques. Comme tout polymère, la variabilité de la longueur des chaînes s'exprime via l'indice de polydispersité (IP) mais ce paramètre est rarement connu.

1.4.2 Les hydrogels de chitosane

Le chitosane est soluble uniquement en milieu acide par protonation des groupements amines des résidus Glc à un pH légèrement acide ($pK_a=6,5$) (Chenite et al., 2001). Les groupements $-NH_2$ deviennent $-NH_3^+$, et lorsque la molécule est suffisamment ionisée, la génération de forces électrostatiques répulsives entre les groupements chargés assure la solubilisation du chitosane. Cependant, une modification du pH ou de la force ionique peut perturber cet équilibre précaire et induire une déionisation et la précipitation du chitosane (Chenite et al., 2001; Croisier & Jérôme, 2013; Lavertu, Filion, & Buschmann, 2008; Rinaudo, 2008). Après sa stérilisation, la solution de chitosane se présente sous une forme liquide et visqueuse.

Une caractéristique particulièrement intéressante du chitosane est sa capacité à former des gels thermosensibles. Ces derniers, aussi appelés thermogels, sont des hydrogels à stimuli les plus couramment étudiés dans la littérature. Ils subissent des changements de solubilité et des transitions de phases en réponse à une modification de la température. Cette propriété est utilisée pour préparer un hydrogel *in situ*, où une solution de polymère existe à l'état liquide à température ambiante et forme un gel solide à température physiologique (37 °C). Cette propriété permet alors de réaliser une injection à température pièce sous forme liquide, rendant possible un mélange en amont avec des cellules et/ou des médicaments, et une injection par voie parentérale.

Le chitosane est reconnu par la communauté scientifique pour être biocompatible et il possède des propriétés antifongique et antibactérienne (Bhattacharai et al., 2010; Croisier & Jérôme, 2013; Kim et al., 2008; Raafat & Sahl, 2009; Rinaudo, 2008). Il est également non toxique et non allergénique (Bhattacharai et al., 2010; Croisier & Jérôme, 2013; Kim et al., 2008; Raafat & Sahl, 2009; Rinaudo, 2008; Zhou et al., 2015) et la LD50 (mort de 50% des sujets) chez la souris est de 16 g/jour/kg, ce qui est supérieur au LD50 du saccharose (Raafat & Sahl, 2009). La biocompatibilité du chitosane augmente pour des DDA élevés car l'augmentation des charges positives induit plus d'interactions avec les cellules (Croisier & Jérôme, 2013).

Le chitosane est également mucoadhésif car ses groupements amines chargés positivement peuvent interagir avec la mucine, qui est une glycoprotéine chargée négativement présente dans le mucus. Plus le DDA augmente et plus le nombre de charges positives est élevé et les propriétés mucoadhésives s'améliorent (Bhattarai et al., 2010; Croisier & Jérôme, 2013; Kim et al., 2008; Raafat & Sahl, 2009; Zhou et al., 2015). Grâce à ses charges positives, le chitosane possède aussi des propriétés hémostatiques car il peut interagir avec la membrane des globules rouges chargée négativement (Croisier & Jérôme, 2013; Kim et al., 2008; Raafat & Sahl, 2009; Rao & Sharma, 1997).

Plusieurs méthodes peuvent être utilisées pour faire de cette solution de chitosane un gel consistant et rigide. Par exemple, l'ajout d'une base faible telle que du sel disodique β -glycérophosphate (BGP), permet de produire un thermogel de chitosane gélifiant à la température du corps et possédant un pH physiologique. Chenite et al (2001), ont été les premiers à ajouter du BGP pour permettre à la solution pH-dépendante de chitosane de devenir une solution pH-dépendante et contrôlable par modification de la température. En effet, le BGP possède des groupements hydroxyles -OH qui jouent un rôle de tampon et stabilisent la solution de chitosane. De plus, le BGP est chargé négativement et est donc attiré par les groupements -NH_3^+ du chitosane [Figure 1.4] (Chenite et al., 2001). Les groupements -OH du BGP contrôlent les liaisons hydrogènes entre les molécules de chitosane et permettent de garder le polymère en solution même à un pH supérieur au pKa du chitosane qui est de 6,5 (Chenite et al., 2001; Chenite et al., 2000; Coutu, 2012). Lorsque la température augmente, le mouvement des protons H^+ du chitosane entraîne un rapprochement avec les groupements chargés négativement du BGP, et la solution de chitosane se neutralise. Les forces attractives deviennent plus fortes que les forces répulsives entre les chaînes ce qui engendre la création d'un gel physique (Lavertu et al., 2008).

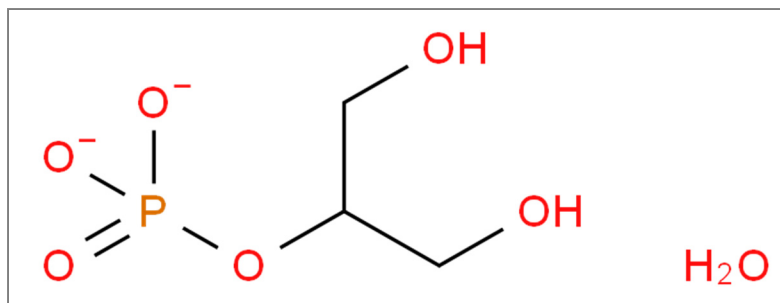


Figure 1.4 : Schématisation de la structure chimique du BGP

Propriétés mécaniques et biologiques des hydrogels de chitosane :

Les hydrogels de chitosane possèdent des propriétés intéressantes pour leur utilisation dans le domaine biomédical. Ils présentent une structure poreuse interconnectée qui permet aux cellules d'adhérer, de migrer et de proliférer. La porosité autorise le vasculogénèse, le transfert de nutriments et de déchets (Kim et al., 2008). De plus, ils sont biodégradables (par voie enzymatique ou chimique), ce qui assure une cicatrisation naturelle des tissus sans conservation d'un matériau permanent (Bhattacharai et al., 2010; Croisier & Jérôme, 2013; Kim et al., 2008; Raafat & Sahl, 2009; Rinaudo, 2008). De nombreuses recherches se sont concentrées sur l'étude de la cinétique de dégradation d'hydrogels de chitosane en présence de lysozyme car c'est une enzyme que l'on rencontre dans diverses sécrétions humaines (larmes, salive, lait maternel, mucus), dans le sérum et dans un grand nombre de tissus (Han, Nwe, Furuike, Tokura, & Tamura, 2012; Nwe, Furuike, & Tamura, 2009; Onishi & Machida, 1999; Ren, Yi, Wang, & Ma, 2005; Rokhati, Widjajanti, Pramudono, & Susanto, 2013). Cette protéine hydrolyse les liaisons N-acétylglucosamine de la chitine et du chitosane (liaison entre deux groupements acétyles).

Les faibles propriétés mécaniques des hydrogels de chitosane traditionnels sont leur principale limite. Ainsi, Assaad et al. ont montré que quelque soit la concentration en BGP, le module sécant des hydrogels de chitosane/BGP ne dépasse pas les 10 kPa. Leur faible rigidité est un inconvénient majeur à l'utilisation d'hydrogels de chitosane/BGP (Assaad, Maire, & Lerouge, 2015; Bhattacharai et al., 2010; Croisier & Jérôme, 2013; Jin et al., 2009; Zhou et al., 2015).

De plus, l'utilisation de hautes concentrations en BGP requises pour une gélification rapide diminue la biocompatibilité du gel, ce qui causerait une mort des cellules encapsulées, dû à une augmentation de l'osmolarité du gel (Ahmadi & de Bruijn, 2008; Ceccaldi et al., 2017; Monette et al., 2016; Riva et al., 2011; Zhou et al., 2015). Pour ces deux raisons, le LBeV a développé de nouveaux agents gélifiants qui seraient biocompatibles et qui engendreraient la formation d'hydrogels de chitosane avec une résistance mécanique optimale et une vitesse de gélification adaptée. Des travaux antérieurs du laboratoire ont ainsi montrés que la combinaison de bicarbonate de sodium (Sodium Hydrogen Carbonate, désormais SHC) avec un tampon phosphate (Phosphate Buffer, PB) ou du BGP (β -glycérophosphate) améliore nettement les propriétés mécaniques et accélère la gélification (Assaad et al., 2015; Ceccaldi et al., 2017; Monette et al., 2016). De plus, des tests de cytocompatibilité *in vitro* ont pu démontrer une meilleure biocompatibilité de ces nouveaux gels grâce à une diminution de la concentration en sel.

1.4.3 Avantages et limites des hydrogels de chitosane du LBeV pour la prévention des adhérences tissulaires et la régénération du cartilage

Hydrogel de chitosane pour la prévention des adhérences tissulaires :

Plusieurs chercheurs ont déjà étudié le potentiel d'hydrogels de chitosane pour la prévention des adhérences postopératoires mais la plupart des matériaux développés présentaient des inconvénients non négligeables [Tableau 1.4.1]. Ainsi, outre ceux cités précédemment, les hydrogels développés au sein de LBeV présentent plusieurs avantages déterminants pour leur utilisation dans le cadre de la prévention des adhérences tissulaires :

- Ils sont faciles à préparer par simple mélange de deux solutions comparativement aux études 1, 3 et 6 présentées dans le Tableau 1.4.1
- Ils sont stables à température ambiante et gélifient rapidement à 37°C contrairement aux études 1, 2 et 5
- Ils ont des propriétés mécaniques supérieures à la plupart des hydrogels à base de chitosane. Par exemple, les hydrogels des études 2 et 5 possèdent un module de conservation faible (100 et 800 Pa)

Tableau 1.4.1: Exemples d'hydrogels de chitosane développés pour la prévention des adhérences tissulaires

Références	Composition	Désavantages
<u>1</u> Lauder, 2010	Chitosane modifié/Dextran	Essais <i>in vivo</i> prometteurs mais méthode de préparation du gel complexe : le chitosane est modifié avec de l'anhydride succinique qui nécessite une dialyse pendant 3 jours. Lors du mélange du chitosane et du dextran, il faut attendre 1h pour que la solution deviennent assez visqueuse et qu'elle puisse être injectée.
<u>2</u> Li, 2014	N-O-carboxyméthyle chitosane/Aldéhyde-Acide hyaluronique	Gélification lente ($t_{gel}=80s$) et G' très faible après 1h de gélification (100 Pa). Dégradation importante seulement après 2 jours <i>in vivo</i> .
<u>3</u> Lou, 2012	carboxyméthyle chitosane/dextran oxydé	La synthèse du dextran modifié nécessite 3 jours de dialyse. Aucunes données sur le temps de gélification. 100% de dégradation après seulement 4 jours.
<u>4</u> Shahram, 2013	Chitosane-gélatine	Pas de caractérisation de la cinétique de gélification, pas d'essais de toxicité et de biocompatibilité.
<u>5</u> Wei, 2009	Hydroxybutyle chitosane	La gélification commence à 20°C ce qui peut compromettre l'injectabilité. Faibles propriétés mécaniques ($G'=800$ Pa à 37°C). Pas de dégradation complète en 4 semaines.
<u>6</u> Zhu, 2016	N-O-carboxyméthyle chitosane-fibres de soie	Pas de caractérisation de la cinétique de gélification, pas d'essais de toxicité et biocompatibilité.

Hydrogel de chitosane pour la régénération du cartilage :

Les hydrogels de chitosane ont été largement étudiés pour la régénération du cartilage, non seulement parce qu'ils sont biocompatibles, injectables et biodégradables, mais aussi parce que leur structure chimique ressemble de près aux GAGs, composants principaux de la MEC du cartilage (Arakawa, 2012; J. H. Cho et al., 2004; Choi, Kim, Lin, Wu, & Lee, 2014; Chuah, Peck, Lau, Hee, & Wang, 2017; Z. He et al., 2017; Iwasaki et al., 2010; Jalani et al., 2015; Kuo, Chen, Hsiao, & Chen, 2015; Liu, Ma, Mao, & Gao, 2011; Rai et al., 2017).

Le défi de l'utilisation de matrices pour la régénération du cartilage consiste alors à développer un hydrogel biodégradable et suffisamment résistant pour remplacer le cartilage articulaire qui possède un module d'élasticité variant entre 0,01 et 0,1 GPa (Mansour; Richard, Villars, & Thibaud, 2013). De plus, certaines problématiques critiques demeurent telles que la dédifférenciation de chondrocytes encapsulés, la faible survie et rétention des cellules, leur distribution hétérogène au sein de la matrice et la mauvaise intégration de la néo matrice synthétisée au sein du cartilage (Rai et al., 2017).

Nos hydrogels de chitosane pourraient résoudre certaines de ces problématiques car ils possèdent des propriétés mécaniques plus élevées que la plupart des hydrogels physiques. Cependant, bien que les hydrogels de chitosane développés au LBeV aient une meilleure cytocompatibilité que le chitosane/BGP, leur biocompatibilité semble limitée par le manque d'interactions entre les cellules et la matrice. C'est pourquoi l'ajout d'autres molécules dans l'hydrogel s'avère intéressant. Ici nous ne parlerons que du collagène que nous proposons d'ajouter au chitosane pour créer des hydrogels chitosane-collagène.

1.5 Les hydrogels de chitosane-collagène

1.5.1 Le collagène

Le collagène est la protéine la plus abondante du règne animal et représente près d'un quart de la masse protéique chez l'humain (Parenteau-Bareil, Gauvin, & Berthod, 2010). En effet, le collagène est un constituant majeur de la MEC de tous les tissus conjonctifs (os, cartilage, peau, tendons, ligaments, vaisseaux sanguins) et est indispensable pour le maintien de l'intégrité structurelle des tissus et des organes (Gelse, 2003). Les collagènes ont une localisation tissulaire qui est spécifique de leur type moléculaire. Ainsi le collagène de type I est présent dans les os, le derme, les tendons et les ligaments et les collagènes de type II et XI sont présents dans le cartilage et le disque intervertébral [Tableau 1.5.1].

Tableau 1.5.1 : Les différents types de collagène (Pariente, Villars, & Conort, 2005)

	Type	Formule Moléculaire	Forme Polymérisée	Distribution tissulaire
Formant des fibrilles	I	$[\alpha 1(I)]_2 \alpha 2(I)$	Fibrille	Os, peau, tendons, ligaments, cornée, organes internes (90% du collagène corporel)
	II	$[\alpha 1(II)]_3$	Fibrille	Cartilage, disque intervertébral, notochorde, humeur vitrée
	III	$[\alpha 1(III)]_3$	Fibrille	Peau, vaisseaux sanguins, organes internes
	V	$[\alpha 1(V)]_2 \alpha 2(V)$ et $\alpha 1(V) \alpha 2(V) \alpha (V)$	Fibrille (avec Type I)	Idem Type I
	XI	$\alpha 1(XI) \alpha 2(XI) \alpha (XI)$	Fibrille (avec Type II)	Idem Type II
Associé aux Fibrilles	IX	$\alpha 1(IX) \alpha 2(IX) \alpha (IX)$	Association latérale avec fibrilles de type II	Cartilage
	XII	$[\alpha 1(XII)]_3$	Association latérale avec certaines fibrilles de type I	Tendons, ligaments, certains autres tissus
Formant des réseaux	IV	$[\alpha 1(IV)]_2 \alpha 2(IV)$	Réseau de type feuillet	Lame basale
	VII	$[\alpha 1(VII)]_3$	Fibrilles d'encrage	En dessous de l'épithélium squameux stratifié
Transmembranaire	XVII	$[\alpha 1(XVII)]_3$	Inconnue	Hémidesmosomes
Autres	XVIII	$[\alpha 1(XVIII)]_3$	Inconnue	Lame basale autour des vaisseaux sanguins

Le collagène de type I qui sera utilisé dans le cadre de cette étude, est extrait de peau bovine puis solubilisé dans de l'acide acétique. Il en résulte une décomposition des fibres de collagène en petits agrégats de monomères dispersés dans la solution acide. Les pKa des groupes acides carboxyliques et amines du collagène étant respectivement de 4,1 et 9,3, au-dessous d'un pH de 4, la protonation des groupements amides entraîne la génération de forces électrostatiques répulsives qui assure la solubilisation du collagène (Nishiyama, Suzuki, Nagatsuka, Yokota, & Nemoto, 2003). Tout comme le chitosane, le collagène peut alors former des hydrogels physiques car l'assemblage de fibres de collagène est régi par des interactions électrostatiques et hydrophobes régulées par le pH, la température et la force ionique. Les hydrogels de collagène sont donc injectables à basse température et peuvent gélifier à 37°C *in situ*.

Propriétés biologiques du collagène:

L'intérêt premier pour le collagène est qu'il est un substrat pour les cellules et plus particulièrement pour les fibroblastes et influence la migration, l'attachement, l'adhésion et la différenciation cellulaire (Chevallay & Herbage, 2000; Gelse, 2003; Sweeney et al., 2008). En effet, les cellules sont capables de reconnaître le collagène grâce aux récepteurs intégrines présents sur leurs membranes. Il existe deux sortes d'interactions avec le collagène [Figure 1.5] (Heino, Huhtala, Kapyla, & Johnson, 2009; Parenteau-Bareil et al., 2010):

- Les **interactions directes cellules-collagène** qui mettent en jeu des récepteurs cellulaires qui reconnaissent spécifiquement une séquence de peptide de la molécule de collagène (glycoprotéines, intégrines)
- Les **interactions indirectes cellules-collagène** via d'autres interactions cellules-matrice qui entraînent une stabilisation des cellules au sein de la MEC (fibronectine, laminine, RDG qui se lient aux intégrines)

Ces propriétés biologiques expliquent le large intérêt qu'a suscité le collagène pour la fabrication d'hydrogel, seul ou comme ajout.

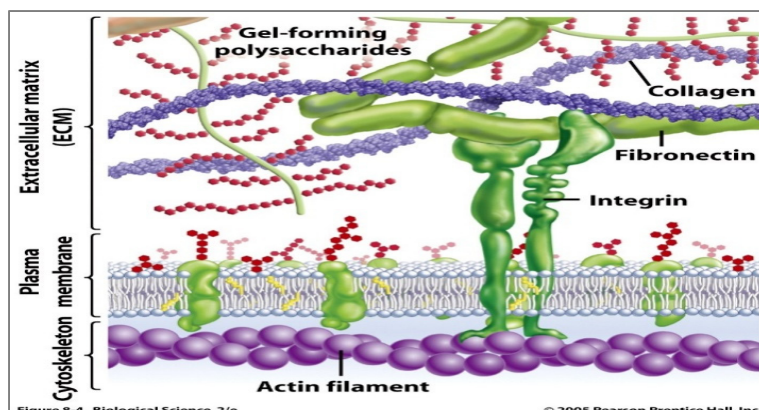


Figure 1.5 : Schématisation des interactions cellules-matrice

1.5.2 Avantages et limites des hydrogels de collagène

Les hydrogels de collagène sont des matériaux très intéressants de par leur excellente biocompatibilité, leur biodégradabilité et l'abondance du collagène. Il est utilisé pour de nombreuses applications en tant que matrice de libération de médicaments et/ou de gènes, peau artificielle pour traiter les brûlures, matériaux pour la culture cellulaire et matrices injectables pour la régénération tissulaire (os, vaisseaux sanguins, valves, peau, nerfs, etc) (Chevallay & Herbage, 2000; Drury & Mooney, 2003; Lee, Singla, & Lee, 2001).

La limitation majeure de l'utilisation d'hydrogels de collagène en ingénierie tissulaire est qu'ils possèdent des propriétés mécaniques très faibles et se dégradent bien trop rapidement. Leurs propriétés mécaniques peuvent être améliorées et stabilisées par diverses réticulations qui modifient les groupements amines et carboxyles du collagène afin de créer des liaisons covalentes: par réticulations chimique (glutaraldéhyde, formaldéhyde, carbodiimides, diisocyanates, génipine), enzymatique (transglutaminase) ou par traitements physiques: rayons UV ou gamma (Chevallay & Herbage, 2000; Drury & Mooney, 2003; Lee et al., 2001; Parenteau-Bareil et al., 2010).

L'utilisation d'agents réticulant tels que les rayons UV ou le glutaraldéhyde permettent d'augmenter la résistance de ces gels mais ils génèrent des résidus cytotoxiques, nécessitent un gel très fin ou transparent pour permettre aux UV de traverser la structure, et ne permettent pas de créer des gels qui gélifient *in situ* (Parenteau-Bareil et al., 2010).

Un autre inconvénient de l'utilisation d'hydrogels de collagène est que l'encapsulation de cellules entraîne une contraction du gel due aux tensions mécaniques exercées au niveau des fibrilles de collagène. Cela occasionne un changement de métabolisme des cellules à cause de l'augmentation de la concentration en collagène lors de sa rétraction (Chevallay & Herbage, 2000; Giraud Guille, Helary, Vigier, & Nassif, 2010; Noth et al., 2007; Plant, Bhadriraju, Spurlin, & Elliott, 2009). L'utilisation de collagène de type I et d'un collagène plus concentré, permettrait de réduire ce phénomène. Le Tableau 1.5.2 résume les avantages et les limitations liés à l'utilisation d'hydrogels de collagène pour des applications en ingénierie tissulaire (Ignat, 2012; Lee et al., 2001)

Tableau 1.5.2 : Avantages et désavantages des hydrogels de collagène

Avantages	Désavantages
Disponibles en abondance	Difficulté d'obtenir du collagène pur de type I
Injectables	Propriétés mécaniques très faibles
Biodégradables	Très hydrophile donc se dégradent très vite
Non toxiques et biocompatibles	Perte des propriétés mécaniques très rapide
Substrat pour les cellules	Peut occasionner sensibilité et allergie
Hémostatiques	Non recommandé dans le cas de sites infectés
Compatibles avec les polymères synthétiques	

Pour pallier à ces limites tout en profitant de ses propriétés biologiques, plusieurs équipes utilisent le collagène en mélange avec d'autres polymères: acide hyaluronique, PLA, PLGA, chitosane, etc.

1.5.3 Les hydrogels de chitosane-collagène

Un mélange de chitosane et de collagène pourrait s'avérer fort intéressant pour pallier à la fois aux limites des hydrogels de chitosane et à celles des hydrogels de collagène. Plusieurs matériaux à base de chitosane et collagène de type I ont ainsi été étudiés pour de nombreuses applications en médecine régénérative de tissus tels que les os, les ligaments, la peau et les vaisseaux sanguins (Wang & Stegemann, 2011). Ces travaux ont montré que le collagène permet d'améliorer les interactions entre les cellules et la matrice (Q. Dang et al., 2017; Fernandes, Resende, Tavares, & Soares, 2011; Martinez, Blanco, Davidenko, & Cameron, 2015; Wang & Stegemann, 2010, 2011). De son côté, le chitosane permet d'augmenter les propriétés mécaniques du collagène et de diminuer sa cinétique de dégradation. En effet des molécules polycationiques telles que le chitosane favorisent la formation d'interactions électrostatiques entre les molécules de collagène, via ses nombreux groupements amines et carboxyles qui sont chargés négativement à pH neutre (Q. Dang et al., 2017; C. Deng et al., 2010; Martinez et al., 2015; Parenteau-Bareil et al., 2010). Des liaisons hydrogènes se forment également entre le chitosane et le collagène et ces liens sont suffisamment résistants pour stabiliser la structure du mélange et augmenter fortement les propriétés mécaniques des gels de collagène.

Il est intéressant de préciser que, tout comme le chitosane, le collagène peut gélifier à 37°C en présence de BGP grâce à la création de liaisons hydrogènes et d'attractions électrostatiques entre le chitosane, le collagène, le BGP et les molécules d'eau [Figure 1.6] (Q. Dang et al., 2017; Moreira, Carvalho, Mansur, & Pereira, 2016; Wang & Stegemann, 2010).

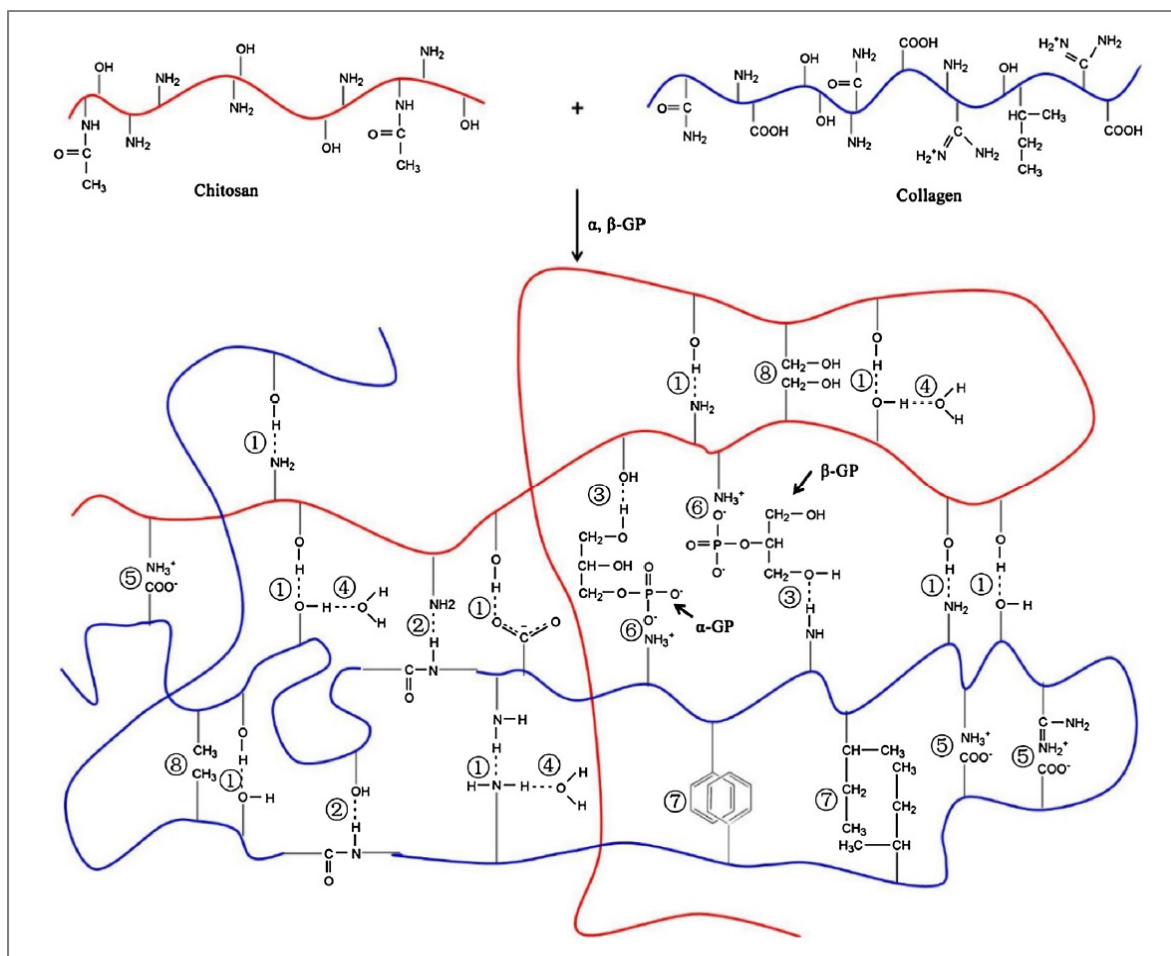


Figure 1.6: Schématisation de la structure du chitosane, du collagène et de leurs interactions (Q. Dang et al., 2017)

De nombreuses équipes de chercheurs se sont penchées sur l'étude des propriétés mécaniques, de la porosité et de la dégradation d'hydrogels de chitosane-collagène (J. M. Dang et al., 2006; C. Deng et al., 2010; Fernandes et al., 2011; Martinez et al., 2015; Moreira et al., 2016; Tylingo, Gorczyca, Mania, Szveda, & Milewski, 2016; Wang & Stegemann, 2010, 2011). Le Tableau 1.5.3 présente les avantages à ajouter du collagène dans les hydrogels de chitosane et inversement:

Tableau 1.5.3 : Avantages des gels hydrides de chitosane-collagène

Avantage de l'ajout de collagène aux gels de chitosane	Avantage de l'ajout de chitosane aux gels de collagène
Augmentation de la porosité	Cinétique de gélification plus rapide
Augmentation de l'interconnexion entre les pores	Augmentation de la résistance et du module d'Young
Augmentation de l'adhésion, de la prolifération et de la différenciation cellulaires	Dégradation plus lente
	Diminution de la contraction du gel en présence de cellules

1.6 Résumé du contexte et objectifs de l'étude

Il existe de nombreuses applications potentielles pour les hydrogels injectables et plusieurs formulations sont sur le marché ou en développement. Malgré les avancées, il est encore difficile de combiner gélification rapide, bonnes propriétés mécaniques, biologiques et compatibilité cellulaire. Les hydrogels de chitosane récemment développés au LBeV rassemblent ces propriétés. L'hypothèse générale de ce projet est qu'ils sont particulièrement intéressants pour deux applications cliniques particulières, soit la prévention des adhérences tissulaires et la régénération tissulaire, notamment du cartilage.

L'objectif général de ce projet de maîtrise est donc d'évaluer et optimiser ces hydrogels à base de chitosane pour ces deux applications spécifiques. Ce projet s'est décliné sous la forme de trois sous-objectifs :

Dans un **1^{er} temps**, nous avons évalué le potentiel des hydrogels de chitosane développés au LBeV en vue de la prévention des adhérences tissulaires. Suite aux essais *in vitro*, une formulation a ensuite été choisie pour des essais *in vivo* chez le rat afin de démontrer le potentiel pour cette application, en comparaison avec un produit commercialisé mais non injectable, Interceed®.

Dans un 2nd temps, nous avons évalué le potentiel de deux formulations d'hydrogels de chitosane pour la régénération du cartilage en les comparant avec le produit JointRep™, commercialisé par la compagnie OligoMedic Inc, qui a été récemment mis sur la marché pour la régénération du cartilage.

Dans ces deux applications, les hydrogels sont utilisés sans cellules. Pourtant, dans le cas de la régénération du cartilage, l'ajout de cellules encapsulées dans le gel permettrait de mieux favoriser la régénération tissulaire. Cependant les travaux antérieurs et la revue de la littérature ont montré une faible interaction des hydrogels de chitosane avec les cellules, ce qui peut limiter leur survie et croissance lorsqu'encapsulées dans l'hydrogel. Ceci limite l'utilisation des hydrogels de chitosane dans les domaines de l'ingénierie tissulaire.

C'est pourquoi **dans un 3^{ème} temps**, nous avons examiné l'effet de l'ajout de collagène aux hydrogels de chitosane développés au LBeV. L'hypothèse est que l'ajout du collagène améliorerait la viabilité cellulaire au sein de nos gels. Pour cela, différents gels de chitosane/collagène ont été produits : leur cinétique de gélification, leur propriétés en compression, leur pH et leur porosité par MEB ont été analysées, ainsi que la survie et la croissance de fibroblastes encapsulés, afin d'évaluer la meilleure formulation possible.

CHAPITRE 2

MATÉRIEL ET MÉTHODES

2.1 Préparation des hydrogels de chitosane

Les hydrogels thermosensibles de chitosane sont des hydrogels physiques préparés par simple mélange de deux solutions, une solution de chitosane légèrement acide et une solution d'agent gélifiant basique, selon un ratio volumique de 3:2. Au-dessus d'un pH de 6,5 et lorsqu'elle est portée à 37°C, la solution de chitosane va précipiter et va former un gel, dû à l'élimination des forces électrostatiques répulsives entre les chaînes et à la création de liaisons hydrogènes et d'interactions hydrophobes.

2.1.1 Purification du chitosane

Le chitosane utilisé (Kitomer, Mw 250 kDa) provient de Marinard Biotech (Rivière-au-Renard, QC, Canada) et possède un degré de désacétylation d'environ 94% d'après le manufacturier. La poudre commerciale est tout d'abord purifiée tel que détaillé en ANNEXE I, afin d'éliminer les impuretés (Assaad et al., 2015). Enfin, le chitosane est congelé pendant une nuit, lyophilisé pendant trois jours puis il est broyé en poudre et tamisé.

2.1.2 Solubilisation du chitosane

Après avoir été purifié, la poudre de chitosane, préalablement broyée, est solubilisée dans de l'acide chlorhydrique concentrées à 0,1 M à hauteur de 3,33% (m/v) pendant une nuit sous agitation. La solution résultante est stérilisée par autoclave (20 min, 121°C) puis stockée à 4°C (Assaad et al., 2015). La solution de chitosane finale doit avoir un pH autour de 6.

2.1.3 Préparation des agents gélifiants

Pour ce projet, plusieurs formulations d'agents gélifiants ont été préparées en utilisant du bicarbonate de sodium (NaHCO_3 , désormais **SHC** pour sodium hydrogen carbonate), combiné soit à du tampon phosphate (phosphate buffer, **PB**) ou du β -glycérophosphate (désormais **BGP**). Le tampon phosphate, à un pH de 8, est préparé en dissolvant du phosphate de sodium monobasique et dibasique avec un ratio molaire de 0,932/0,068. Les solutions de BGP et de SHC sont faites en solubilisant le montant adéquat de sels dans de l'eau Milli-Q. Le Tableau 2.1.1 résume les abréviations utilisées pour nommer les gels en fonction de leur composition en agent gélifiant. En ANNEXE II, est présenté le protocole détaillé pour préparer les agents gélifiants. Pour les essais cellulaires, ces solutions sont préalablement filtrées à travers un filtre 0,22 μm .

Tableau 2.1.1: Abréviations et détails des compositions des différentes formulations d'hydrogels testées (Chit=2% (m/v) pour tous les gels)

Nom du gel	Concentration initiale de l'agent gélifiant (M)			Concentration finale dans le gel (M)		
	PB	BGP	SHC	PB	BGP	SHC
BGP02	-	0,5	-	-	0,2	-
BGP04	-	1	-	-	0,4	-
SHC0075	-	-	0,19	-	-	0,075
SHC005PB004	0,10	-	0,13	0,04	-	0,05
SHC0075PB004	0,10	-	0,19	0,04	-	0,075
SHC005PB008	0,20	-	0,13	0,08	-	0,05
SHC0075PB008	0,20	-	0,19	0,08	-	0,075
SHC005BGP01	-	0,25	0,13	-	0,10	0,05
SHC0075BGP01	-	0,25	0,19	-	0,10	0,075

2.1.4 Préparation des hydrogels de chitosane

Les hydrogels de chitosane sont préparés en mélangeant un des agents gélifiants avec la solution de chitosane à 3,33% (m/v) dans un rapport volumique de 2:3, afin d'obtenir des hydrogels contenant 2% de chitosane et les concentrations en agents gélifiants énoncées à la section 2.1.3 (Assaad et al., 2015; Chenite et al., 2000; Coutu, 2012). Pour procéder au mélange, les solutions de chitosane et d'agent gélifiant sont introduites dans deux seringues puis mixées à température ambiante en effectuant 15 allers retours à l'aide d'un connecteur Luer-Lock femelle-femelle [Figure 2.1].



Figure 2.1: Photographie de la méthode de mélange

2.2 Synthèse des hydrogels de collagène et chitosane-collagène

Nous avons fait l'hypothèse que l'ajout de collagène dans nos hydrogels de chitosane permettrait d'améliorer la survie cellulaire et leur prolifération, tandis que l'ajout de chitosane dans les hydrogels de collagène augmenterait leurs propriétés mécaniques. Nous avons donc développé plusieurs gels avec des ratios (v/v) de chitosane et de collagène différents, afin d'évaluer leur influence sur les propriétés mécaniques et sur la compatibilité cellulaire. Dans ce but, nous avons choisi d'utiliser le produit PureCol®EZ de la compagnie Advanced Biomatrix, avec qui une collaboration a été établie.

2.2.1 PureCol® EZ gel

PureCol®EZ gel (Advanced BioMatrix, USA) est une solution de collagène bovin de type I à 0,5% (m/v), hautement purifiée et qui forme un gel lorsqu'elle est chauffée à 37°C. Ce produit est principalement utilisé pour la culture cellulaire car il est à pH neutre et il contient du milieu de culture DMEM/F-12 et une source de L-glutamine pour les cellules (acide aminé qui joue un rôle biochimique primordial dans la synthèse de protéine). La solution doit être maintenue entre 2 et 10°C pour ne pas qu'elle ne gélifie. Le Tableau 2.2.1 présente les différentes caractéristiques du produit PureCol®EZ gel.

Tableau 2.2.1: Caractéristique du produit PureCol®EZ gel (0.5%)

Température de stockage	2-10°C
Concentration	5 mg/ml (0,5%)
pH	6,9 - 7,4
Temps de gélification	≤ 40 min
Supplément	DMEM-F12, L-glutamine et L-alaline

2.2.2 Préparation des hydrogels de chitosane-collagène

Le Tableau 2.2.2 présente les volumes et concentrations utilisés pour préparer les hydrogels de chitosane-collagène pour un volume final de 1 ml et pour différents ratios volumiques de chitosane/PureCol®. Afin d'étudier l'effet du collagène sur la survie cellulaire, il est essentiel de pouvoir encapsuler les cellules dans les différentes formulations d'hydrogels. À cet effet, il a été choisi d'incorporer les cellules à la solution de collagène PureCol®, qui est à pH neutre, puis d'y ajouter le mélange chitosane et agent gélifiant préalablement mixés [Figure 2.2]. Ceci réduit au maximum les manipulations sur les cellules car si elles étaient incorporées au gel de chitosane, elles subiraient deux mixages de 15 allers retour (un lors du mélange chitosane/agent gélifiant, et un lors du mélange gel de chitosane/PureCol®), ce qui risquerait de les tuer.

L'hydrogel de chitosane est préparé comme explicité dans la section 2.1.4, en mélangeant à l'aide d'un connecteur Luer-Lock, l'agent gélifiant SHC0075PB004 avec la solution de chitosane à 3,33% (m/v) dans les rapports volumiques 2/3 afin d'obtenir des hydrogels contenant 2% de chitosane. La solution de collagène PureCol®EZ gel, contenant ou non les cellules, est ensuite ajoutée au mélange.

Tableau 2.2.2 : Concentrations initiales et finales de chitosane et de PureCol® utilisées pour préparer les gels contenant différents ratios volumiques de chitosane/collagène

Chi/Coll Vol ratio	[Chi gel]_i (% w/v)	[Coll]_i (% w/v)	[Chi gel]_f (% w/v)	[Coll]_f (% w/v)
100/0	2	0	2	0
75/25	2	0,5	1,5	0,125
50/50	2	0,5	1	0,25
25/75	2	0,5	0,5	0,375
0/100	2	0,5	0	0,5

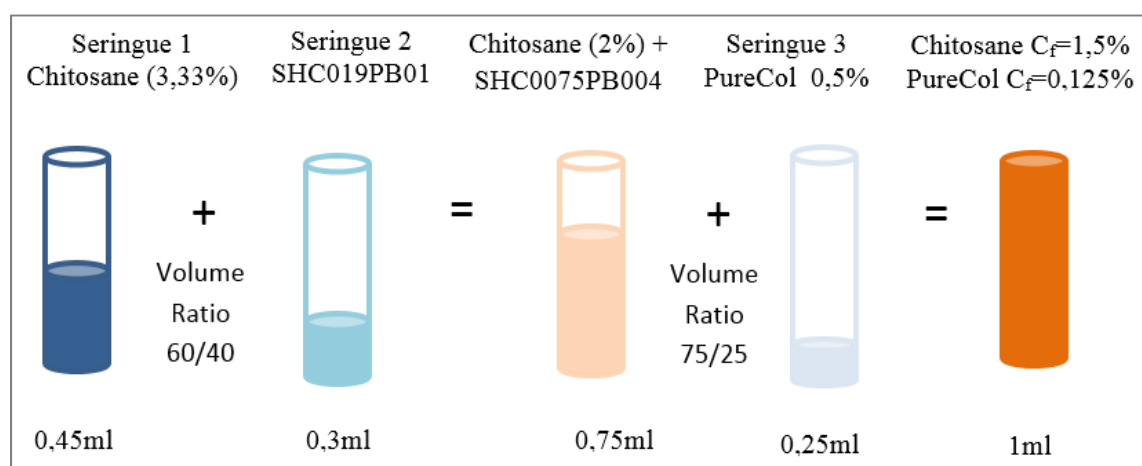


Figure 2.2 : Exemple de préparation d'1 ml de gel pour un ratio volumique de chitosane/collagène de 75/25

2.3 Présentation et préparation du produit JointRep™

L'hydrogel JointRep™ (OligoMedic Inc, Canada) est constitué d'une solution de chitosane purifiée (2% m/v) en solution acide (acide chlorhydrique) dont le degré de désacétylation est égal ou supérieur à 98% (Duval et al., 2013). Étant donné que le DDA est très proche de 100%, la compagnie parle de Polyglucosamine (PG) et non de chitosane même si un tel DDA est très difficile à produire industriellement (X. He et al., 2016). La solution acide est stérilisée par autoclave pendant 45 min à 121°C et après être revenue à température ambiante, elle est filtrée, répartie en aliquots de 5 ml et stockée entre 4 et 8°C. Un kit JointRep™ contient 3 seringues stériles de 5ml :

1. une seringue contenant 3,6 ml de Polyglucosamine (PG)
2. une seringue contenant 0,3 ml de Chlorhydrate de Glucosamine (G)
3. une seringue contenant 0,3 ml de Carbonate de Sodium Na_2CO_3 (C)

La solution de PG est neutralisée grâce à une solution tampon composée de Carbonate de Glucosamine (GC) préparée en mélangeant une solution de Chlorhydrate de Glucosamine (G, PureBulk Inc., USA) et une solution de Carbonate de Sodium (C, JT Baker, USA) (Chenite et al., Article inédit non soumis). Les solutions aqueuses de Chlorhydrate de Glucosamine et de sels de carbonate ont été stérilisées par ultrafiltration et conditionnées en aliquots de 0,3 ml dans des seringues stériles de 5,0 ml qui sont par la suite stockées entre 2 et 8°C.

Toutes les étapes de préparation, de conditionnement et de stockage sont faites dans un environnement stérile contrôlé en accordance avec la norme ISO13485, les bonnes pratiques de fabrication canadiennes et les standard USP (United States Pharmacopedia standards and guidelines).

La quantité de sels utilisée pour préparer 50 ml de solution tampon ainsi que les caractéristiques des composants du produit JointRep™ sont présentées dans le Tableau 2.3.1.

Tableau 2.3.1: Quantité de sels utilisée pour préparer la solution tampon et caractéristiques des composants du produit JointRep™

Préparation de la solution Tampon (50 mL): Carbonate de Glucosamine (GC)	
Chlorhydrate de Glucosamine (g)	5,850
Na ₂ CO ₃ (g)	1,975
pH	7,6-8,0
Caractéristique de la solution de PG (100 ml)	
PG	53,3 mM
GC	77,6 mM
pH du mélange	6,8-7,2

Concernant la préparation des gels, les solutions de Chlorhydrate de Glucosamine et de Carbonate de Sodium sont préalablement mélangées grâce à un connecteur Luer-Lock; ce mélange formera la solution tampon de neutralisation (GC). La solution de Polyglucosamine (PG) est ensuite ajoutée. Dans la solution acide de PG, les groupements -NH₂ sont protonés en -NH₃⁺, et lorsqu'elle est mélangée à la solution de GC contenant des groupements -CO₃²⁻, le mécanisme de gélification est amorcé (Duval et al., 2013; OligoMedic).

2.4 Caractérisations mécaniques

2.4.1 Étude rhéologique

Les propriétés rhéologiques des différentes formulations de gels de chitosane ont été évaluées comme une première estimation des propriétés mécaniques, mais surtout afin de voir si la cinétique de gélification de l'hydrogel est adaptée aux besoins: le gel doit être sous forme liquide et stable pour son stockage, sa préparation et son injection à température ambiante, et il doit gélifier rapidement *in situ* à 37°C pour éviter qu'il ne migre dans des zones non désirées.

Un rhéomètre MCR301® (Anton Paar, Allemagne) équipé d'une géométrie de type Couette cylindrique (CC10/T200) et connecté à un circuit d'eau (Julabo AWC100, Allemagne) ont été utilisés. Immédiatement après le mélange des deux solutions (0,6 ml d'agent gélifiant et 0,9 ml de la solution de chitosane), le gel est injecté dans la cellule de l'appareil et la variation en fonction du temps du module de conservation G' , du module de perte G'' ainsi que de la viscosité complexe est suivie avec une contrainte de cisaillement et une fréquence constantes respectivement de 1 Pa et 1 Hz. Le temps de gélification, ou t_{gel} , est le temps auquel $G'=G''$.

Des tests isothermes ont été réalisés à deux températures différentes (22°C et 37°C), pendant lesquels les valeurs de G' , G'' et de la viscosité complexe sont suivies pendant 1h. Ainsi, il a été possible d'évaluer la cinétique de gélification à température ambiante (indispensable pour comprendre le comportement du gel lors de sa préparation et de son injection) et à température corporelle. Pour mieux comprendre l'effet de la température sur la cinétique de gélification, des essais rhéologiques ont été réalisés en augmentant la température de 5°C et 65°C, à raison de 1°C/min et ce, pendant 1h. La connaissance de la cinétique de gélification de chacune des formulations permet de pouvoir prédire leurs comportements et en définir les conditions d'utilisation.

2.4.2 Injectabilité et étalement sur une surface

L'intérêt d'un matériau injectable est qu'il autorise une approche mini-invasive. Il n'existe pas de définition précise de l'injectabilité, les chercheurs utilisent donc plusieurs paramètres pour caractériser la notion d'injectabilité, parmi lesquels:

- La pression d'injection, qui doit être suffisamment faible pour que le gel soit injectable sans effort par le praticien
- L'homogénéité et la continuité du gel extrudé
- L'absence de séparation de phases (liquide et solide) lors de l'application de la pression. Elle conduit à l'extrusion d'un gel qui contient plus d'eau au départ puis de moins en moins, rendant l'extrusion plus difficile
- Les propriétés mécaniques ne doivent pas être modifiées

Dans le cadre de cette étude, les hydrogels de chitosane doivent pouvoir être injectés via des micro-cathéters ou des aiguilles (entre 30G, 0,254 mm de diamètre, et 18G, 1,02 mm de diamètre). De plus, dans le cadre de la prévention des adhérences abdominales, la capacité de nos gels à se répandre sur une surface et à former un film homogène et cohésif une fois injecté est essentiel et a donc été évaluée de façon qualitative. Pour cela, 1ml de gel est extrudé d'une seringue de 1 ml connectée à une aiguille 18G dans une boîte de pétri contenant 1ml de solution saline chauffée à 37°C. Après 5 min d'attente, les films formés sont observés et photographiés. Après 1h à 37°C, les gels sont décollés et manipulés avec une pince en plastique afin d'évaluer la cohésion des gels. Il est en effet important que la formulation choisie soit capable de se répandre sur les tissus abimés et soit suffisamment cohésive pour ne pas se désintégrer sous l'action des fluides corporels et des contraintes.

2.4.3 Propriétés mécaniques en compression non-confinée

Des essais de compression non confinés ont été réalisés en utilisant l'appareil Physica MCR301® (Anton Paar, Allemagne) équipé de géométries parallèles (P25/P2). Un volume de 2 ml de gel est introduit dans des moules cylindriques de 14 mm de diamètre qui sont incubés à 37°C pendant 24h afin d'atteindre une gélification complète. Le lendemain, les gels sont démoulés et placés sur la géométrie plane. Une contrainte est appliquée à une vitesse de 0,5 mm/s (correspondant à 4,5 %/s) jusqu'à atteindre une déformation de 50%. Les données, contraintes en fonction de la déformation, nous permettent d'en déduire les modules d'Young sécants à différentes déformations ainsi que la déformation à la rupture (si inférieure à 50%).

2.4.4 Cinétique de dégradation

Afin d'évaluer la vitesse de dégradation des hydrogels, l'évolution de leur propriétés mécaniques au cours du temps en présence ou non d'enzymes a été déterminée grâce à l'appareil CoaguSens™ (Rheolution Inc) et l'approche VeTBiM (Viscoelastic Testing of Bilayered Materials) (Ceccaldi et al., 2016), qui permet de mesurer les propriétés viscoélastiques des gels, notamment le module de conservation G' et le module de perte G'' en cisaillement complexe, en fonction du temps selon le principe suivant :

Les portes-échantillons contiennent une membrane en silicone qui possède sa propre fréquence de résonance. Les hydrogels sont coulés dans les portes-échantillons, laissés à gélifier puis l'ensemble est soumis à de très faibles déformations par vibration via cette membrane. Les mesures sont donc non destructives et sans contact avec l'échantillon. Le système échantillon/membrane va entrer en résonance et connaissant le volume de l'échantillon ainsi que les propriétés mécaniques de la membrane et du signal émis, la vibration du système est alors uniquement régie par la viscoélasticité de l'échantillon. La déformation est mesurée par un laser, et permet de calculer en temps réel les valeurs de G' et G'' des échantillons.

Après avoir calibré les portes échantillons vides afin d'avoir les propriétés vibratoires des membranes de silicone seules, les gels sont coulés dans les portes échantillons et sont laissés à gélifier pendant 24h à 37°C. Après 1h de gélification, 2 ml de PBS sont ajoutés sur tous les gels afin d'éviter qu'ils ne sèchent. Le lendemain, les mesures sont prises puis 2 ml de chacun des différents milieux de dégradation (avec PBS et avec 1 mg/ml de lysozyme) sont ajoutés sur les échantillons. De plus, deux chitosanes avec des DDA différents ont été utilisés afin d'évaluer l'influence de la diminution du DDA du chitosane sur la cinétique de dégradation des gels. Des mesures sont effectuées tous les jours et nous avons ainsi été capable de suivre l'évolution du module G' et d'observer la diminution des propriétés mécaniques des gels au cours du temps. L'expérience a été réalisée en duplicata.

2.5 Caractérisation physicochimique

2.5.1 Microscopie Électronique à Balayage (MEB)

Après leur préparation, 2ml de gels sont coulés dans des moules cylindriques (14 mm de diamètre) et sont laissés à gélifier pendant 24h à 37°C. Ils sont ensuite congelés à -20°C pendant une nuit et placés dans un lyophilisateur sous vide. Deux jours plus tard, ils sont découpés en deux dans l'épaisseur à l'aide d'une lame chirurgicale afin d'avoir des échantillons d'environ 0,5 mm d'épaisseur. Une couche d'or est ensuite déposée sur les échantillons et ces derniers sont observés à l'aide d'un microscope électronique à balayage (MEB, Hitachi S-3600).

2.5.2 pH et Osmolalité

Un volume de 3 ml de gel est préparé et laissé gélifier dans une seringue de 10 ml pendant 24h à 37°C. Ils sont ensuite broyés à l'aide d'une spatule et analysés: le pH est mesuré en plongeant directement la sonde (UltraBasicpH-meter, Denver Instrument) dans la seringue et l'osmolalité est mesurée en prélevant 20 µl de filtrat de gel (Advanced Micro Osmometer, Model 3300, Advanced Instruments). Les valeurs physiologiques du pH et de l'osmolalité sont respectivement de 7,4 et environ 300 mOsm/kg.

2.6 Relargage de l'héparine

Dans le cadre de la prévention des adhérences abdominales postopératoires, il a été largement documenté que l'incorporation d'héparine au sein d'une barrière préventive fluide permettrait d'améliorer la guérison des tissus (Alonso et al., 2014; Kweon et al., 2003). Pour évaluer la faisabilité de l'incorporation d'héparine au sein de nos hydrogels de chitosane, nous avons étudié sa cinétique de relargage par nos hydrogels.

De l'héparine liquide à 1000 IU/mL a été utilisée (Sandoz, Canada). Pour une application locale, une concentration de 200 IU/ml dans les hydrogels serait suffisante pour accélérer la guérison (Beamish, Geyer, Haq-Siddiqi, Kottke-Marchant, & Marchant, 2009; Kweon & Lim, 2002; Kweon et al., 2003). L'héparine est incorporée dans l'agent gélifiant à hauteur de 50% du volume, avant le mélange avec la solution de chitosane. Ce qui veut dire que dans 1 ml de gel, il y a 0,6 ml de la solution de chitosane, 0,2 ml d'agent gélifiant (deux fois plus concentré) et 0,2 ml d'héparine liquide. La concentration d'héparine dans les gels est alors de 200 IU/ml.

Dans le but de quantifier le relargage de l'héparine, des essais spectrophotométriques par bleu de diméthyl-méthylène (DMMB) ont été réalisés. En effet, le DMMB se lie aux glycosaminoglycanes telles que l'héparine en changeant son spectre d'absorption dans l'ultraviolet (De Jong, Wevers, Laarakkers, & Poorthuis, 1989). Le protocole utilisé pour préparer la solution de DMMB est détaillé en ANNEXE III. En bref :

- Une courbe d'étalonnage est préalablement établie, la gamme linéaire se trouvant entre 1 et 70 µg/ml de GAGs (De Jong et al., 1989),
- Les gels SHC0075PB004 avec et sans héparine (contrôles) sont coulés dans des moules (14 mm de diamètre) et sont laissés à gélifier pendant 24h à 37°C,
- Ils sont ensuite démoulés dans une plaque 6 puits puis immergés dans 7 ml de PBS,
- Le milieu est prélevé à différents temps et remplacés par du PBS frais pendant 15 jours, L'héparine est dosée par DMMB.

2.7 Évaluation de la viabilité cellulaire *In vitro*

2.7.1 Encapsulation cellulaire

Le potentiel des hydrogels pour l'encapsulation de cellules a été évalué avec des fibroblastes de souris L929 (ATCC, Manassas, États-Unis). Les cellules sont cultivées dans du milieu DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium, Gibco BRL, Invitrogen, Grand Island, États-Unis) complété avec 10 % de sérum de veau fœtal (Medicor, Montréal, Canada). Pour les gels sans collagène, la solution de chitosane et l'agent gélifiant SHC0075PB004 (préalablement filtré avec un filtre 0,22 µm) sont mélangés et les cellules sont incorporées à une concentration de 11 millions par millilitre. Dans le cas des gels avec le collagène PureCol®, les cellules sont préalablement ajoutées aux solutions de collagène puis mélangées aux gels de chitosane. Un volume de 0,5 ml de gel est coulé dans une plaque 48 puits puis laissé à gélifier pendant 5 min à 37°C avant d'ajouter 0,5 ml de milieu de culture sur les gels. Le milieu de culture est changé deux fois par semaine.

2.7.2 Viabilité cellulaire par coloration Alamar Blue

L'activité métabolique des cellules encapsulées a été évaluée par Alamar Blue (10% v/v, Cedarlane Corp, Burlington, Canada) aux jours 1, 4 et 7. Afin de permettre au colorant d'accéder aux cellules encapsulées, les gels sont détruits à l'aide d'une pipette 1000 µl et la solution d'Alamar Blue est injectée dans les gels.

Après 3h d'incubation à 37°C, 100 µl de surnageant sont transférés dans une plaque 96 puits et l'intensité de l'émission de fluorescence a été quantifiée à l'aide d'un lecteur de fluorescence microplaque (longueur d'onde d'excitation: λ_{ex} = 560 nm, longueur d'onde d'émission, λ_{em} = 590 nm, BioTek Instruments Inc., Synergy 4, USA)

2.7.3 Essais Live/Dead

Aux jours 1, 4 et 7, la viabilité et la répartition cellulaires ont été évaluées par un essai Live/Dead (FluoroProbes®, Interchim). Les hydrogels sont préalablement rincés avec du PBS puis immergés dans les solutions colorantes diluées dans du milieu DMEM sans sérum (2 µM d'éthidium homodimer-3 et 1 µM de calcéine AM). Les gels sont incubés 45 min à 37°C et observées au microscope à fluorescence (Leica DM IRB) : les cellules vivantes sont colorées en verte et les mortes en rouge.

2.8 Modèle *In vivo* pour la prévention des adhérences tissulaires

La capacité de nos gels à prévenir l'apparition des adhérences abdominales postopératoires a été évaluée *in vivo* dans un modèle d'abrasion du caecum et du mur abdominal (Lei et al., 2017; J. Li et al., 2017; L. Li et al., 2014; Lin et al., 2017; E. Zhang et al., 2017) en comparant notre gel de chitosane à un matériau contrôle commercialisé, l'Interceed®, textile fin dont l'efficacité a été démontrée mais qui n'est pas injectable.

2.8.1 Protocole expérimental

Nous avons utilisés 28 rates Sprague Dawley pesant entre 220 et 275 g (Charles River, Canada). Les animaux ont tous été traités selon les lignes directrices du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et le protocole a dû préalablement être approuvé par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux du CHUM (CIPA, protocole IM16017SLr). Les rates ont été réparties aléatoirement entre quatre groupes [Tableau 2.8.1]. Les chirurgies ont été réalisées par le Dr Qi (professeur au département de chirurgie de l'UDEM).

Tableau 2.8.1: Répartition des rates suivant les groupes de traitement

Groupe 1 : SHAM (placebo)	Groupe 2 : Non traité	Groupe 3 : Interceed®	Groupe 4 : Gel de chitosane
4 rates	8 rates	8 rates	8 rates

Anesthésie :

Le jour de l'implantation, chaque rate est placée dans une boîte d'induction puis anesthésiée et maintenue par une dose d'isoflurane 2-3% selon les techniques recommandées par le CIPA. Chaque rate est préalablement identifiée et rasée au niveau de l'abdomen. Le site d'intervention est désinfecté (3 passages de Chlorhexidine 2% suivis de 3 passages d'alcool). L'animal reçoit une dose de 0,05 mg/kg de buprénorphine sous-cutanée avant le début de la chirurgie en plus d'une infiltration de bupivacaïne (anesthésique local) sur le site chirurgical.

Chirurgie :

Une incision de 4 cm est effectuée le long de la ligne médiane de l'abdomen et le péritoine est ouvert.

Groupe 1 SHAM : aucune intervention chirurgicale n'est pratiquée, 1 ml de PBS est injecté dans la cavité abdominale et l'abdomen est refermé à l'aide de sutures 3.0 pour les muscles et 4.0 pour la peau.

Groupe 2 non-traité : une abrasion de 2 cm x 2 cm est pratiquée sur le caecum, du côté droit de l'animal, à l'aide d'une gaze chirurgicale jusqu'à l'observation d'un exsudat sanguin. Une abrasion de 2 cm x 2 cm est également effectuée sur le mur abdominal juxtaposé à l'aide d'une pince chirurgicale afin d'engendrer la destruction de l'épithélium [Figure 2.3]. Deux sutures sont faites afin de tenir les deux parties abrasées en contact pour favoriser l'apparition d'adhérences.

Groupe 3 Interceed® : après avoir fait les abrasions, comme explicité ci-dessus, un morceau de 2 cm x 2 cm du produit Interceed® est découpé et déposé entre les deux surfaces abrasées maintenues en contact par les points de sutures [Figure 2.3]. Il faut faire attention à arrêter tout saignement avant de placer le matériau car il devient inutilisable s'il est en contact avec du sang. Il faut aussi être vigilant et ne pas plier le produit car cela peut affecter son efficacité.

Groupe 4 gel de chitosane : le gel de chitosane avec l'agent SHC0075BGP01 est préparé tel qu'indiqué en section 2.1.4. Un volume de 0,5 ml de gel est ensuite injecté sur le caecum et le mur abdominal abrasés, à l'aide d'une seringue 3 ml munie d'une aiguille 18G. Après 5min d'attente, afin que le mélange gélifie entre les deux tissus, on remarque que le gel couvre très bien les tissus abîmés et qu'il reste en place lors de la fermeture de l'abdomen [Figure 2.4].

Après la procédure chirurgicale, les muscles puis la peau sont refermés à l'aide de sutures 3.0 et 4.0 respectivement.

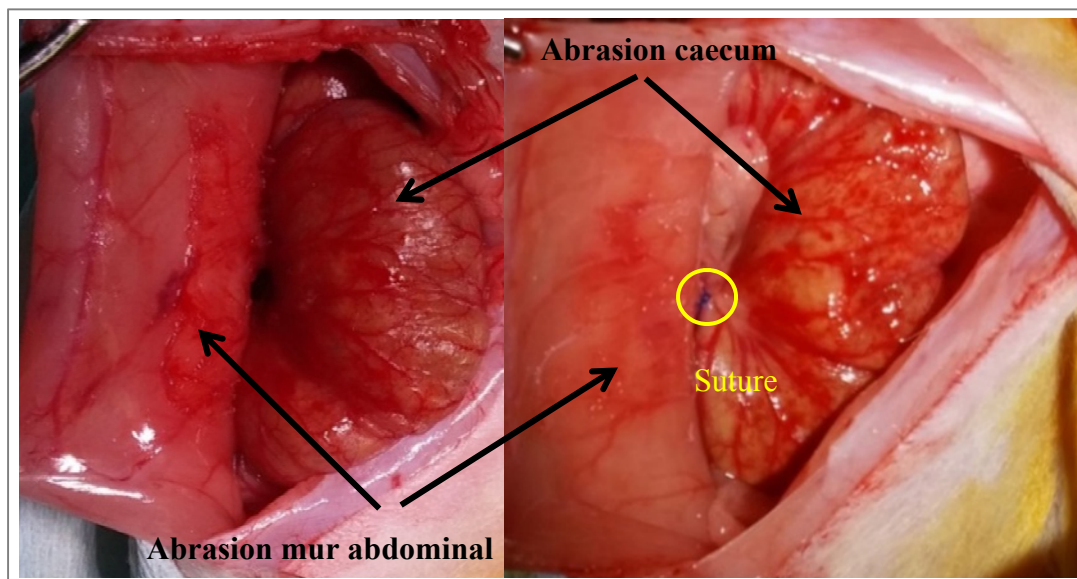


Figure 2.3: Photographies du mur abdominal et du caecum abrasés

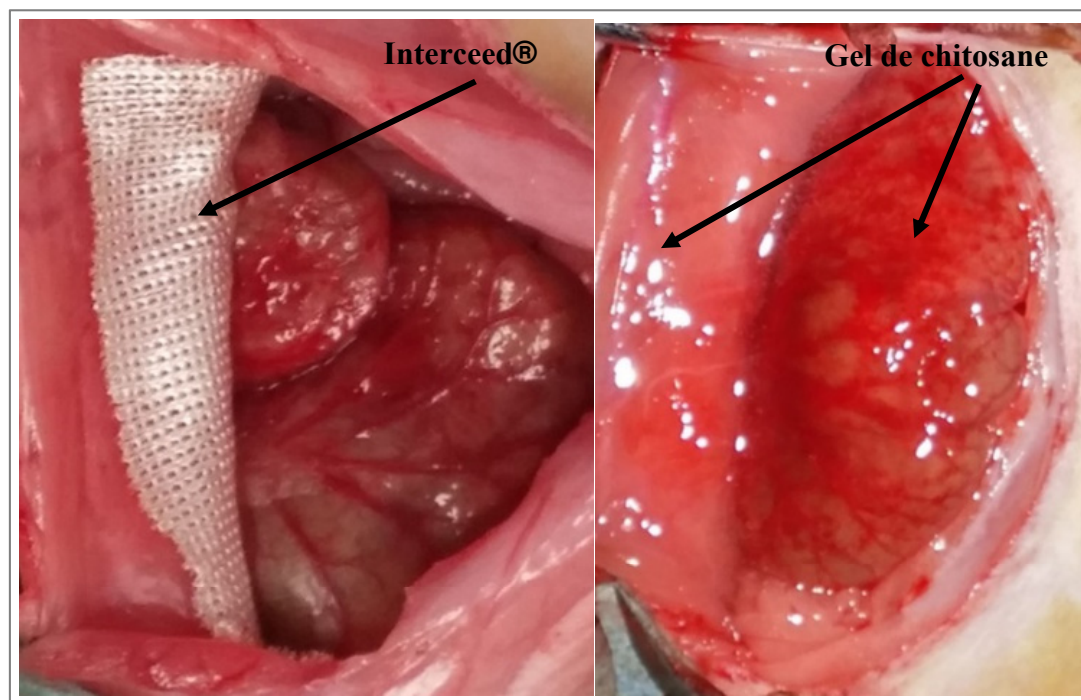


Figure 2.4: Placement du produit Interceed® (gauche) et du gel de chitosane (droite)

Suivi des rats :

Tous les jours pendant les 15 jours du protocole, les rates sont pesées et examinées afin de voir si elles démontrent des signes de douleur ou d'inconfort. Tous les animaux ont reçu deux doses de buprénorphine par jour et du Tylenol (dans leur eau) pendant les 3 jours qui suivent la chirurgie. Après cela, l'administration d'analgésique était prolongée si les rates présentaient des signes de douleur. Lors de la chirurgie, puis après 3 et 7 jours et lors du sacrifice, 500 μ l de sang sont prélevés à partir de la veine jugulaire afin de compter le nombre de globules blancs et ainsi détecter une potentielle inflammation ou infection.

Sacrifice :

Quatorze jours après l'implantation, les rates sont anesthésiées à l'isoflurane puis euthanasiées par exsanguination intracardiaque. Une incision latérale est pratiquée du côté gauche de l'abdomen puis la peau est décollée et les muscles incisés afin d'exposer les organes. Les adhésions sont observées et notées selon un score préétabli, puis le caecum ainsi que le mur abdominal sont récoltés pour des analyses histologiques.

2.8.2 Analyse des adhérences

Le Tableau 2.8.2 présente les différents critères utilisés pour qualifier et quantifier les adhérences. Des scores entre 0 et 2 ainsi que le pourcentage de surface adhérente ont été utilisés pour évaluer la sévérité des adhérences, basée sur l'observation macroscopique des tissus (Lei et al., 2017; Z. Zhang et al., 2011). Les résultats sont exprimés en moyenne \pm écart-type et une analyse statistique des données a été effectuée à l'aide du logiciel GraphPad Prism avec un test ANOVA. Une valeur de $p < 0,05$ a été considérée comme significative et un test de Bonferroni post-hoc a ensuite été réalisé pour comparer les groupes deux par deux.

Tableau 2.8.2 : Détails des scores utilisés pour évaluer la sévérité des adhérences

Critères	Description
Score des adhérences	
0	Pas d'adhérence
1	Adhérences légères facilement séparables
2	Adhérences sévères qui requièrent une dissection
Surface adhérente	Pourcentage de surface adhérente

Une analyse histologique des tissus a été effectuée pour affiner l'analyse. Les échantillons de caecum et de mur abdominal récoltés lors du sacrifice sont fixés dans de la formaline 10% pendant 24h à température ambiante, intégrés dans de la paraffine puis colorés à l'hématoxyline et à l'éosine. Tous les échantillons sont coupés transversalement excepté les échantillons de caecum seul qui sont découpés dans la longueur. La quantité de cellules inflammatoires est observée afin de juger du degré d'inflammation. La présence de cellules inflammatoires, la déposition de collagène au niveau des adhérences et une néovascularisation sont des indicateurs de la sévérité des adhérences.

CHAPITRE 3

RÉSULTATS

3.1 Évaluation du potentiel d'hydrogels de chitosane pour la prévention des adhérences tissulaires

L'objectif de cette partie du projet était d'évaluer le potentiel des thermogels de chitosane pour la prévention des adhérences tissulaires qui apparaissent suite à des chirurgies abdominales ou gynécologiques.

Tel que présenté dans les sections précédentes, un matériau injectable pour la prévention des adhérences tissulaires doit répondre aux critères suivants : il doit être biocompatible, biodégradable entre 4 et 7 jours suivant l'opération et doit avoir une résistance mécanique et une cinétique de gélification adaptées. En effet, il doit être injectable, s'étaler facilement sur la surface, pour ensuite gélifier rapidement *in situ* afin de former un film homogène avec une résistance mécanique suffisante pour accomplir sa fonction de barrière et ne pas se désintégrer sous l'action des fluides et contraintes corporelles.

Afin de trouver la meilleure formulation possible parmi les hydrogels de chitosane développés dans notre laboratoire, plusieurs tests ont été effectués, notamment en rhéologie, compression, dégradation et étalement sur des surfaces *in vitro* et *in vivo*.

Le relargage d'une molécule active, l'héparine, a également été étudiée. Par la suite, des essais *in vivo* ont été effectués sur un modèle d'adhérence chez le rat, afin de comparer le gel à un matériau commercialisé, Interceed®.

3.1.1 Caractérisations *In vitro*

Rhéologie

En rhéologie, l'évolution du module de conservation (G') et du module de perte (G'') a été mesurée au cours du temps à 37°C, tel que montrée sur la Figure 3.1 pour le cas du gel SHC0075PB004. Le temps auquel $G'=G''$ est appelé temps de gélification (t_{gel}) selon l'approche de Winter (Chambon, Petrovic, MacKnight, & Winter, 1986). On remarque que G' est supérieur à G'' dès les premières secondes de mesure, ce qui signifie que t_{gel} est inférieur à 15 secondes (il y a un délai de 15s entre la préparation du gel et le début du test). C'est le cas pour tous les gels étudiés, sauf pour la formulation BGP02, pour laquelle $t_{gel} = 30$ sec.

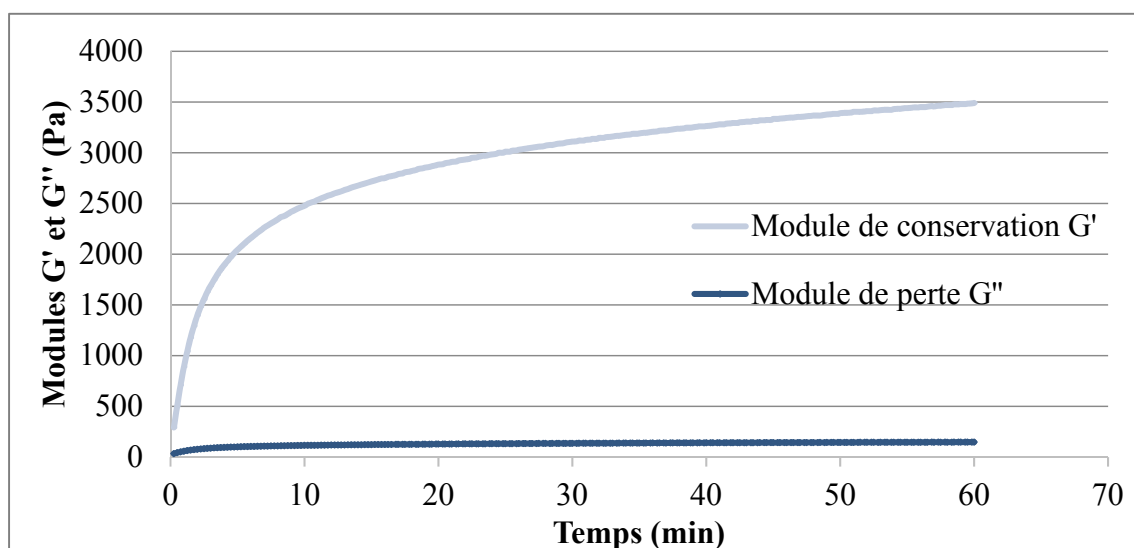


Figure 3.1 : Évolution des modules de conservation (G') et de perte (G'') en fonction du temps, pendant 1h à 37°C, pour la formulation SHC0075PB004 (moyenne, $n=3$)

La Figure 3.2 présente l'évolution du module de conservation G' au cours du temps à 37°C pour différentes formulations de gels de chitosane, qui est un bon indicateur de la cinétique de gélification et des propriétés mécaniques en cisaillement et donc de la cohésion du gel au cours du temps. Elle montre que le type et la concentration des agents gélifiants influencent fortement la cinétique de gélification.

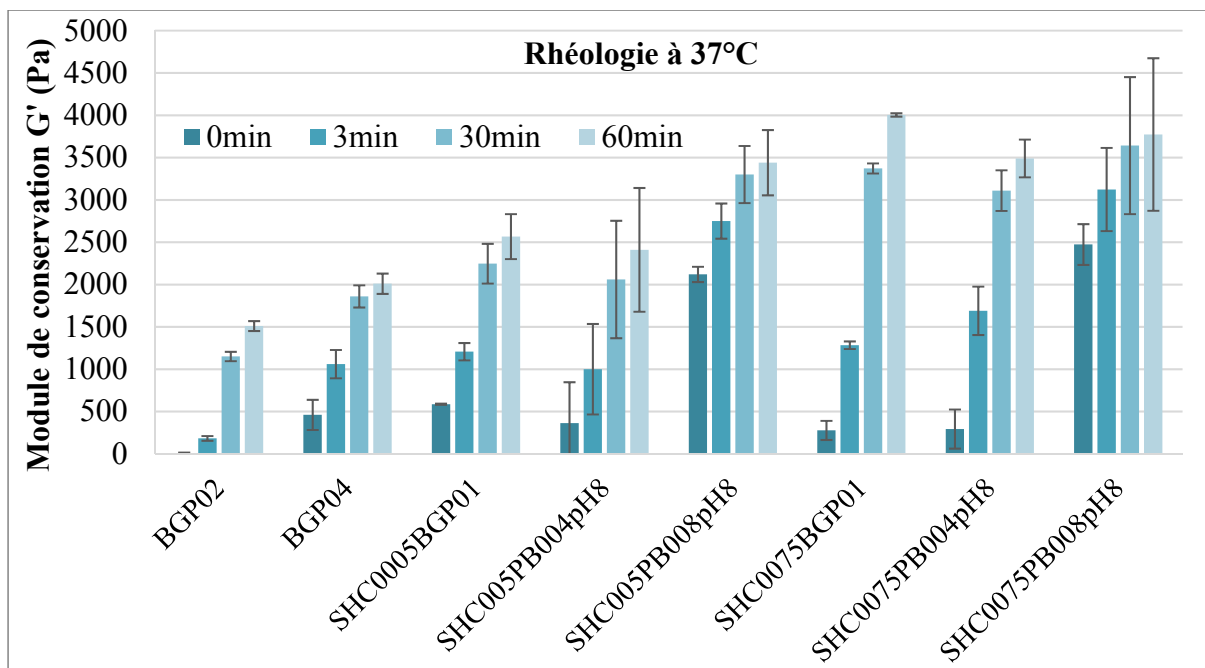


Figure 3.2: Évolution du module de conservation G' pour différentes formulations d'hydrogels de chitosane, à 37°C pendant 1h (moyenne \pm ET, $n=3$)

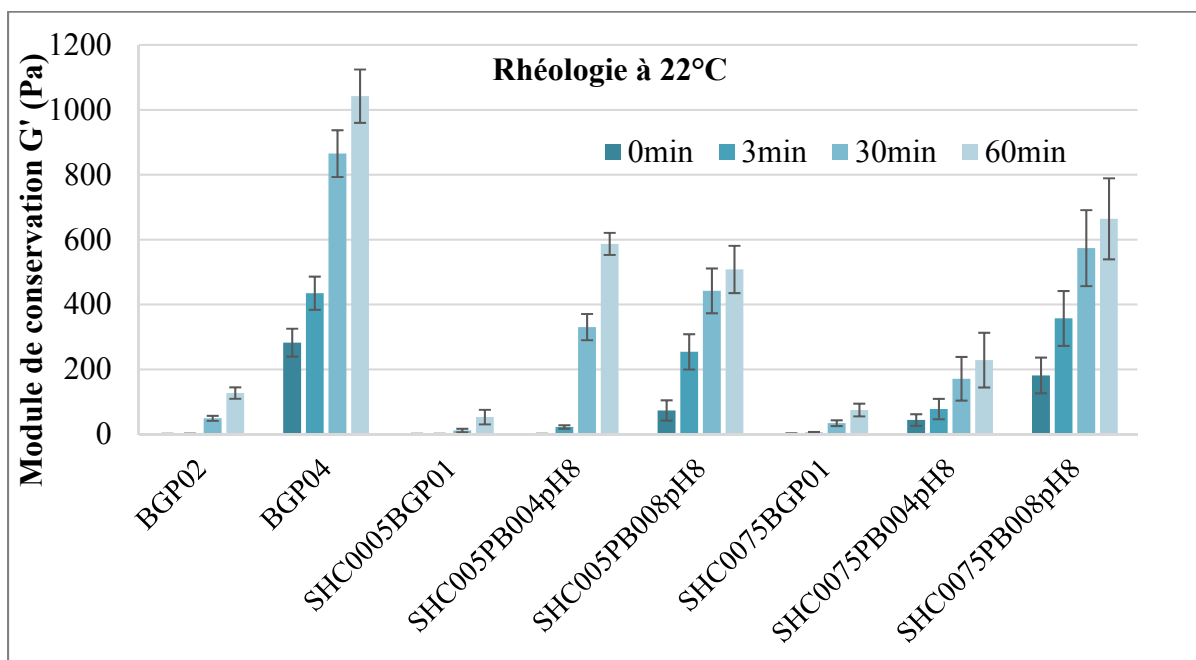


Figure 3.3 : Évolution du module de conservation G' pour différentes formulations d'hydrogels de chitosane, à 22°C pendant 1h (moyenne \pm ET, $n=3$)

Les gels contrôles BGP02 et BGP04 présentent les valeurs les plus faibles avec $G' = 1147$ Pa et 1860 Pa après 30 min respectivement. Les gels SHC005BGP01 et SHC005PB004 donnent des valeurs intermédiaires: $G' = 2247$ Pa et 2055 Pa après 30min respectivement.

Les formulations préparées avec du PB008M présentent des valeurs de G' élevées ($G' = 3300$ Pa et 3070 Pa après 30min) et elles gélifient très rapidement (G' élevé à $t=0$). Ceci suggère que ces gels seront difficiles à étaler sur une surface et cela pourrait limiter leur injectabilité, ce qui est confirmé par le fait que cette formulation gélifie déjà température ambiante [Figure 3.3].

Les gels préparés avec une concentration en SHC de 0,075M, soit SHC0075BGP01 (3083 Pa après 30min) et SHC0075PB004 (3110 Pa après 30min) semblent les plus optimaux, puisque la valeur de leur module de conservation est faible au départ, ce qui devrait leur permettre d'être facilement injectables à travers une aiguille et de s'étaler sur une surface. Par la suite, G' augmente rapidement vers des valeurs élevées, leur conférant une certaine résistance.

La Figure 3.3 présente l'évolution du module G' des mêmes formulations d'hydrogels de chitosane, mais cette fois à température ambiante (22°C). Tel qu'attendu, à cette température, G' atteint des valeurs beaucoup plus faibles qu'à 37°C. Le Tableau 3.1.1 résume les valeurs des t_{gel} obtenues pour ces formulations à 22°C. On remarque que certaines formulations (BGP04, SHC005PB004, SHC005PB008 et SHC0075PB008) sont moins stables que les autres à température pièce car elles ont un temps de gélification rapide et leurs modules de conservation présentent des valeurs élevées après 1h de gélification, atteignant 1000 Pa pour le gel BGP04. Ces formulations ne seront pas retenues dans la cadre de la prévention des adhérences abdominales car leur gélification à 22°C nuirait à l'injectabilité et à l'étalement du gel.

Tableau 3.1.1 : t_{gel} de différentes formulations de gels de chitosane à 22°C (moyenne, n=3)

Formulation du gel de chitosane	t_{gel} à 22°C
BGP02	9,3 min
BGP04	< 15 s
SHC005BGP01	24,8 min
SHC005PB004	1 min
SHC005PB008	< 15s
SHC075BGP01	6,0 min
SHC075PB004	< 15s
SHC075PB008	< 15s

Test d'étalement

Ces résultats ont été complétés par des essais consistant à injecter des gels sur une surface préchauffée à 37°C et à observer l'étalement et leur capacité à former un film fin, cohésif et homogène. Pour cela, 1 ml de gel a été coulé dans une boîte de pétri contenant une solution saline, et après 5min de gélification à 37°C, les films formés ont été observés et photographiés [Figure 3.4].

On remarque que tous les gels n'ont pas la même capacité à former des films cohésifs. La formulation BGP02 se désintègre facilement au contact de la solution saline, tandis que SHC0075PB008 forme un amas qui ne s'étale pas. Au contraire les formulations SHC0075BGP01 et SHC0075PB004 s'étalent très bien sur la surface et forment des films homogènes et manipulables. En effet, ces deux dernières formulations pouvaient être manipulées avec une pince sans se briser contrairement à BGP02 [Figure 3.5]. La formulation SHC0075BGP01 semble s'être plus adhéree à la surface que SHC0075PB004, qui se décolle facilement.

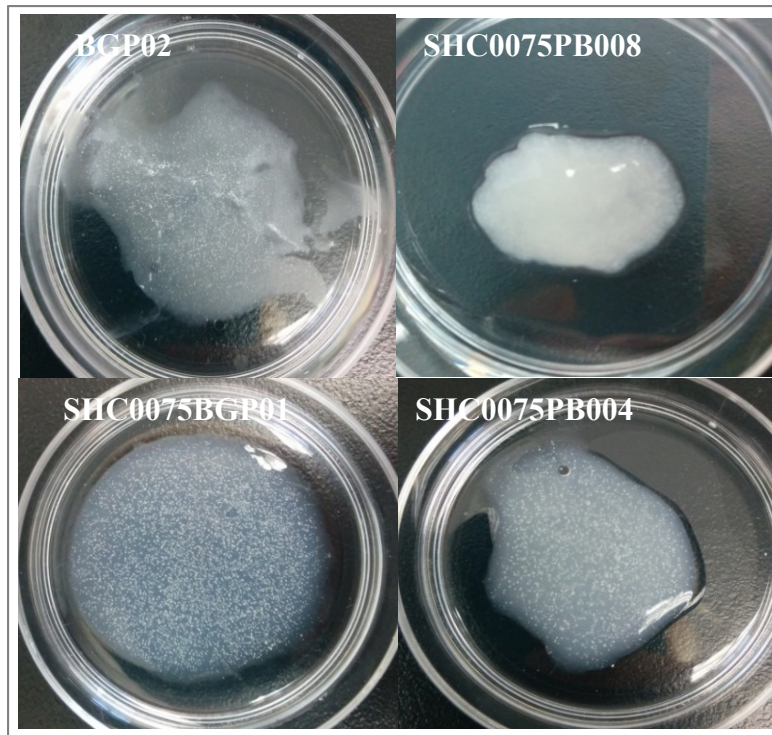


Figure 3.4: Injection de gels sur une surface à 37°C

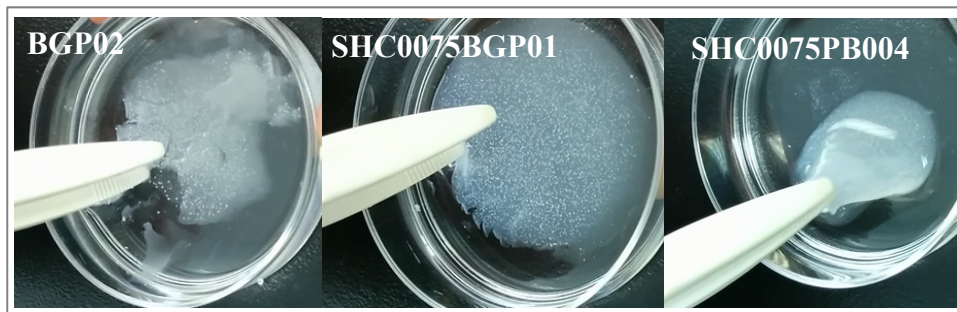


Figure 3.5 : Manipulation de gels après injection sur une surface à 37°C

Des essais de tension, de compression non-confinée, de dégradation, de pH et d'osmolalité ont également été effectués afin d'évaluer les propriétés mécaniques des deux gels d'intérêts : SHC0075BGP01 et SHC0075PB004.

Module d'élasticité et résistance

Les gels SHC0075BGP01 et SHC0075PB004 ont tous deux d'excellentes propriétés mécaniques, leurs modules d'Young sécants à 50% de déformation en compression atteignant près de 60 et 100 kPa respectivement comparés à moins de 10 kPa pour les formulations de chitosane-BGP conventionnelles (Assaad et al., 2015) [Figure 3.6 A]. On remarque cependant que le comportement mécanique en compression est non-linéaire comme le montre la Figure 3.6 B. La rigidité des gels augmentent avec la déformation et le gel SHC0075PB004 semble plus résistant que le gel SHC0075BGP01 : la contrainte à la rupture étant de 28,4 kPa et 45,8 kPa pour SHC0075BGP01 et SHC0075PB004 respectivement.

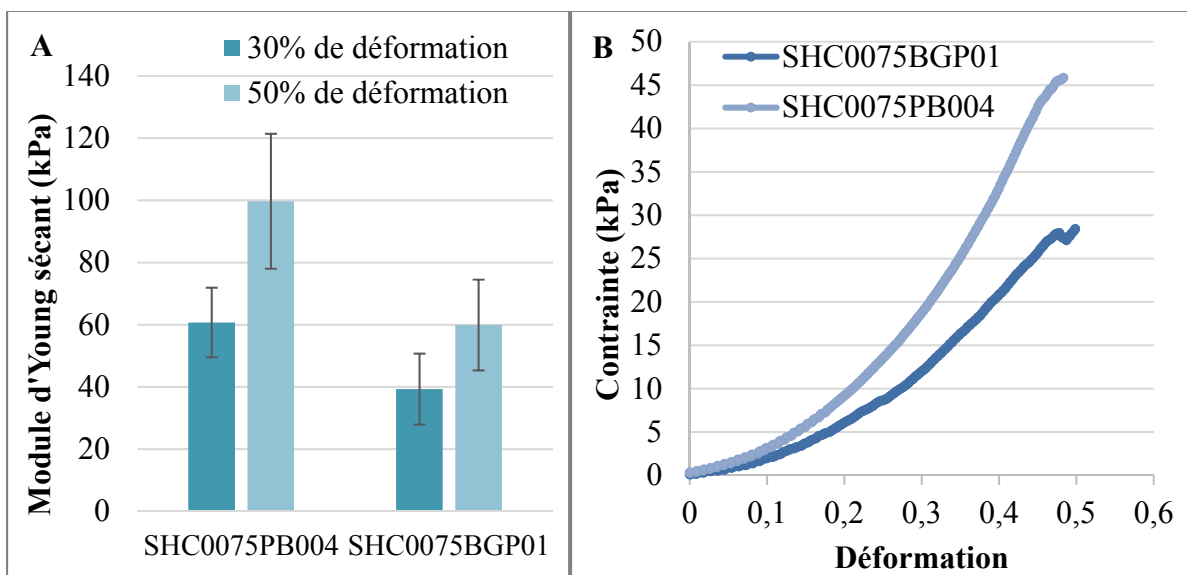


Figure 3.6 : A) Modules d'Young sécants à 30% et 50% de déformation pour les gels SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 (moyenne \pm ET, n=3). B) Courbes de contrainte en fonction de la déformation des gels SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 (moyenne, n=3)

Des essais en tension ont été réalisés par une étudiante stagiaire au LBeV, Médéine Bucionyte. En tension, le module d'Young sécant est au-dessus de 30 kPa pour les deux formulations d'intérêt et la résistance maximale à la tension est supérieure à 15 kPa pour les gels SHC0075BGP01 et SHC0075PB004.

Cinétique de dégradation

La cinétique de dégradation de la formulation SHC0075PB004 a également été étudiée en suivant la diminution du module de conservation G' lorsque le gel est immergé dans une solution de lysozyme (1 mg/ml). La dégradation des gels formés avec du chitosane de haut (HDDA) et bas (LDDA) degré de désacétylation a été comparée.

Comme le montre la Figure 3.7, les hydrogels SHC0075PB004 synthétisés avec un haut DDA (HDDA) sont plus stables au début puis se dégradent rapidement à partir du 3^{ème} jour d'immersion, tandis que les gels avec un faible DDA (LDDA) se dégradent plus progressivement. Après une semaine, une observation macroscopique indique que les gels immergés dans le lysozyme ont perdus leur forme initiale, ne sont plus manipulables et sont clairement moins résistants. Nous avons fait l'hypothèse que la cinétique de dégradation du gel SHC0075BGP01 serait semblable car le lysozyme hydrolyse les liaisons acétyles du chitosane et l'agent gélifiant ne devrait pas avoir d'impact sur la dégradation du gel.

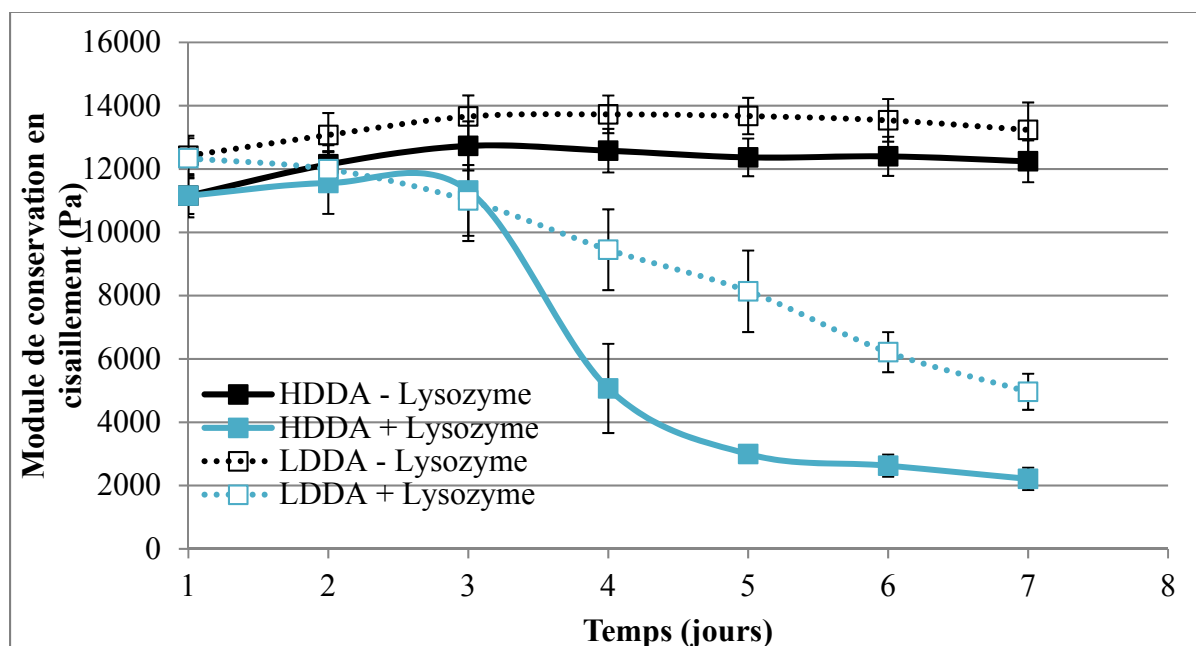


Figure 3.7 : Cinétique de dégradation du gel SHC0075PB004 préparé avec deux DDA (haut : HDDA 94% et bas : LDDA 85%), après immersion dans du PBS (contrôle) ou dans une solution de lysozyme 1mg/ml (moyenne \pm ET, n=5, N=2)

pH et osmolalité :

Pour finir, les deux formulations ont un pH et une osmolalité physiologiques : pH de 7,7 et 7,1 et osmolalité de 336 et 242 mOsmol.L⁻¹ pour SHC0075BGP01 et SHC0075PB004 respectivement.

Relargage de l'héparine :

Dans le cadre de la prévention des adhérences abdominales, l'héparine est très intéressante pour sa combinaison avec une barrière fluide car il a largement été documenté qu'elle attire et augmente la stabilité des facteurs de croissance impliqués dans le processus de guérison (Kweon et al., 2003). Il est cependant nécessaire que l'héparine incorporée au sein d'hydrogels puisse être libérée adéquatement et de façon continue durant la période critique de formation des adhérences (entre 3 à 7 jours). La Figure 3.8 présente le pourcentage d'héparine relarguée par rapport à la quantité initiale d'héparine incorporée dans les hydrogels. On remarque que 4 à 6% de l'héparine se libère rapidement ('burst effect') entre les 15 minutes et les 5h qui suivent le début du test. Par la suite, la libération est plus lente et progressive et atteint 6 et 11% pour les gels SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 respectivement, après 15 jours. Ces résultats sont intéressants car un relargage progressif permet d'assurer une libération durant toute la durée de la guérison; cependant, on remarque qu'une grande quantité de l'héparine incorporée n'a pas été libérée après 15 jours.

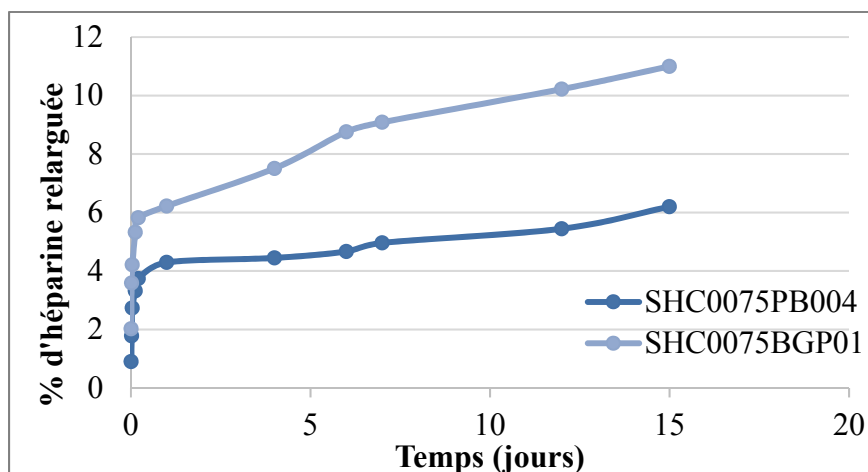


Figure 3.8 : Relargage d'héparine pendant 15 jours (moyenne, n=3)

Finalement la formulation SHC0075BGP01 a été sélectionnée pour les essais *in vivo* car d'une part, elle a la capacité de former un film cohésif *in vitro* et d'autre part, elle a une cinétique de gélification adéquate : elle est moins visqueuse que SHC0075PB004 à température ambiante tel que le montre la Figure 3.9 puis atteint une rigidité et des propriétés mécaniques intéressantes après 1h de gélification. De plus, des essais préliminaires chez le rat ont montré que ce gel était facile à injecter avec une aiguille 18G et formait un film homogène qui épouse la forme des organes. Après 10 min, la gélification était suffisante pour pouvoir retirer le gel entièrement avec facilité et sans l'abîmer [Figure 3.10].

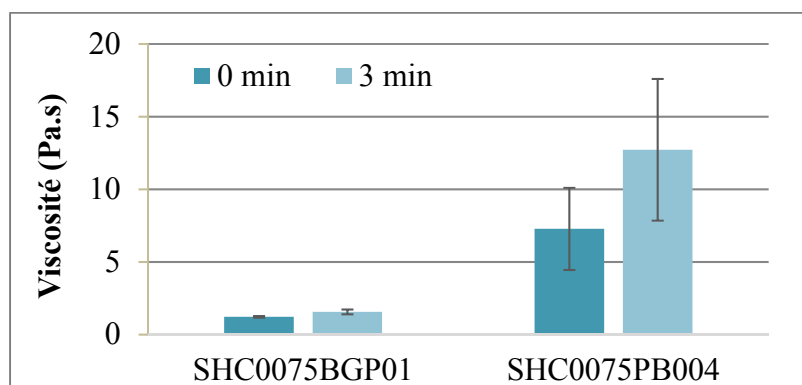


Figure 3.9 : Viscosité complexe initiale et après 3 min à 22°C

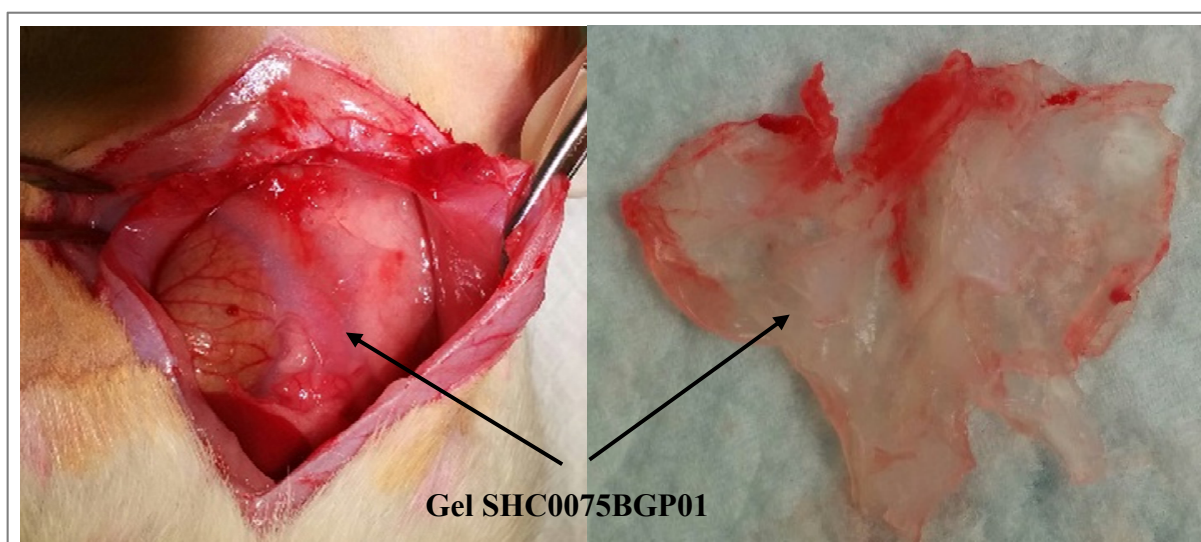


Figure 3.10: Photographies du gel SHC0075BGP01 injecté sur les intestins d'un rat (gauche) et du gel retiré après 10 min de gélification (droite)

3.1.2 Essais *In vivo*

Deux traitements, Interceed® et le gel de chitosane SHC0075BGP01, ont été administrés à des rats suite à une chirurgie abdominale qui consistait à abraser une surface de 2x2 cm² du caecum et du mur abdominal juxtaposé, afin d'induire des adhérences tissulaires. La Tableau 3.1.2 indique les scores d'adhérence ainsi que les surfaces adhérees résiduelles attribués aux différents groupes. Les rats du groupe SHAM, qui n'ont subi aucune abrasion tissulaire, ont leurs organes intacts après 15 jours.

Tableau 3.1.2 : Score des adhérences et surface adhéree résiduelle suivant les groupes, sans traitement, avec Interceed® et avec le gel SHC0075BGP01

	Sans traitement		Interceed®		SHC0075BGP01	
Rats	Score	Surface (%)	Score	Surface (%)	Score	Surface (%)
1	2	100	0	0	2	100
2	2	100	0	0	0	0
3	2	50	1	0	1	0
4	2	100	0	0	1	30
5	2	100	0	0	0	0
6	2	100	1	0	2	50
7	2	100	2	10	2	100
8	2	100	1	0	1	10
Moyenne	2	93,8	0,63	1,25	1,13	36,3
Écart type	0	17,7	0,74	3,54	0,83	43,1

Groupe non traité :

Les huit rats du groupe sans traitement ont subi des adhérences sévères avec des scores de 2 [Figure 3.11]. La surface adhéree était de 100% sauf pour le rat 3. Ces adhérences étaient impossibles à retirer sans disséquer les organes

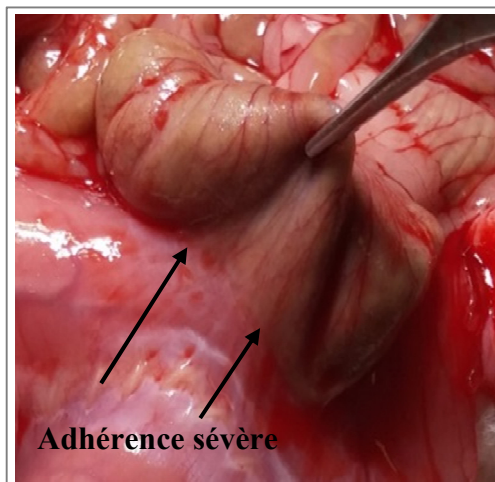


Figure 3.11: Adhérence de grade 2

Groupe Interceed®:

Pour le groupe qui a reçu le traitement Interceed®, dans la moitié des cas (rats 1, 2, 4 et 5), aucunes adhérences n'ont été observées (scores de 0). Pour l'autre moitié (rats 3, 6, 7 et 8), trois adhérences peu sévères et faciles à séparer (score de 1) et une adhérence nécessitant une dissection (score de 2) ont été constatées. La surface entre les tissus adhérents était de 0% sauf pour un rat (10%). Nous avons noté que le produit Interceed® est toujours totalement dégradé après 15 jours. Nous observons néanmoins une coloration brunâtre sur le caecum lorsqu'il y a des adhérences de grade 1 qui laisse présumer qu'il reste quelques traces du produit [Figure 3.12], ce qui a été confirmé lors de l'analyse histologique.

Groupe hydrogel de chitosane SHC0075BGP01 :

Aucunes adhérences n'ont été observées pour les rats 2 et 5 (score de 0). Des adhérences légères et faciles à séparer (score de 1) ont été constatées chez les rats 3, 4 et 8 et pour les rats 1, 6 et 7, des adhérences sévères nécessitant une dissection ont été observées (score de 2). Concernant la surface de tissu adhérent, elle variait de 0% à 100%, avec une moyenne de 36,3%. Le gel est sous forme de petites boules rigides, collées au caecum [Figure 3.12]. Ceci est inquiétant car cela montre qu'après deux semaines, le gel n'est guère dégradé et qu'au lieu de former un film fin uniformément réparti, il forme de petites masses.

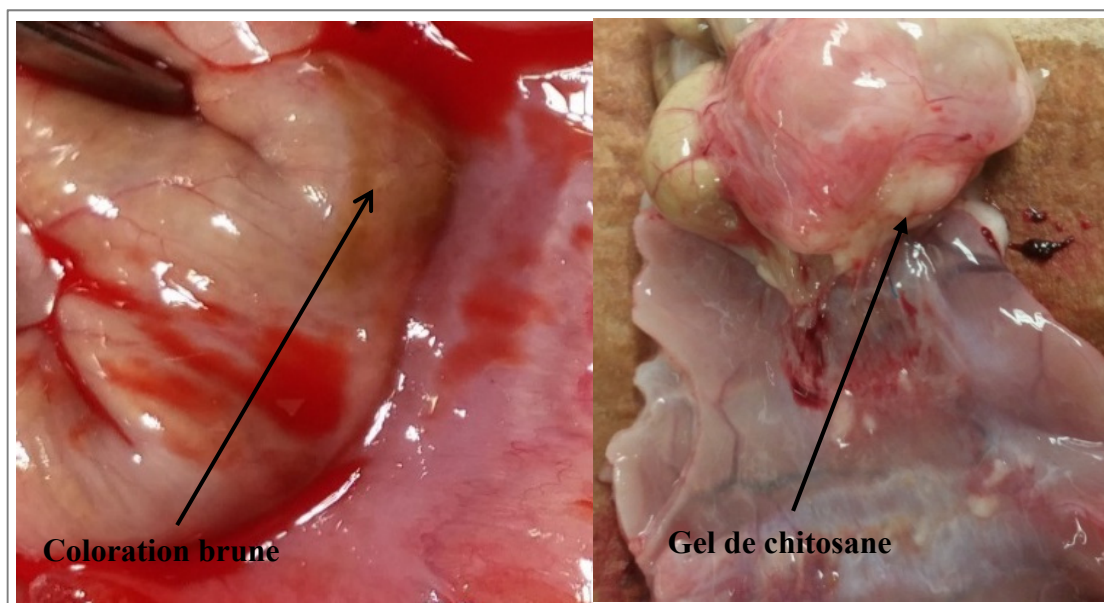


Figure 3.12: Coloration brune du caecum et gel de chitosane après 14 jours

En moyenne, les rats non traités ont un score d'adhérence de $2,00 \pm 0,00$ et les tissus abrasés étaient adhérents sur en moyenne $93,8 \pm 17,9$ %. Concernant le groupe avec le traitement commercial Interceed®, nous avons noté un score d'adhérences moyen de $0,63 \pm 0,74$ avec une surface adhérente résiduelle de $1,25 \pm 3,54$ %. Interceed® est un traitement efficace et il y a une différence statistiquement significative entre les scores de ces deux groupes ($p=0,0001$). On note également une réduction significative de la surface adhérente entre le groupe Interceed® et le groupe non traité ($p=0,0001$).

Pour le groupe qui a reçu l'hydrogel de chitosane, le score des adhérences est de $1,13 \pm 0,83$ avec environ $36,3 \pm 43,1$ % de surfaces adhérentes résiduelles. Le gel de chitosane offre un traitement statistiquement efficace comparé au groupe sans traitement ($p=0,010$) avec une réduction significative de la surface adhérente ($p=0,0036$). Même s'il n'y a pas de différences statistiquement significatives entre les scores des groupes Interceed® et gel de chitosane, on observe une surface d'adhérence résiduelle statistiquement plus grande dans ce dernier groupe ($p=0,0036$).

En ANNEXE IV sont exposées les photographies des tissus lors du sacrifice ainsi que le suivi des rats. En résumé, tous les rats ont perdu du poids et ont expérimenté de la douleur pendant les 4 jours qui ont suivi la chirurgie. Des injections de buprénorphine ont été administrées dès lors que nous observions douleur ou inconfort.

Il n'y a pas de tendance particulière concernant l'évolution du poids selon les groupes de traitement; tous les rats ont récupérés leur poids initial entre le 5^{ème} et 15^{ème} jour postopératoire. En moyenne, le groupe sans traitement anti-adhérence a expérimenté plus de douleur et a reçu plus d'injections d'analgésique. Concernant l'analyse hématologique, tous les groupes, y compris le SHAM, ont subi une hausse du nombre de globules blancs jusqu'au 7^{ème} jour postopératoire et qui redevenait normal à la fin du protocole.

Pour finir l'analyse histologique des tissus, après coloration H&E, a permis de mettre en évidence la sévérité des adhérences, le niveau d'inflammation et le degré de réparation des tissus.

Groupe sain SHAM : La Figure 3.13 montre un mur abdominal et un caecum sains

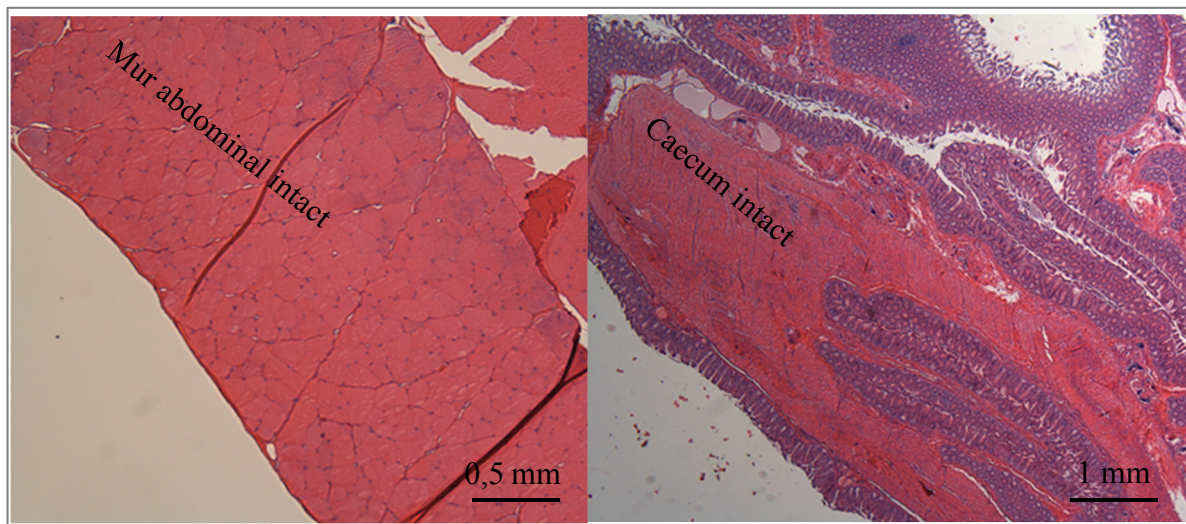


Figure 3.13: Coupes histologiques du mur abdominal (gauche) et du caecum (droite) dans le groupe sain SHAM. Coloration H&E

Groupe non traité : Les tissus du mur abdominal et du caecum ont fusionnés et il y a une grande quantité de fibroblastes, de cellules inflammatoires et une déposition de collagène sur le site des adhérences qui rendent ses dernières impossible à séparer sans endommager les tissus [Figure 3.14]. Une néovascularisation, qui témoigne de la sévérité des adhérences, a également été observée (en jaune sur la figure).

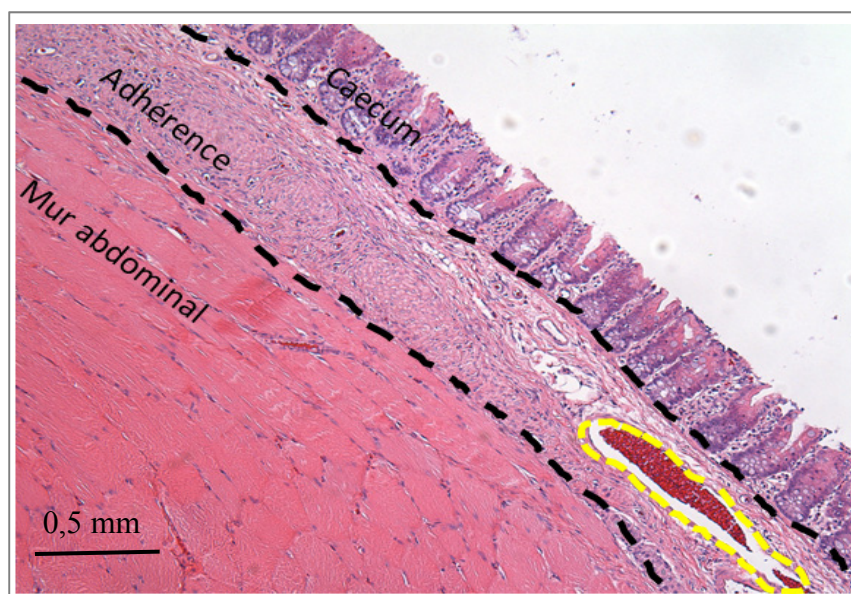


Figure 3.14: Coupe histologique d'une adhérence (sans traitement)

Groupe Interceed® : À gauche sur la Figure 3.15, le mur abdominal endommagé lors de la chirurgie a subi une mésothélialisation (recouvert d'un nouveau mésothélium) et achève son processus de cicatrisation (aucune adhérence présente). De nombreux fibroblastes et un tissu riche en collagène sous le mésothélium sont également observés, témoignage d'une réparation tissulaire. À droite, est présenté un cas où l'on peut voir qu'il n'y a pas de fusion des tissus même si une adhérence légère de grade 1 a été observée. En effet, le contour des tissus est aisément délimitable et peu de dépôt de collagène est observé ce qui conforte le fait que ces adhérences sont facilement séparables. La partie entourée en jaune semblerait être un restant d'Interceed®.

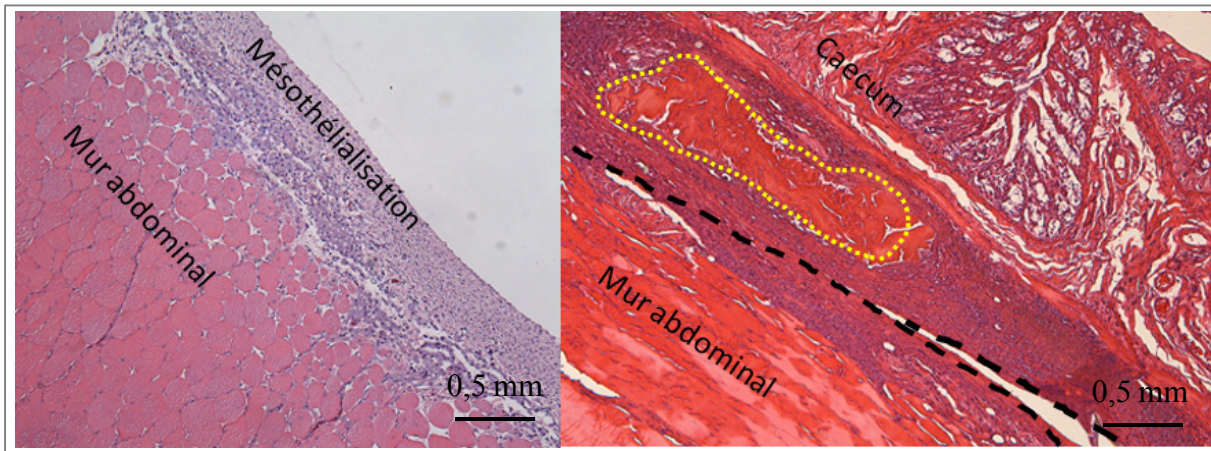


Figure 3.15: Coupes histologiques de tissus de rats dans le groupe Interceed®. À gauche, cas où il n'y a pas eu d'adhérence. À droite, cas où il y a eu adhérence légère. Coloration H&E

Groupe SHC0075BGP01 : La Figure 3.16 montre un cas d'adhérence où une grosse partie du gel de chitosane n'est pas dégradée. On en voit encore des traces en cours de résorption (à gauche) ou de gros amas (à droite). La zone est envahie de fibroblastes et cellules inflammatoires. Le caecum, le mur abdominal et le gel (en jaune sur la figure) sont difficiles à délimiter. Chez ce rat, des adhérences sévères étaient présentes ce qui est confirmé ici par la fusion des deux tissus et le dépôt de collagène.

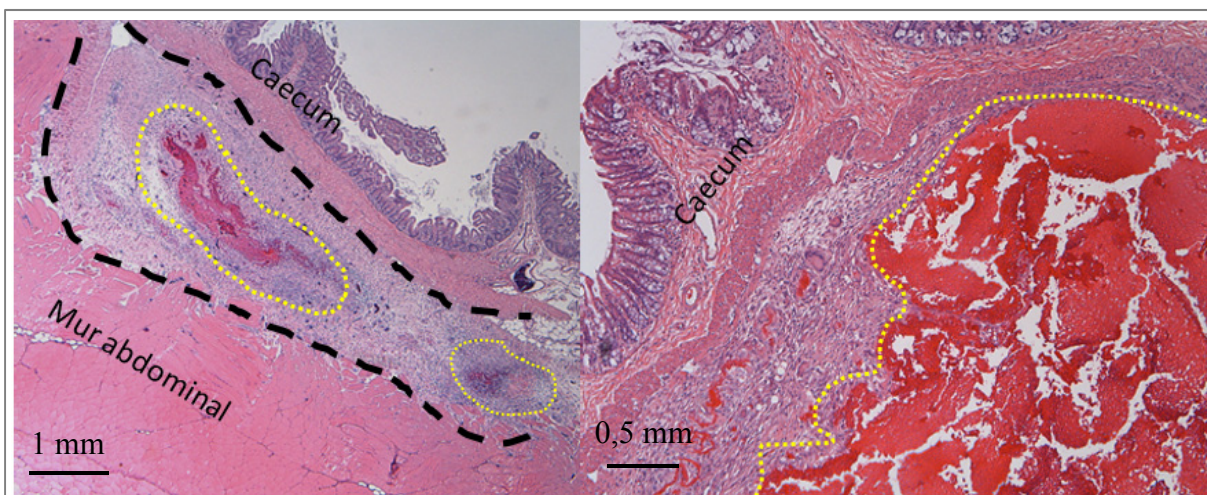


Figure 3.16: Coupes histologiques de tissus provenant d'un rat dans le groupe gel de chitosane SHC0075BGP01. À gauche, adhérence avec de minimes restes d'hydrogel (zone délimitée par trait jaune). À droite, adhérence avec reste massif d'hydrogel. Coloration H&E

Sur la Figure 3.17, on a le cas d'un rat du groupe SHC0075BGP01 sans adhérences : la bordure entre le caecum et le mur abdominal est visible et les tissus ont commencé à se réparer (mésothélialisation sur la figure de gauche). À droite, des zones où il reste de gros morceaux de gel non dégradés sont observées. Les contours des tissus sont néanmoins facilement délimités et il n'y a peu de dépôt de collagène et pas de néovascularisation.

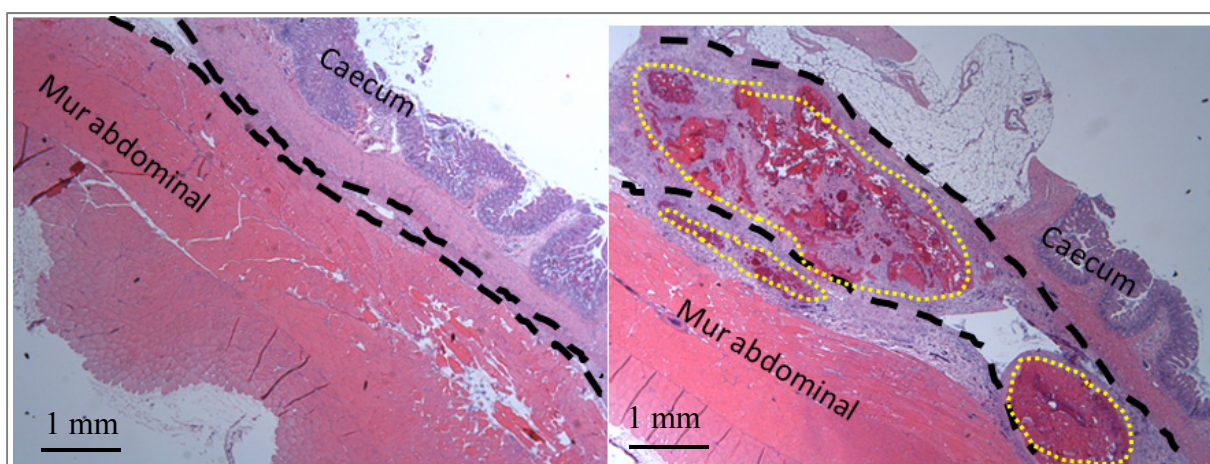


Figure 3.17 : Coupes histologiques de tissus de rats dans le groupe gel de chitosane SHC0075BGP01. À gauche : pas d'adhérence sans reste d'hydrogel. À droite, pas d'adhérence avec reste d'hydrogel. Coloration H&E

Pour conclure, les analyses histologiques sont en accord avec les scores présentés plus haut. Pour le groupe sans traitement, des adhérences sévères ont été mises en évidence lors du sacrifice et une fusion tissulaire accompagnée d'un dépôt de collagène et d'une néovascularisation ont été observés lors des analyses histologiques. Pour le groupe Interceed®, les tissus ont subi une mésothélialisation qui témoigne d'une cicatrisation dans le cas où aucune adhérence n'a été observée. Dans le cas contraire, le contour des tissus est facilement identifiable (pas de fusion tissulaire) ce qui est en accord avec le fait que les adhérences présentes étaient facilement séparables (score de 1). Des restants des gels de chitosane ont été observés avec adhérences et sans adhérences (contour tissulaire délimité) et pour ce groupe, nous avons eu des cas d'adhérences sévères et non sévères.

3.2 Caractérisation *In vitro* du produit JointRep™ pour la régénération du cartilage

Le second objectif de ce projet de maîtrise consistait à caractériser le produit JointRep™, récemment mis sur le marché européen par la compagnie canadienne OligoMedic Inc, afin d'évaluer ses propriétés et de les comparer avec ceux de nos hydrogels « maison ».

3.2.1 Étude rhéologique

La Figure 3.18 A présente la cinétique de gélification du produit JointRep™ évaluée sur trois échantillons distincts, pendant 2h à 37°C. On observe une gélification rapide, G' dépassant immédiatement G'' ($t_{gel} < 15s$) et augmentant rapidement. Après une heure de gélification, le module G' moyen était de 7846 Pa et après 2h de gélification on obtient un module G' de 8393 Pa. Si l'on compare aux hydrogels développés au LBeV [Figure 3.18 B], on remarque qu'à tout moment, la valeur de G' de JointRep™ est supérieure à celui des hydrogels SHC0075PB04 et SHC0075BGP01. C'est notamment le cas à $t = 0$ (en réalité 15s après le mélange, le temps de pouvoir effectuer la première mesure) : on est en moyenne à 3650 Pa à $t = 0min$ pour JointRep™ contrairement à 293 Pa et 277 Pa pour les formulations SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 respectivement. De plus, la viscosité initiale à température ambiante du produit JointRep™ est jusqu'à 10 fois plus grande que pour les gels développés au LBeV (11,6 Pa.s en moyenne contre 1,22 Pa.s pour SHC0075BGP01 et 7,3 Pa.s pour SHC0075PB004).

Afin de caractériser la thermosensibilité et l'injectabilité de la préparation JointRep™, la cinétique de gélification a également été étudiée à 22°C, température pièce à laquelle le gel est mélangé avant d'être injecté [Figure 3.19]. On remarque que le produit JointRep™ gélifie à température ambiante et son module de conservation atteint même 2350 Pa après 1h de gélification. Au contraire les deux formulations SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 sont stables à 22°C et ne gélifient pas, cela est un avantage car la solution reste liquide à température ambiante, et ce pendant plusieurs minutes après le mélange des solutions, ce qui donne le temps au praticien de les préparer et de les injecter.

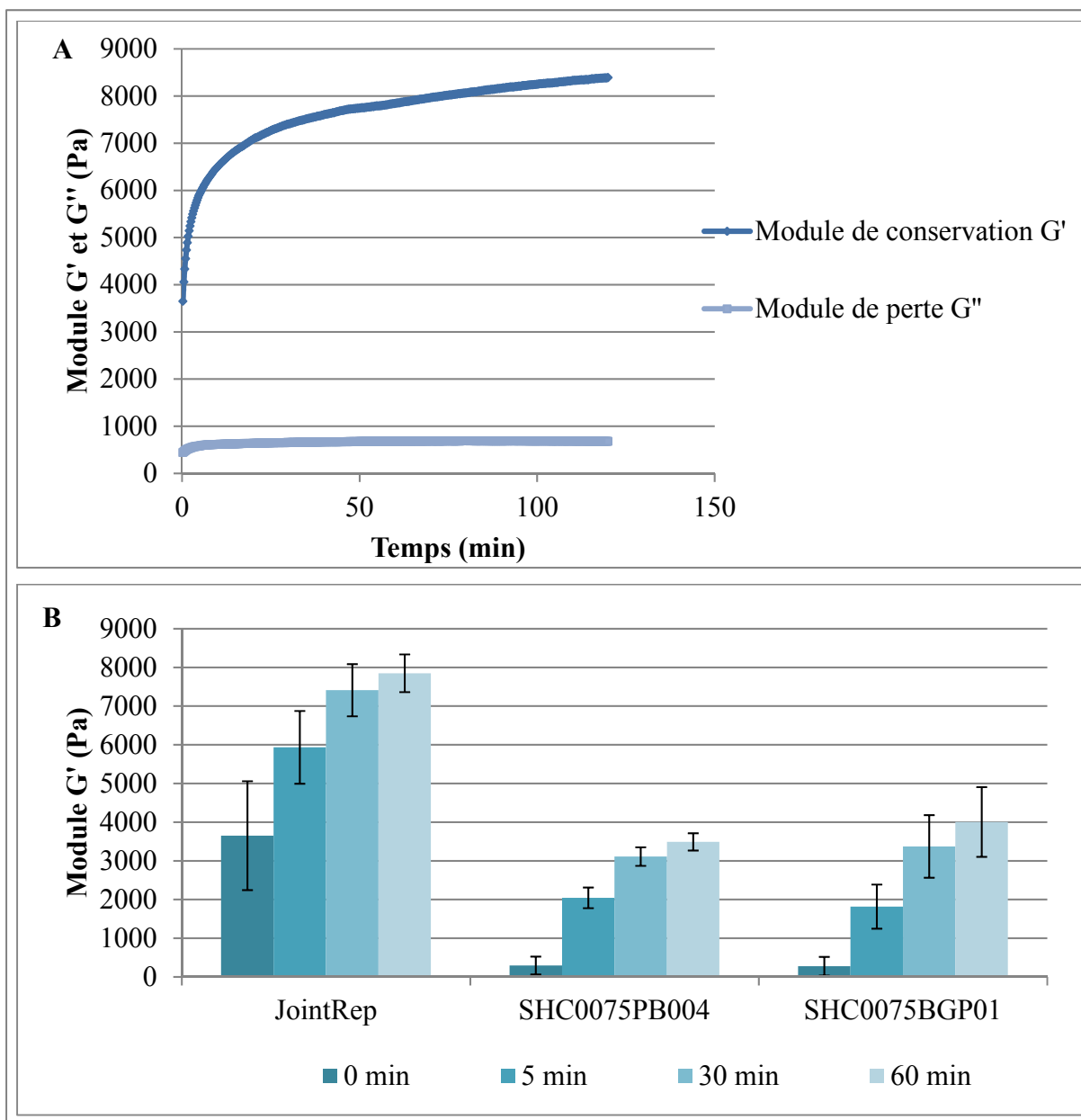


Figure 3.18: A) Évolution du module de conservation G' du produit JointRep™ pendant 2h à 37°C. B) Comparaison des modules de conservation G' de JointRep™ avec nos formulations SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 (moyenne \pm ET, n=3)

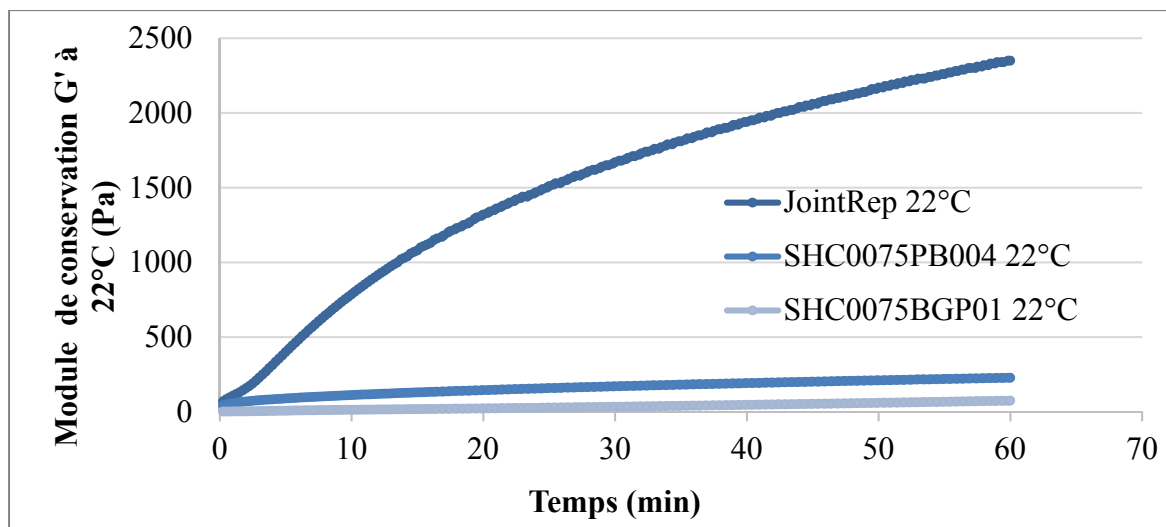


Figure 3.19 : Évolution du module G' de JointRep™ et des formulations SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 à 22°C pendant 1h (moyenne, $n = 1$ ou 3)

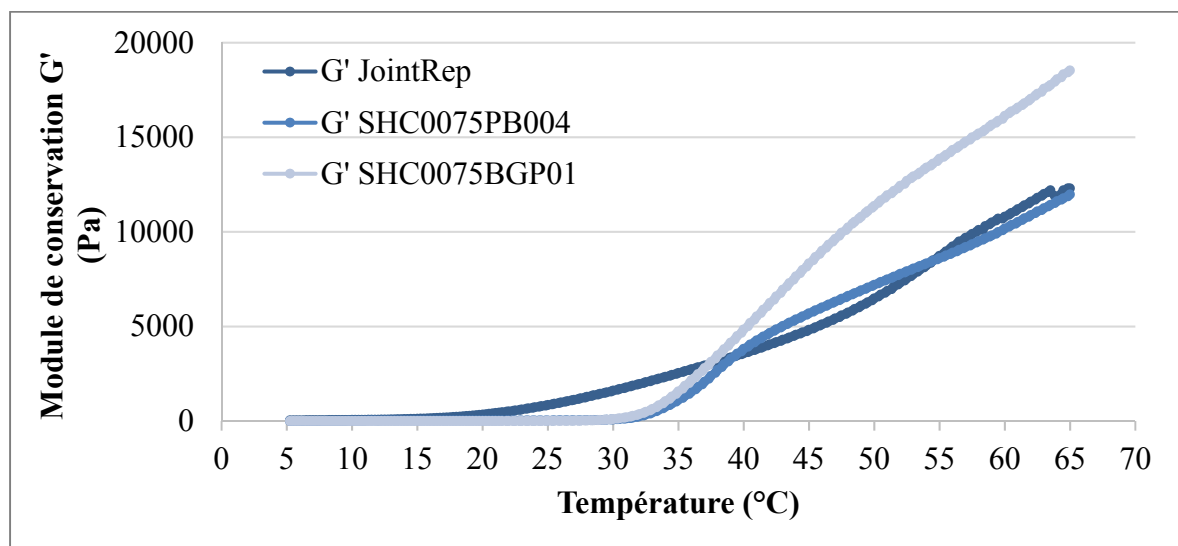


Figure 3.20 : Évolution du module G' de JointRep™ et des formulations SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 en fonction de la température ($n=1$)

La Figure 3.20 présente des essais rhéologiques réalisés avec une rampe de température variant entre 5°C et 65°C qui ont confirmés que le module G' du produit JointRep™ commençait à augmenter dès 20°C contrairement aux gels développés au LBeV pour lesquelles le module G' est faible et stable en dessous de 33°C.

3.2.2 Propriétés mécaniques en compression non-confinée

Nous avons évalué la rigidité du produit JointRep™ en calculant son module d'Young sécant après avoir mesuré la contrainte en fonction de la déformation [Figure 3.21 A]. Le produit JointRep™ a un comportement presque linéaire, le module d'Young sécant aux petites déformations étant presque identique au module d'Young sécant aux grandes déformations : 30 kPa et 36 kPa pour 30% et 50% de déformation respectivement [Figure 3.21 B]. Si l'on compare aux gels du LBeV, on remarque que le gel SHC0075PB004 présente une rigidité statistiquement plus grande que le produit JointRep™ à 50% de déformation.

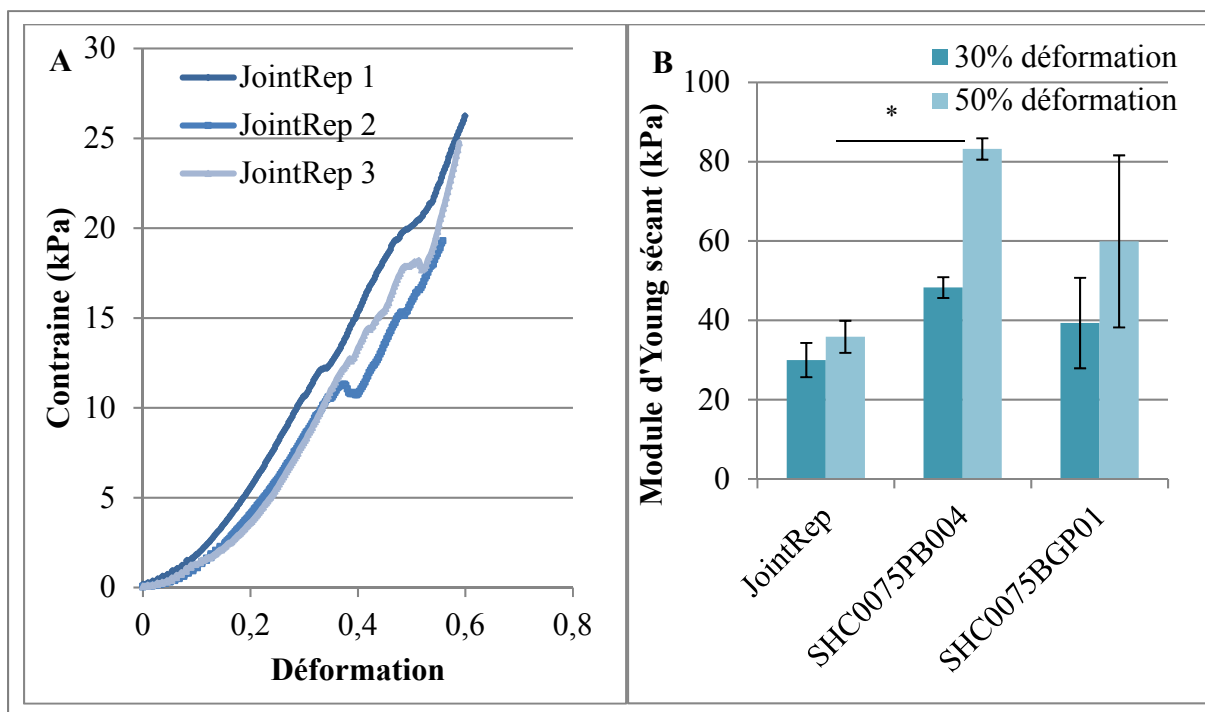


Figure 3.21: A) Contrainte en fonction de la déformation du produit JointRep™ lors des tests de compression non confinée. B) Comparaison des modules d'Young sécants à 30% et 50% de déformation du produit JointRep™ avec les hydrogels du LBeV (Moyenne + ET, n=3).

* : $p < 0,05$ lors du test ANOVA

3.2.3 pH et Osmolalité

Le pH et l'osmolalité du produit JointRep™ ont été évalués après 24h de gélification. Le pH mesuré est de 6,9, valeur qui est en accord avec celle annoncée par la compagnie (entre 6,8 et 7,2). Cette valeur est très proche du pH physiologique (7,4) ce qui est indispensable si l'on veut ajouter des cellules pour que le produit soit apte à la thérapie cellulaire. On remarque que JointRep™ possède également une osmolalité isotonique qui est de 315 mOsm/kg. Si l'on compare avec nos hydrogels, on note que SHC0075PB004 et SHC0075BGP01 ont également un pH et une osmolalité physiologiques [Tableau 3.2.1].

Tableau 3.2.1 : pH et osmolalité du produit JointRep™ ainsi que des gels SHC0075PB004 et SHC0075BGP01

Hydrogels	pH	Osmolalité (mOsm/kg)
JointRep™	$6,9 \pm 0$	$315,7 \pm 0,6$
SHC0075PB004	$7,1 \pm 0,3$	$242,3 \pm 22,8$
SHC0075BGP01	$7,7 \pm 0$	$336,0 \pm 4,4$

3.2.4 Évaluation de la morphologie et de la porosité par MEB

La morphologie d'hydrogels lyophilisés observés au MEB est présentée Figure 3.22. Même si la porosité d'hydrogels lyophilisés n'est pas forcément représentative de la porosité d'hydrogels hydratés, on remarque que les deux gels présentent des morphologies différentes. JointRep™ possède des petits pores de moins de 100 μm et la présence de bulles (grosse cavités de plus de 2 mm de diamètre) peut être expliquée par la méthode de préparation (mélange de deux seringues qui peut emprisonner de l'air). Concernant le gel SHC0075PB004, on remarque la présence de nombreuses surfaces planes avec quelques pores d'environ 1 à 2 mm de diamètre.

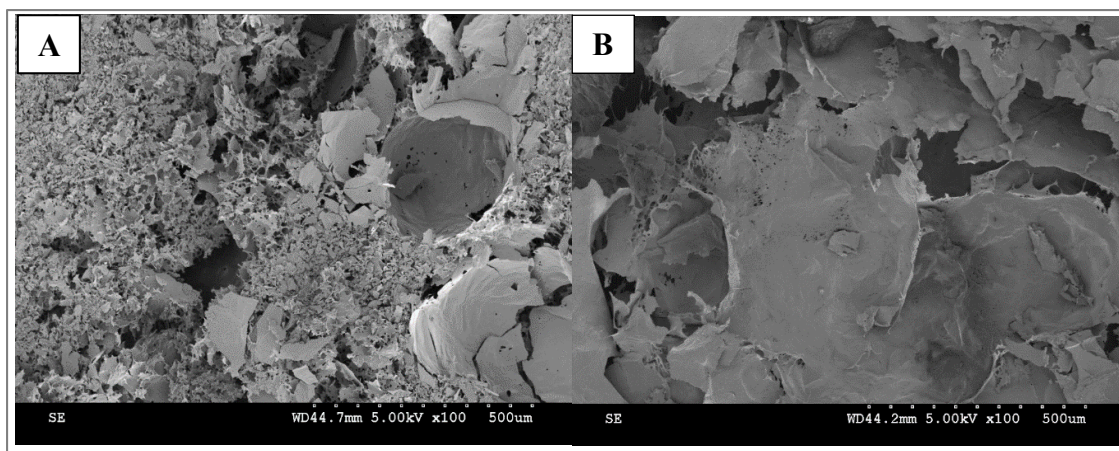


Figure 3.22 : Photographies prises par MEB après 24h de gélification et deux jours de lyophilisation. A) JointRep™ (x100). B) SHC0075PB004 (x100)

3.3 Caractérisation des hydrogels de chitosane-collagène

Nous avons fait l'hypothèse que l'addition de collagène dans nos hydrogels de chitosane augmenterait la viabilité et la croissance cellulaire alors que l'ajout de chitosane dans les gels de collagène permettrait d'augmenter leurs propriétés mécaniques. La section qui suit présente les résultats de rhéologie, tests mécaniques et encapsulation cellulaire de mélanges de chitosane/collagène préparés avec différents ratios volumiques. Tous ces résultats ont été obtenus avec la formulation de gel de chitosane SHC0075PB004 (chitosane 2% m/v, agent gélifiant SHC0075M-PB004M) dans laquelle différents ratios volumiques de solution de collagène PureCol 0,5% (m/v) ont été ajoutés.

3.3.1 Étude rhéologique

La Figure 3.23 A présente l'évolution du module de conservation G' pour les différentes formulations testées de gels de chitosane/collagène, tandis que le Tableau 3.3.1 présente les valeurs des temps de gélification t_{gel} . On constate que t_{gel} augmente lorsque le ratio de collagène dans le gel croît. Il passe de moins de 15s ($G' > G''$ dès la première mesure prise par le rhéomètre) pour le gel de chitosane pur, à 330 s (5,5 min) pour le gel de collagène pur.

De même les valeurs du module de conservation G' sont plus faibles lorsque le ratio de collagène dans le gel augmente. La Figure 3.23 B présente, sur une différence échelle, l'évolution du module G' à 37°C pour les gels de chitosane/collagène avec les ratios volumiques Chit/Coll de 25/75 et 0/100. On remarque que l'hydrogel de collagène pur a un comportement différent de nos gels de chitosane; en effet, son module de conservation est stable jusqu'à environ 5 min puis augmente rapidement pour atteindre un plateau après environ 12 min. Au contraire, les hydrogels riches en chitosane subissent une hausse rapide de leur module de conservation au départ, pour tendre ensuite vers un plateau. Celui-ci est d'autant plus faible que le ratio de collagène dans le gel est élevé.

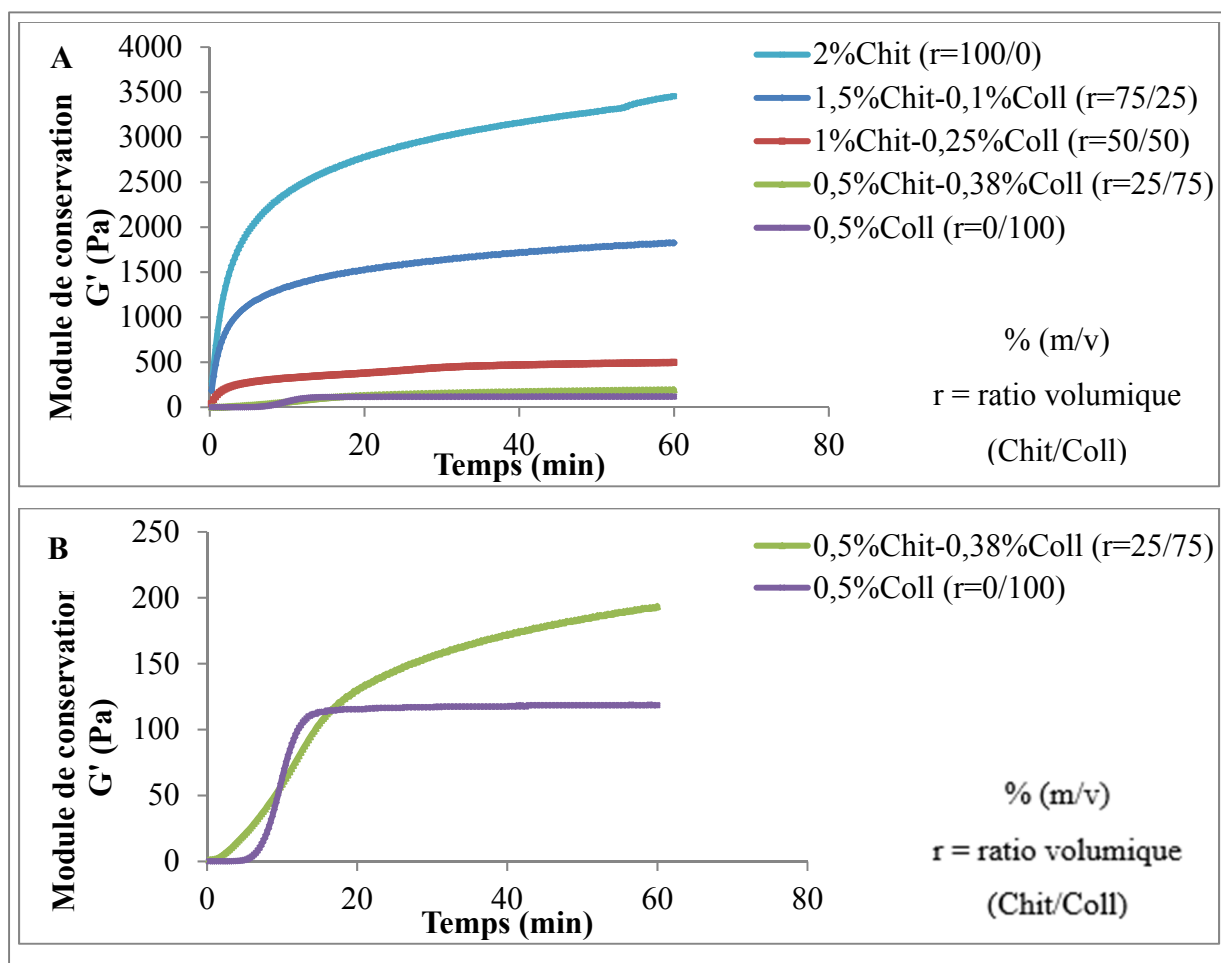


Figure 3.23: A) Évolution du module de conservation de cinq formulations de gels de chitosane-collagène PureCol® 0.5% (m/v), pendant 1h à 37°C. B) Évolution du module de conservation de deux formulations de gels de chitosane-collagène PureCol® 0.5% (m/v), pendant 1h à 37°C (moyenne, $n = 2$ ou 3)

Tableau 3.3.1 : t_{gel} pour différentes formulations de chitosane-collagène (n=2 ou 3)

Chi/Coll (ratio volumique)	[Chi gel]f (% w/v)	[Coll]f (% w/v)	t_{gel} (s)
100/0	2	0	$< 15 \pm 0$
75/25	1,5	0,125	$< 15 \pm 0$
50/50	1	0,25	$< 15 \pm 0$
25/75	0,5	0,375	$127,5 \pm 110$
0/100	0	0,5	330 ± 21

Deux facteurs peuvent expliquer ces différences en termes de cinétique de gélification: la baisse de la concentration de chitosane et l'ajout de collagène dans le gel. Pour comprendre le rôle respectif de ces deux paramètres, des essais rhéologiques ont aussi été réalisés avec des gels de chitosane purs contenant différentes concentration de chitosane (1%, 1,5% et 2%) mais cette fois sans ajout de collagène [Figure 3.24]. La cinétique de gélification de la formulation avec une concentration finale en chitosane de 0,5% (m/v) et sans collagène n'a pu être évaluée car elle était trop liquide et ne gélifiait pas.

On remarque que plus la concentration en chitosane diminue, plus les modules de conservation G' sont faibles. On remarque également que pour une même concentration en chitosane, les gels contenant du collagène possèdent des valeurs de G' plus élevées. Par exemple, le module de conservation, après 1h de gélification, de la formulation contenant 1,5% de chitosane, passe de 878 Pa à 1830 Pa lorsque le collagène est ajouté au gel.

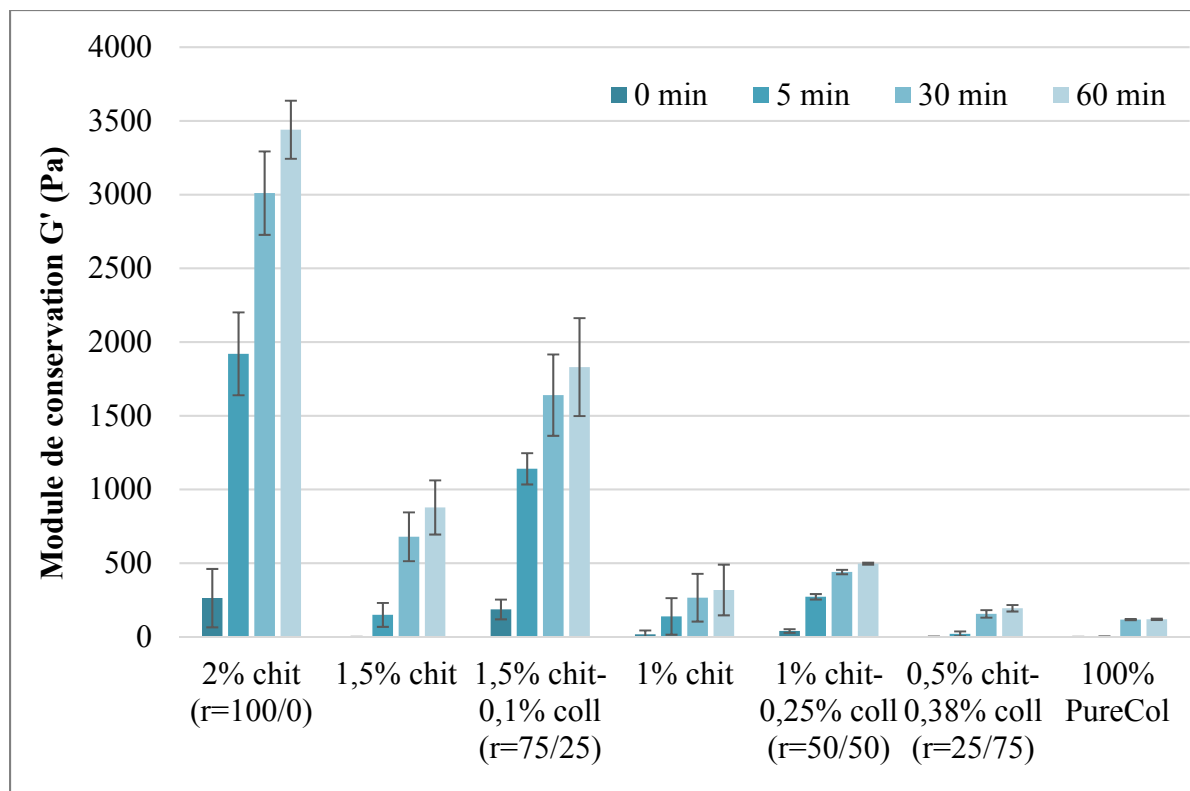


Figure 3.24 : Évolution du module de conservation de formulations d'hydrogels de chitosane avec et sans collagène (moyenne, n = 2 ou 3)

3.3.2 Propriétés mécaniques en compression non-confinée

La Figure 3.25 présente la contrainte en fonction de la déformation pour différentes formulations d'hydrogels de chitosane-collagène après 24h de gélification à 37°C. On remarque que les formulations avec un plus grand ratio Chit/Coll ont un comportement viscoélastique non-linéaire alors que les formulations avec un ratio volumique Chit/Coll de 25/75 et 0/100 tendent davantage vers un comportement élastique linéaire. De plus, bien que la contrainte maximale ne soit pas toujours visible puisque les tests se sont arrêtés à 50% de déformation, la résistance mécanique des gels riches en chitosane est nettement supérieure.

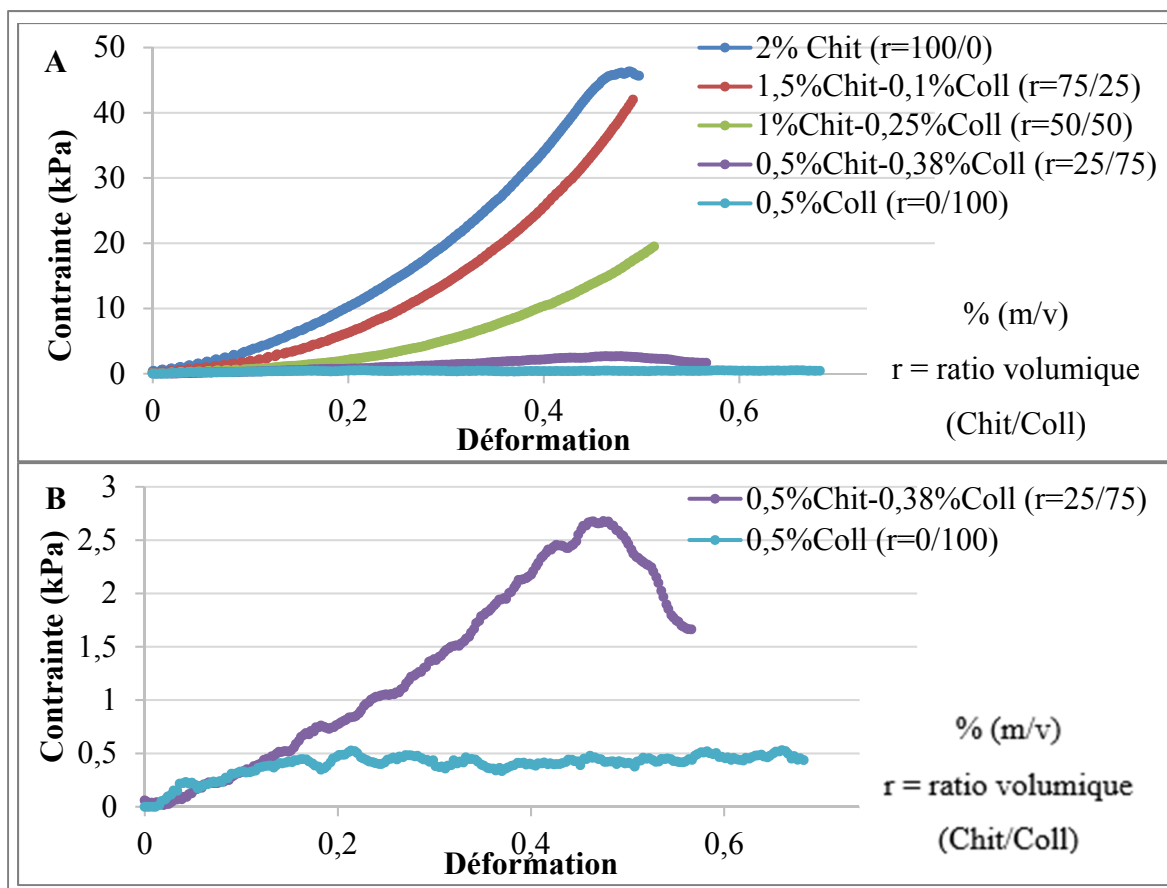


Figure 3.25 : A) Courbes de contrainte en fonction de la déformation de cinq formulations d'hydrogels de chitosane-collagène. B) Focus sur les formulations 0,5%Chit-0,38%Coll et 0,5%Coll (moyenne, n=3 ou 4)

La Figure 3.26 présente les modules d'Young sécants en compression de gels de chitosane/collagène, déterminés à 30% et 50% de déformation. On remarque que les hydrogels riches en collagène ont une rigidité beaucoup plus faible que les hydrogels riches en chitosane. Cette réduction est en fait attribuable à la diminution de la concentration en chitosane causée par l'ajout de collagène. En effet, pour une même concentration de chitosane, les gels de chitosane+collagène ont une rigidité plus élevée que leur équivalent sans collagène : les modules d'Young sécants à 50% de déformation sont de 58 kPa et 79 kPa pour les gels 1,5%chitosane (m/v) et 1,5%chitosane + 0,1%PureCol respectivement. Le gel de chitosane 0,5% (m/v) sans collagène n'apparaît pas car il était trop faible et pas assez cohésif pour être testé en compression.

On peut conclure de la même façon que l'ajout de chitosane au gel PureCol® augmente considérablement ses propriétés mécaniques. Le module d'Young sécant à 50% de déformation passe de 0,8 kPa pour le gel 100%PureCol à 5 kPa pour 0,5%chit + 0,38%PureCol (m/v) et jusqu'à 80 kPa pour 1,5%Chit + 0,1%PureCol.

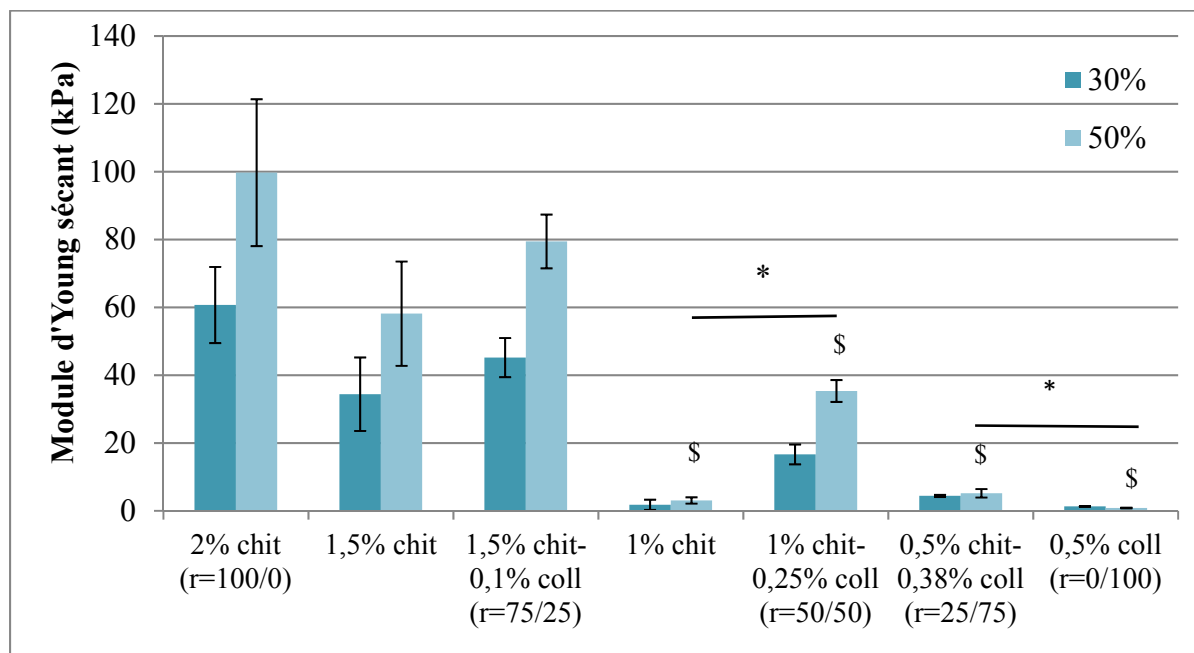


Figure 3.26: Modules d'Young sécants en compression à 30% et 50% de déformation pour différentes formulations de chitosane/PureCol 0,5% (m/v) (moyenne + ET, n=3 ou 4). \$: $p < 0,05$ comparé au module d'Young à 50% de déformation pour le gel 2% chit et * : $p < 0,05$ (ANOVA suivi d'un test de Bonferroni)

3.3.3 pH et Osmolalité

Les valeurs des pH et de l'osmolalité des gels de chitosane/collagène sont très proches des valeurs physiologiques (7,4 pour le pH et environ 300 mOsm/L pour l'osmolalité) [Figure 3.27]. Il semblerait néanmoins que le pH des gels de PureCol® purs soit légèrement plus acide que les gels avec du chitosane (pH de 6,5).

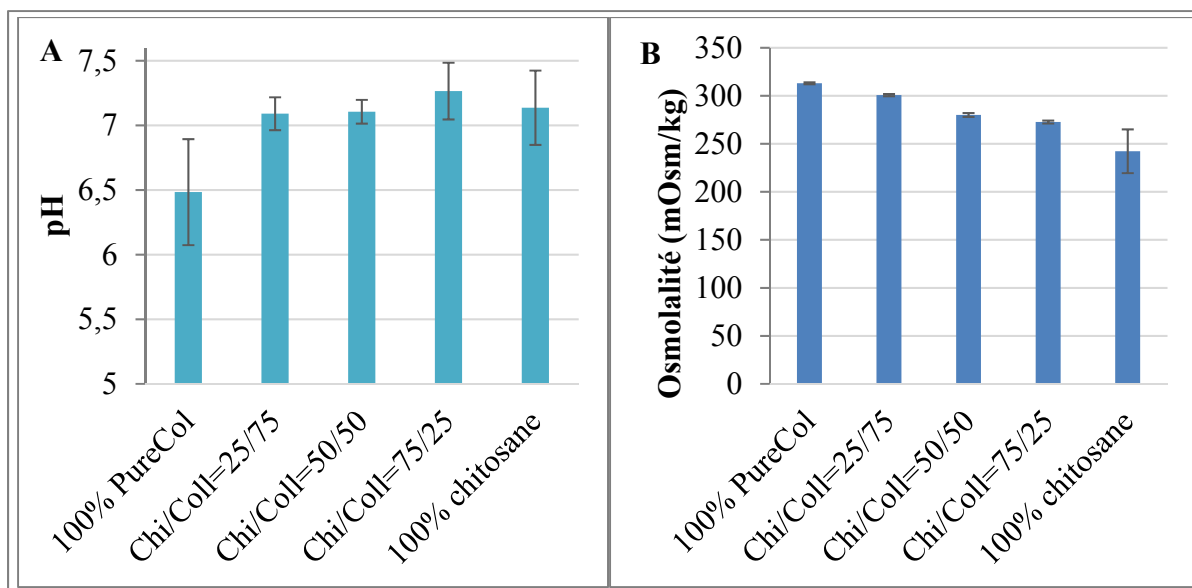


Figure 3.27 : A) pH et B) Osmolalité de différentes formulations d'hydrogels de chitosane/collagène après 24h de gélification à 37°C (moyenne \pm ET, n=3)

3.3.4 Évaluation de la morphologie et de la porosité par MEB

La Figure 3.28 présente des photographies d'hydrogels lyophilisés prises par MEB, montrant clairement une influence de la composition en collagène sur la structure du gel, même si la porosité des produits lyophilisés ne peut être extrapolée à celle des gels hydratés. L'ajout de collagène augmente le nombre de pores et diminue leur taille. De plus, dès l'ajout de 50% en volume de collagène, on observe l'apparition de structures fibrillaires qui sont très probablement des fibres de collagène.

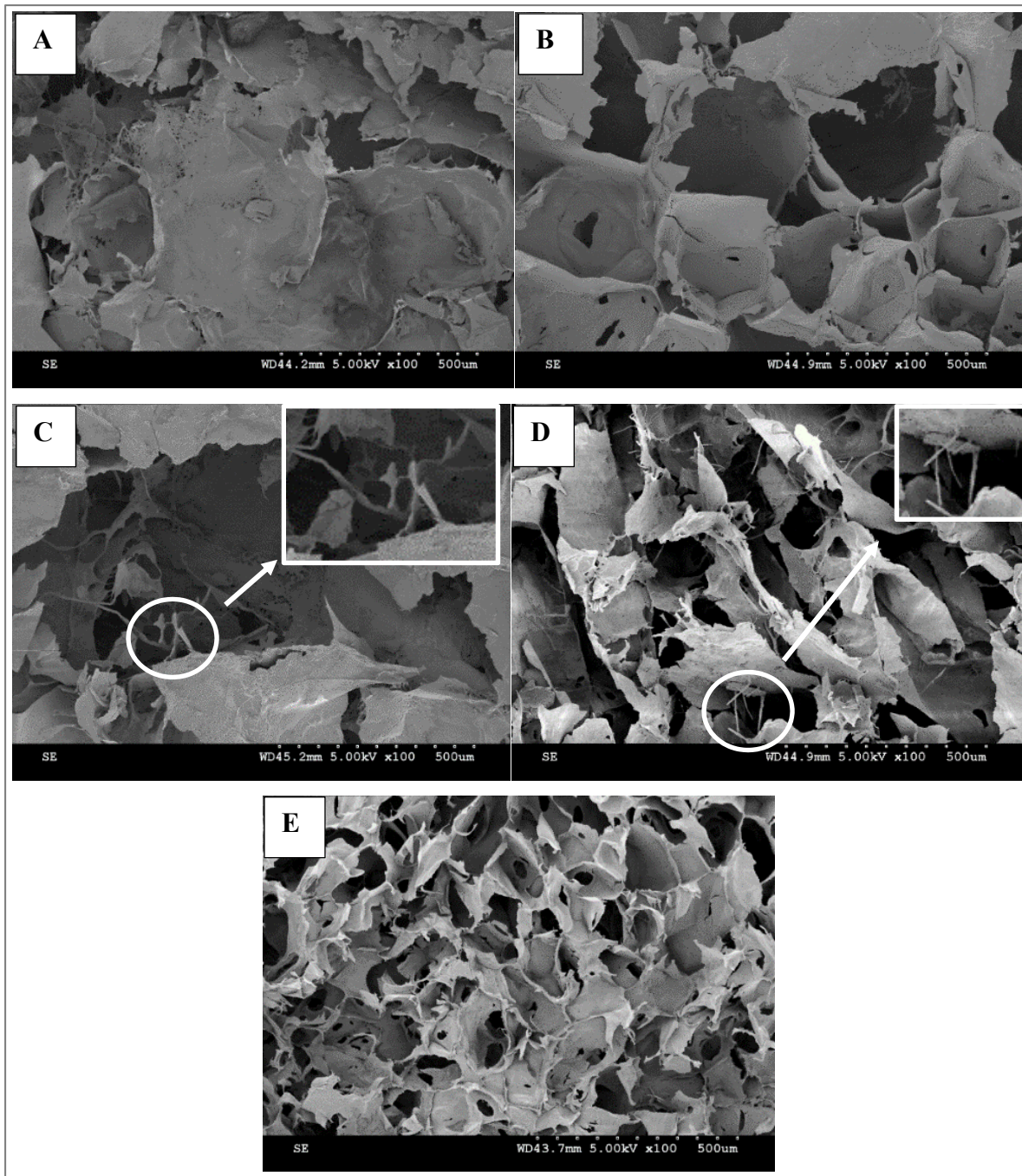


Figure 3.28 : Photographies prises par MEB A) $r = 100/0$ (Chit/Coll). B) $r = 75/25$ (Chit/Coll). C) $r = 50/50$ (Chit/Coll). D) $r = 25/75$ (Chit/Coll). E) $r = 0/100$ (Chit/Coll)

3.3.5 Évaluation de la viabilité cellulaire *In vitro*

La Figure 3.29 présente l'émission de fluorescence qui découle de l'activité métabolique des cellules encapsulées dans différentes formulations d'hydrogels de chitosane/collagène pendant 7 jours, normalisée par rapport au gel 100% Chitosane au jour 1. Pour les formulations 75%Chit-25%Coll et 25%Chit-75%Coll seulement, on note une augmentation significative de l'activité métabolique des fibroblastes encapsulés entre les jours 1 et 7. Au jour 7, la formulation 25%Chit-75%Coll présente une émission de fluorescence statistiquement supérieure à celle des autres formulations ($p < 0,01$).

Ces résultats suggèrent que l'ajout de collagène n'améliore pas significativement la survie des cellules au sein des gels de chitosane, excepté pour la formulation 25%Chit-75%Coll. Ces résultats sont néanmoins à prendre avec précaution étant donné les écarts types et la mauvaise reproductibilité des résultats. En effet, même si l'expérience a été effectuée trois fois, nous avons noté de grandes variations dans les résultats. Ceci pourrait s'expliquer notamment par la méthode utilisée pour quantifier la fluorescence dans les gels, qui reste à optimiser. En effet, il faut détruire les gels afin que le colorant pénètre et accède aux cellules, et nous avons remarqué que notre méthode ne permet pas la destruction des gels de façon homogène.

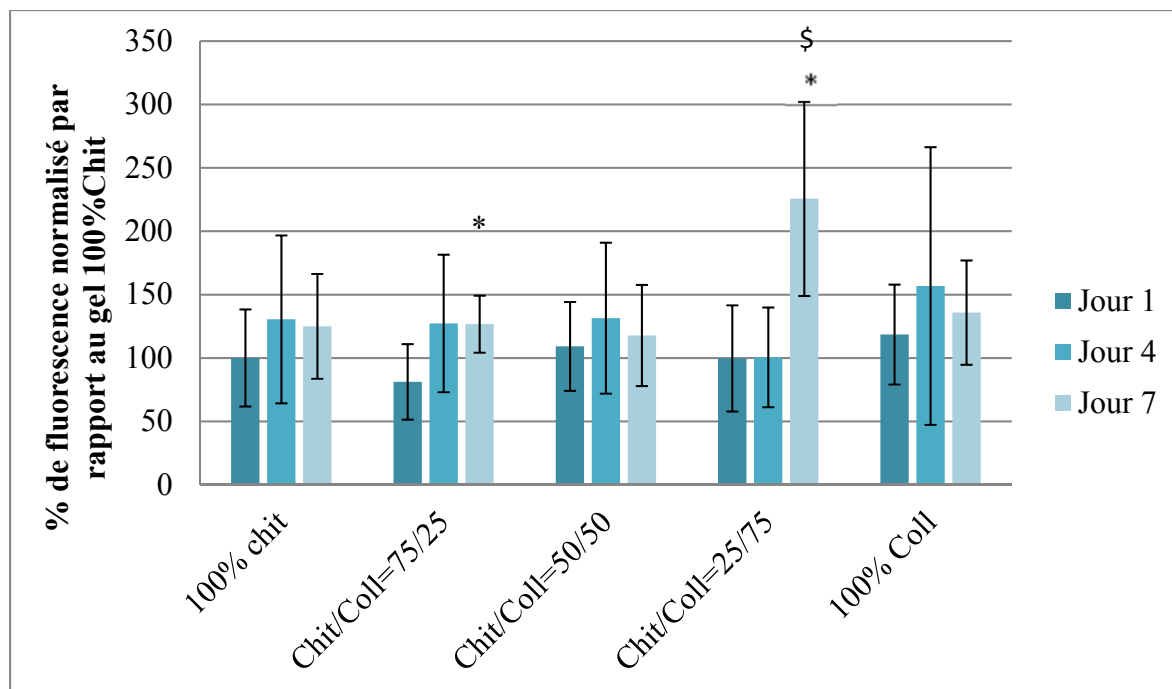
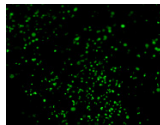
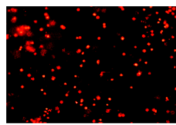
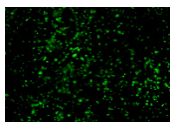
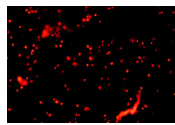
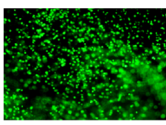
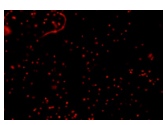
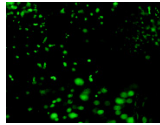
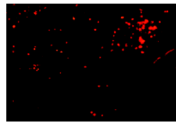
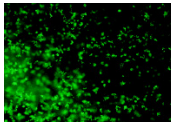
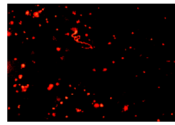
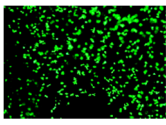
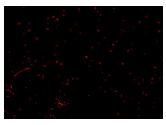
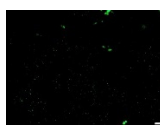
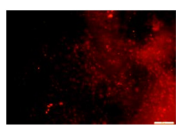
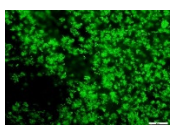
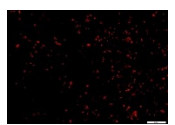
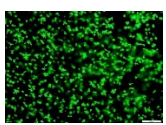
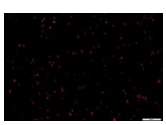
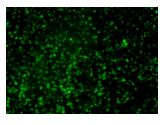
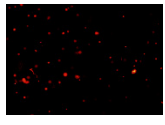
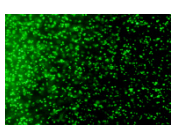
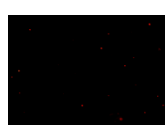
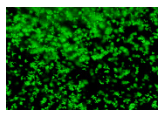
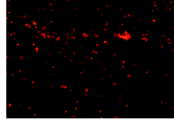
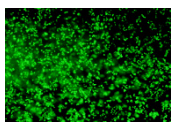
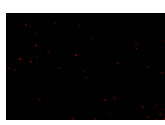
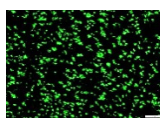
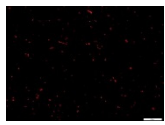
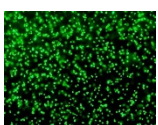



Figure 3.29 : Cytocompatibilité par Alamar Blue, d'hydrogels de chitosane/collagène évaluée par l'activité métabolique des cellules L929 encapsulées (moyenne \pm ET, $n=3$, $N=3$). Test ANOVA : $p < 0,05$. * = $p < 0,01$ entre jour 1 et 7. \$ = $p < 0,01$ comparé au jour 7 des autres formulations

Pour valider ces résultats, des tests Live/dead ont également été faits, qui colorent les cellules vivantes en vert et les mortes en rouges. Le Tableau 3.3.2 présente des photographies représentatives prises par microscopie à fluorescence dans les différentes formulations d'hydrogels de chitosane/collagène. On remarque que l'ajout de collagène permet de réduire la quantité de cellules mortes dans le gel de chitosane et à augmenter le nombre de cellules vivantes, et ce dès l'ajout d'un volume de 25% de collagène. On observe également une diminution du nombre de cellules vivantes après 7 jours d'encapsulation dans la formulation 100%Chit alors que le nombre de cellules est stable voire augmente pour les formulations contenant du collagène. Malheureusement la quantification des essais Live-dead est difficile. De plus, les tendances ne sont pas similaires à celles de l'Alamar Blue présentées plus haut, ce qui rend les conclusions difficiles.

Tableau 3.3.2 : Viabilité de cellules L929 encapsulées dans des hydrogels de chitosane/collagène après coloration Live/Dead évaluée par fluorescence (x15)

	100% Chit		75%Chit-25%Coll		50%Chit-50%Coll	
	Live	Dead	Live	Dead	Live	Dead
J1						
J4						
J7						
	75%Chit-25%Coll		100%Coll			
	Live	Dead	Live	Dead		
J1						
J4						
J7						

CHAPITRE 4

DISCUSSIONS, LIMITES ET PERSPECTIVES

4.1 Évaluation du potentiel d'hydrogels de chitosane pour la prévention des adhérences tissulaires

Le **premier objectif** de ce projet était d'évaluer le potentiel des thermogels de chitosane récemment développés par le laboratoire pour la prévention des adhérences tissulaires.

La formation d'adhérences après une chirurgie reste une conséquence presque inévitable pour la plupart des procédures abdominales et résulte en de nombreuses complications. Les coûts estimés aux États-Unis étaient d'environ 1,2 milliards de dollars en 2002 (Liakakos et al., 2001; Ward & Panitch, 2011). Différentes stratégies de préventions existent mais elles sont soit inefficaces (agents pharmacologiques) ou soit incompatibles en chirurgie mini-invasive et difficiles à administrer (barrières physiques collantes). Une barrière de prévention idéale doit non seulement être facile à manipuler et à appliquer mais doit également pouvoir couvrir des surfaces irrégulières. De plus, elle doit être biocompatible et avoir une cinétique de dégradation appropriée. Il est ressorti de cette étude que la formulation SHC0075BGP01 constituait un candidat prometteur pour la prévention des adhérences abdominales postopératoires car il répondait le mieux aux critères du cahier des charges, tels que présentés dans le Tableau 4.1.1. D'une part, ce gel a la capacité de former un film cohésif *in vitro* et *in vivo* et d'autre part, il a une cinétique de gélification adéquate : il est très peu visqueux à température ambiante puis atteint une rigidité et des propriétés mécaniques intéressantes à 37°C. En effet le module de conservation G' augmente rapidement et atteint 4 kPa après 1h à 37°C. De plus, après 24h de gélification, la résistance mécanique (contrainte à la rupture = 28 kPa), le module d'Young sécant en compression (60 kPa à 50% de déformation) et le module d'Young sécant en tension (30 kPa), sont assez élevés pour des hydrogels et notamment nettement supérieurs à ceux des formulations de chitosane/BGP conventionnelles dont le module sécant ne dépasse pas les 10 kPa (Assaad et al., 2015; A. Deng, Kang, Zhang, Yang, & Yang, 2017).

Tableau 4.1.1 : Tableau récapitulatif des critères du cahier des charges pour la prévention des adhérences abdominales (++ : répond très bien au critère, + : répond assez bien; - répond moyennement bien ; -- ne répond pas bien au critère)

	Cinétique de gélification	Stabilité à 22°C	Etalement	Dégradation	Propriétés mécaniques
SHC0075BGP01	++	++	++	-	++
SHC0075PB004	++	+	++	-	++
Interceed®			--	++	?

La période critique pour la formation des adhérences tissulaires est de 3 jours après la chirurgie, au cours desquels la fibrinolyse détruit la couche de fibrine et l'épithélium se ré-épithélialise. Si la fibrinolyse ne se produit pas, un tissu fibreux se développe et se vascularise, créant des adhérences. L'agent préventif doit donc être présent et ne pas se dégrader durant cette période, mais une fois que la fibrinolyse a eu lieu, la barrière doit se résorber afin de ne pas provoquer de réponse inflammatoire qui pourrait mener à une encapsulation dans un tissu fibreux, et donc à des adhérences (Shahram et al., 2013).

La capacité de nos hydrogels à relarguer un agent pharmaceutique a été étudiée avec l'héparine, un agent anticoagulant, qui est connue pour aider à la guérison des tissus (Alonso et al., 2014; Kweon et al., 2003). L'idée de l'incorporer dans nos gels permettrait de contrôler son relargage et ce, de manière locale. Bien que l'on observe un «burst effect» (libération rapide) durant les 5 premières heures, ceci n'est pas nécessairement négatif car cela permettrait de contrer les phénomènes de coagulation qui ont lieu lors d'une chirurgie. De plus, il reste encore plus de 90% de l'héparine au sein du gel et le relargage est plus progressif par la suite. Seulement une petite partie de l'héparine se libère après 15 jours (entre 6 et 12%) ce qui confirme la formation d'un complexe entre l'héparine et le chitosane, qui a été mise en évidence dans plusieurs études (Bueno et al., 2015; Kweon et al., 2003). Cela est intéressant car l'héparine restante sera alors relarguée progressivement lors de la dégradation du matériau. Cet essai présente néanmoins des limites car ces résultats ne peuvent être extrapolés au comportement *in vivo*.

En effet, les contraintes que subira le matériau ainsi que la présence de multiples enzymes dans le corps accéléreront certainement la libération de l'agent thérapeutique. Une étude de libération avec dégradation du gel par du lysozyme par exemple, permettrait de voir si l'agent actif se libère de manière continue lors de la résorption du gel. Il faudrait par ailleurs s'assurer que l'héparine reste bioactive et que la quantité relarguée est suffisante pour garantir une activité efficace. En ANNEXE V est présentée une méthode normée afin d'évaluer l'activité de l'héparine.

Enfin, nous avons évalué le potentiel du gel SHC0075BGP01, sans héparine, à prévenir l'apparition des adhérences dans un modèle *in vivo* chez le rat, et nous avons comparé son efficacité à celle d'une barrière physique commercialisée, Interceed®. Le score des adhérences a été réduit dans le groupe de rats traités avec l'hydrogel de chitosane de manière statistiquement significative comparativement au groupe non traité ($p=0,0010$). L'utilisation du gel SHC0075BGP01 a permis de prévenir strictement l'apparition d'adhérences dans 25% des rats contre 50% avec le produit Interceed®. Cependant l'analyse statistique ne conclue pas à une différence significative entre ces deux traitements et la surface adhérente résiduelle est significativement plus grande dans le groupe traité avec l'hydrogel de chitosane. Ceci est peut-être en partie dû au faible nombre d'animaux (8 pour chaque groupe) qui réduit la puissance statistique. Quoiqu'il en soit, il faut tenir compte du fait qu'Interceed® présente des contraintes d'utilisation non négligeables, tels qu'une difficulté de manipulation (colle aux gants et devient gélatineux en présence de fluides) et d'utilisation par laparoscopie, dû au fait qu'il n'est pas injectable. De plus, ce produit n'est plus efficace lorsqu'il est en contact avec du sang.

L'utilisation d'un hydrogel tel que SHC0075BGP01 présente l'avantage d'être compatible à la fois pour les chirurgies en laparotomie et en laparoscopie, il est facile à utiliser et il recouvre parfaitement les surfaces endommagées. Par contre, contrairement à Interceed® qui était complètement dégradé après 15 jours, l'hydrogel SHC0075BGP01 était toujours présent sous la forme de petites boules blanches et rigides. Il est possible que, dû à la forte capacité d'absorption du péritoine, l'eau contenue dans le gel ait été absorbée. On pourrait se demander si les adhérences présentes disparaîtraient si l'hydrogel se dégradait complètement.

L'efficacité de notre hydrogel pourrait donc avoir été limitée par une cinétique de dégradation trop lente du matériau. Ceci pourrait être ajusté en diminuant le DDA du chitosane. En effet, Shahram et al. ont montré que la durée optimale de persistance d'hydrogels en tant que barrière fluide ne doit pas dépasser 2 semaines. Dans le cas contraire, la barrière préventive est inutile et peut induire de l'inflammation et ainsi compromettre la guérison des tissus (Shahram et al., 2013).

Des essais de dégradation en présence d'enzyme ont montré que le module G' de la formulation SHC0075PB004 diminuait de 70% et de 60% après une semaine d'immersion dans du lysozyme pour un chitosane à haut DDA et à faible DDA respectivement. Il a été largement documenté dans la littérature qu'un plus faible DDA menait à une dégradation plus rapide pour deux raisons : la première étant que le lysozyme hydrolyse les liaisons entre deux groupements acétyles du chitosane. De ce fait, plus le DDA du chitosane diminue, plus il y a de groupements acétyles et plus la dégradation est rapide (Han et al., 2012; Nordtweit, Varum, & Smidsrod, 1996; Ren et al., 2005). Néanmoins, ce n'est pas ce que l'on a observé lors des essais de dégradation. Plusieurs raisons peuvent expliquer ces résultats : tout d'abord, le chitosane à haut DDA et à faible DDA ne proviennent pas du même fournisseur et si la masse moléculaire des deux chitosanes n'est pas la même, cela peut mener à une cinétique de dégradation différente. En effet, des chaînes moléculaires plus courtes occasionnent une réduction des liaisons intermoléculaires et donc un affaiblissement du réseau polymérique. Aussi, des petites chaînes de chitosane se dégraderont plus vite en oligosaccharides comparé à un chitosane à grande masse moléculaire (Croisier & Jérôme, 2013). La masse moléculaire des deux poudres de chitosane utilisées pourrait être évaluée en effectuant des essais de viscosité sur des solutions diluées de polymères et en utilisant la loi de Mark-Houwink-Sakurada ($\eta = K \times Mv^\alpha$, où K et α varient avec le couple solvant/polymère considéré et la température de la solution) (IUPAC, 1997). Il est important de mentionner que cette dégradation des propriétés mécaniques ne corrèle pas nécessairement avec la perte de masse du matériau (mesure généralement utilisée pour suivre la dégradation). D'ailleurs, les essais *in vivo* suggèrent qu'au bout de 14 jours, un volume important du matériau subsiste pour le chitosane à haut DDA.

Une des limites de cette étude est principalement le faible nombre de rats utilisés pour les essais *in vivo* qui ne nous permettent pas de faire des statistiques robustes. La priorité suite à cette étude serait d'optimiser la cinétique de dégradation de notre hydrogel de chitosane et d'évaluer le potentiel d'hydrogel contenant de l'héparine pour accélérer la guérison des tissus.

Ce projet a d'ailleurs fait l'objet de deux affiches lors des congrès annuels de la société américaine des biomatériaux (Society for Biomaterials, SFB2017) à Minneapolis et de la Société Canadienne des biomatériaux (CBS2017) à Winnipeg, durant lequel le poster a gagné le prix de la meilleur affiche.

4.2 Caractérisation du produit JointRep™ pour la régénération du cartilage

Le **second objectif** de ce projet de maîtrise consistait à caractériser le produit JointRep™, un produit injectable prometteur récemment mis sur le marché par OligoMedic Inc. pour la régénération du cartilage, afin d'évaluer ses propriétés et de les comparer avec les hydrogels développés au LBeV. Des études fondamentales et cliniques ont montré que JointRep™ ne présente aucune cytotoxicité, irritation, mutagénicité, sensibilisation cutanée ou toxicité systémique (Chenite et al., Article inédit non soumis). Le produit est déjà commercialisé dans de nombreux pays, notamment européens et asiatiques. Le processus de demande d'approbation par la FDA et Santé Canada est en cours afin de pouvoir le commercialiser en Amérique du Nord. Le Tableau 4.2.1 résume et compare les propriétés de deux formulations de gels de chitosane et de JointRep™ pour la régénération du cartilage.

Tableau 4.2.1 : Tableau récapitulatif des critères du cahier des charges pour la régénération du cartilage (++ : répond très bien au critère, + : répond assez bien; - répond moyennement bien ; -- ne répond pas bien au critère)

	Cinétique de gélification	Stabilité à 22°C	Dégradation	Propriétés mécaniques	Viabilité cellulaire
SHC0075BGP01	++	++	-	++	-
SHC0075PB004	++	+	-	++	-
JointRep™	+	--	?	+	?

JointRep™ présente une gélification rapide, avec un $t_{gel} < 15s$ immédiatement après le mélange, et ce même à température pièce. La viscosité initiale à 22°C du produit est dix fois plus grande que celle de nos hydrogels, il gélifie à 22°C et atteint même des propriétés mécaniques élevées après 1h de gélification à température ambiante ($G' > 2$ kPa). On observe tout de même un effet de la température puisque les valeurs de G' atteintes après une heure de gélification à 37°C sont plus élevées ($G' > 7$ kPa), ce qui est significativement supérieur à nos hydrogels usuels. L'effet de la température est cependant plus marqué pour certains gels du LBeV, pour lesquels G' reste stable à 22°C ($G' < 0,5$ kPa). La gélification rapide du produit JointRep™ à température pièce peut être considérée comme un inconvénient car le produit pourrait être plus difficile à injecter par aiguille et cela demandera un effort supplémentaire au chirurgien pour effectuer l'injection au niveau du cartilage défectueux. Aussi, un gel qui gélifie trop vite ne pourra pas bien épouser la forme du défaut à combler et pourrait donc compromettre la guérison du tissu. Par contre, une gélification rapide a également des avantages car elle permet au matériau de ne pas se disperser hors du site d'intérêt et de remplacer rapidement les propriétés mécaniques du tissu. Après 24h de gélification à 37°C, le produit JointRep™ a un comportement relativement linéaire en compression, et son module sécant à 50% de déformation atteint 36 kPa. Ceci est supérieur à beaucoup d'hydrogels physiques (qui ne nécessitent pas de réticulations ou de photopolymérisation) mais environ deux fois plus faible que les hydrogels de chitosane développés par le LBeV.

Bien que le pH et l'osmolalité de JointRep™ soient proches des valeurs physiologiques et que des essais de biocompatibilité aient été effectués par OligoMedic Inc, cela ne permet pas de conclure quant au potentiel de leur gel pour l'encapsulation cellulaire et donc pour la régénération du cartilage par thérapie cellulaire. Pour cela, il serait utile d'effectuer des essais d'encapsulation avec des cellules souches ou des chondrocytes afin d'évaluer la viabilité de cellules cartilagineuses au sein du produit et pouvoir l'envisager en tant que matrice pour la thérapie cellulaire.

Les travaux récents effectués avec les hydrogels du LBeV montrent que de nouveaux thermogels de chitosane, et notamment les formulations SHC0075BGP01 et SHC0075PB004 sont prometteuses en tant que matrices pour la thérapie cellulaire, car elles combinent une viscosité faible avant et pendant l'injection, une gélification rapide *in situ*, une forte rigidité mécanique finale, afin d'assurer une résistance aux contraintes *in vivo*, et enfin une excellente survie cellulaire *in vitro* (Ceccaldi et al., 2017).

Outre le pH et l'osmolalité, plusieurs facteurs peuvent influencer la survie de cellules encapsulées. Parmi eux la porosité et la taille des pores; une structure poreuse et interconnectée étant indispensable pour l'adhésion, la prolifération, la migration et la nutrition cellulaire (Loh & Choong, 2013). Les images au MEB montrent une claire différence de structure entre le produit JointRep™ et le gel SHC0075PB004, avec des pores plus petits pour JointRep™ (de moins de 100 µm) en plus de quelques grosses cavités dû aux bulles emprisonnées. Cependant il est difficile de tirer des conclusions car la porosité d'un gel lyophilisé ne correspond pas vraiment à la porosité du gel hydraté.

Loh et al. ont montré que pour l'encapsulation de chondrocytes, la taille de pores idéales seraient entre 200 et 500 µm, ce qui favoriserait également une bonne production de GAGs. En parallèle, des pores supérieurs à 300 µm de diamètre seraient souhaitables pour une meilleure vasculogénèse (Loh & Choong, 2013).

La survie et la prolifération cellulaires dépendent également d'autres facteurs tels que les propriétés mécaniques et la composition du gel, qui influencent les interactions cellules-matrices indispensables à la survie de la plupart des types cellulaires. Elles dépendent donc aussi du type de cellules, du matériel utilisé et des conditions de fabrication (Loh & Choong, 2013).

Les limites de cette étude résident essentiellement dans les méthodes de caractérisation mécaniques qui se sont limitées à de simples essais de compression non confinée et de traction. Des essais cycliques, des essais de relaxation et de compression confinée devraient être envisagés pour mieux caractériser le comportement mécanique de ces matériaux viscoélastiques. En effet, une compression confinée représenterait plus adéquatement les conditions mécaniques d'une articulation, notamment dans le cas de défauts profonds où le matériau de remplacement ne pourra pas se déformer latéralement comme c'est le cas lors d'un essai de compression non confinée. Le comportement du produit JointRep™ et de nos hydrogels sous des contraintes cycliques serait important à analyser pour voir l'effet de contraintes répétées telles qu'imposées par la marche.

Par la suite il serait intéressant de pousser l'étude de notre formulation SHC0075PB004 car elle semble prometteuse pour la régénération du cartilage. Ce gel est clairement thermosensible, c'est-à-dire qu'il est relativement stable à température ambiante, mais gélifie rapidement à 37°C et son module d'Young sécant atteint des valeurs deux fois plus élevées que JointRep™ après 24h de gélification. Encapsuler des chondrocytes ou des MSCs et évaluer leur viabilité et leur capacité à synthétiser des GAGs seraient une prochaine étape à cette étude. Éventuellement, des essais *in vivo* pourraient confirmer le potentiel de ce gel de chitosane pour la régénération du cartilage. Pour démontrer l'efficacité et la sécurité d'un produit, des études à long terme sur de grands animaux et sur des lésions cartilagineuses profondes seraient nécessaires (Chu, Szczodry, & Bruno, 2010).

4.3 Caractérisation d'hydrogels de chitosane-collagène

Pour optimiser ces gels pour l'ingénierie tissulaire, l'ajout de composants de la MEC est une stratégie couramment utilisée. De nos jours, des avancées significatives ont été réalisées dans la compréhension que nous avons de la façon dont la MEC affecte les réponses cellulaires. Le collagène est un constituant majeur de la MEC et est un substrat pour les cellules qui encourage la migration, l'adhésion et la prolifération cellulaire. C'est pourquoi, le **troisième objectif** de ce projet était d'évaluer les propriétés mécaniques et biologiques d'hydrogels hydrides de collagène et chitosane.

Nous avons fait l'hypothèse que l'addition de collagène dans nos hydrogels de chitosane augmenterait la viabilité et la croissance cellulaire sans trop altérer leurs propriétés mécaniques. A l'inverse, nous avons aussi fait l'hypothèse que l'ajout de chitosane dans les gels de collagène de la compagnie Advanced Biomatrix (PureCol® EZ Gel 0.5% (w/v), collagène bovin de type I neutre et isotonique) permettrait d'augmenter leurs propriétés mécaniques. Nous avons donc développé plusieurs formulations d'hydrogels de chitosane/collagène avec différents ratios volumiques. Nous avons choisi d'utiliser l'agent gélifiant SHC0075PB004 car il possède des propriétés mécaniques plus élevées que le gel SHC0075BGP01 ce qui est préférable pour le remplacement du cartilage. De plus Ceccaldi et al. ont montré que la survie cellulaire était meilleure dans le gel SHC0075PB004 que dans SHC0075BGP01 (Ceccaldi et al., 2017). Le Tableau 4.3.1 résume et compare les propriétés des hydrogels de chitosane contenant différents ratios de collagène.

Tableau 4.3.1 : Tableau récapitulatif des propriétés des hydrogels de chitosane-collagène
(++ : répond très bien au critère, + : répond assez bien; - répond moyennement bien ; -- ne répond pas bien au critère)

	Cinétique de gélification	Stabilité à 22°C	Propriétés mécaniques	Porosité	Viabilité cellulaire
Chit/Coll =100/0	++	++	++	-	-
Chit/Coll =75/25	++	?	++	-	+
Chit/Coll =50/50	+	?	+	+	+
Chit/Coll =25/75	-	?	-	++	++
Chit/Coll =0/100	--	?	--	++	++

Nous avons montré que l'augmentation du ratio Coll/Chit au sein de nos hydrogels de chitosane ralentissait la cinétique de gélification à 37°C, t_{gel} passant de moins de 15s pour un gel 100% chitosane à plus de 5 min pour un gel 100% collagène.

L'augmentation du ratio Coll/Chit mène également à une diminution des propriétés mécaniques, mais celle-ci est attribuée à la diminution de la concentration en chitosane causée par la dilution qu'entraîne l'ajout du collagène. Pour une concentration similaire de chitosane, les gels contenant du collagène semblent être plus rigides, le module d'Young sécant de la formulation contenant 1,5% de chitosane passant de moins de 60 kPa sans collagène à 80 kPa avec collagène. A l'inverse, l'augmentation du ratio Chit/Coll entraîne une amélioration des propriétés mécaniques des gels de collagène, les modules d'Young sécants passant de 0,8 kPa, à 5 kPa et à presque 40 kPa lorsque les ratios volumiques Chit/Coll passent de 0/100 à 25/75 et à 50/50, respectivement. Nous avons également observé de façon qualitative lors des expériences que le collagène rend les gels de chitosane plus élastiques; cela est un point très intéressant pour la régénération du cartilage car il faut que le matériau se déforme le plus possible avant de se rompre.

Nous pouvons conclure que jusqu'à l'ajout de 50% en volume de collagène, la cinétique de gélification des gels de chitosane/collagène reste adéquate. En effet, les gels sont peu visqueux à température ambiante et leurs t_{gel} restent faibles ($<15s$) pour les formulations avec des ratios Chit/Coll de 75/25 et 50/50. Concernant les propriétés mécaniques après gélification, les modules d'Young sécants atteignent plus de 40 kPa et 80 kPa pour les formulations 50%Chit-50%Coll et 75%Chit-25%Coll, respectivement mais le gel 25%Chit-75%Coll possède un module sécant de seulement 5 kPa ce qui pourrait ne pas être suffisant pour la régénération du cartilage, notamment.

Les essais de viabilité cellulaire, par Alamar Blue et par coloration Live/Dead ont menés à des résultats un peu contradictoires, qui rendent les conclusions difficiles. Mais l'ajout de collagène semble tout de même améliorer la viabilité cellulaire puisqu'on a noté lors du test Alamar Blue une prolifération cellulaire significative entre les jours 1 et 7 pour les formulations avec un ratio Chit/Coll de 75/25 et 25/75 et une viabilité significativement plus élevée au jour 7 pour le gel avec un ratio Chit/Coll de 25/75. De plus, d'après les colorations Live/Dead, la formulation 100%Chit semble être nettement moins cytocompatible que les autres.

Pour conclure sur la caractérisation des hydrogels de chitosane/collagène, nous pouvons dire que l'hydrogel 25%Chitosane-75%Collagène, semble être le candidat le plus prometteur en terme d'amélioration de la cytocompatibilité si l'on se base sur l'essai Alamar Blue. Cependant ce gel présente une faible rigidité (module d'Young sécant de 5 kPa comparé au 100 kPa du gel de chitosane sans collagène). Cela pourrait être un facteur limitant pour son utilisation en ingénierie tissulaire et en particulier pour la régénération du cartilage. Si l'on se base sur l'essai Live/Dead, même la formulation 75%Chitosane-25%Collagène semble être plus favorable à la prolifération cellulaire que le gel 100%Chitosane et possède également des propriétés mécaniques très intéressantes, le module d'Young sécant à 50% de déformation atteignant 80 kPa en compression. Cependant, pour pouvoir vraiment conclure, une optimisation des méthodes de quantification de la viabilité cellulaire devrait être menée afin d'avoir des résultats plus fiables et consistants.

Une autre limite de cette étude est l'utilisation du collagène de type I alors que c'est le collagène de type II qui est majoritairement présent dans le cartilage. L'entreprise Advanced Biomatrix nous fournissant le collagène, nous n'avons pas eu le choix sur le produit. S'il est envisagé d'utiliser un gel de chitosane/collagène pour la régénération du cartilage, il serait préférable d'utiliser du collagène de type II. Aussi, nous avons une quantité limitée de collagène ce qui ne nous a pas permis de tester les propriétés rhéologiques sur trois échantillons ou plus, comme il serait préférable de faire pour avoir des résultats robustes.

Par la suite, il serait très intéressant de réaliser les mêmes essais mais avec un pourcentage massique de chitosane fixe et en faisant varier la quantité de collagène. De cette façon, les modifications des propriétés mécaniques et biologiques seraient uniquement attribuées au collagène et non à la diminution de la concentration en chitosane comme c'est le cas dans cette étude. Il faudrait donc des solutions en chitosane plus concentrée pour compenser l'ajout du collagène. Cependant, cela n'a pu être effectué dans le temps imparti par ce projet car il aurait fallu optimiser la concentration en HCl nécessaire pour solubiliser le chitosane pour chaque formulation.

Des essais mécaniques à 22°C devraient être réalisés car le collagène est connu pour commencer à gélifier à température ambiante et des essais de dégradation pourraient confirmer que le l'ajout de chitosane réduit la vitesse de dégradation des hydrogels de collagène. Enfin, il serait intéressant de réaliser les essais de viabilité cellulaire sur d'autres types cellulaires, notamment les chondrocytes et/ou des MSCs car ce sont les cellules qui sont utilisées dans le cadre de l'ingénierie du cartilage.

CONCLUSIONS

Les hydrogels thermosensibles à base de chitosane, qui gélifient à température physiologique soulèvent un intérêt croissant pour de nombreuses applications cliniques. La combinaison de différents sels (SHC avec PB ou BGP) a permis au laboratoire de concevoir des hydrogels de chitosane thermosensibles à pH physiologique, atteignant d'excellentes propriétés mécaniques et une cytotoxicité réduite.

Dans le cadre de cette maîtrise, nous avons évalué le potentiel de ces hydrogels pour deux types d'applications médicales. D'une part la prévention des adhérences tissulaires (matériau seul), et d'autre part la régénération tissulaire (matériau seul et avec cellules).

En ce qui concerne la prévention des adhérences tissulaires, les résultats *in vitro* montrent que l'hydrogel de chitosane SHC0075BGP01 possède d'excellentes propriétés en terme pratique (injectabilité, étalement, rapidité de gélification, bonne cohésion mécanique). Lors des essais *in vivo* dans un modèle de rat, nous avons démontré que notre hydrogel de chitosane réduisait l'apparition d'adhérences de manière significative mais n'était pas aussi efficace qu'une barrière physique présente sur le marché, Interceed®. Cette dernière ne peut cependant pas être utilisée en chirurgie mini-invasive car elle n'est pas injectable. Une optimisation de notre hydrogel de chitosane, notamment concernant son DDA, pourrait rendre ces résultats encore plus prometteurs. Sa combinaison avec un agent pharmacologique telle que l'héparine pourrait également accélérer la guérison des tissus.

Pour évaluer et optimiser le potentiel de nos gels pour la réparation tissulaire, notamment du cartilage, nous avons comparé nos hydrogels au produit JointRep™ qui a déjà démontré son efficacité dans des études cliniques. Nous avons montré qu'il possédait des propriétés rhéologiques appropriées mais une rigidité deux fois plus faibles que certains hydrogels développés au LBeV. L'utilisation de nos hydrogels de chitosane en tant que matrice pour la régénération du cartilage devrait être étudiée plus attentivement.

Le collagène étant le constituant solide le plus abondant dans la MEC des tissus conjonctifs, nous en avons incorporé dans nos matrices de chitosane afin d'améliorer la viabilité cellulaire. Nous avons conclu que l'ajout de collagène permettait d'améliorer la survie et la prolifération cellulaires, si l'on se base sur l'essai Live/Dead, mais qu'une étude supplémentaire permettrait d'optimiser les formulations d'hydrogels de chitosane/collagène pour conjuguer bonne cytocompatibilité et propriétés mécaniques.

Grâce aux progrès technologiques réalisés au cours de la dernière décennie, les chercheurs peuvent de nos jours adapter les propriétés chimiques, mécaniques, structurelles et biologiques de matrices de biopolymères naturels pour des applications cliniques précises. Cependant, à ce jour, un manque de connaissances approfondies concernant les processus impliqués dans la régénération des tissus et des organes reste encore à combler. Essayer de mimer et repliquer un organe ou tissu humain reste encore un grand défi à relever pour la prochaine décennie.

ANNEXE I

PROTOCOLE DE PURIFICATION DU CHITOSANE

Pour 6g de chitosane

Solubilisation du chitosane :

1. Préparer 600 mL de HCl 0,1 M dans un Becher (540 mL d'eau Milli-Q + 60 mL de HCl 1M).
2. Porter la solution à 40 °C en utilisant une plaque chauffante munie d'un senseur de température.
3. Disperser 6 g de chitosane dans les 600 mL de HCl 0,1 M tout en agitant avec un barreau magnétique.
4. Fermer le Becher avec du parafilm.
5. Laisser la solution sous agitation durant une nuit.
6. Le jour suivant, arrêter de chauffer et arrêter l'agitation.

Filtration et élimination des impuretés :

7. Filtrer la solution sous vide.
8. Transvaser la solution dans un Becher.

Précipitation du chitosane :

9. Précipiter le chitosane avec du NaOH 0,5 M (pH~ 8-9).
10. Porter le mélange à 95 °C sous agitation.

Séparation des macromolécules de chitosane :

11. Ajouter 1 mL de SDS (sodium dodécyl sulfate) 10 % et garder le mélange à 95 °C durant 5 min.
12. Laisser le mélange revenir à la température ambiante (plonger le Becher dans de l'eau du robinet si nécessaire).
13. Ajuster le pH à 10 avec du NaOH 0,5 M.

Lavage du chitosane pour éliminer le SDS :

14. Filtrer le chitosane sous vide.
15. Disperser le chitosane dans 600 mL d'eau Milli-Q à 40 °C, agiter durant 15 min, puis filtrer sous vide.
16. Répéter cette dernière étape jusqu'à avoir une réponse négative pour le test de sulfate, indiquant l'absence du SDS. En générale, trois sont suffisantes.
17. Après la dernière filtration, mettre le chitosane dans des tubes en plastique.

Test de présence du sulfate :

- 10 % BaCl₂ dans HCl 0,1 % v/v.
- Ajouter du BaCl₂ sur un volume équivalent du filtrat.

Stockage :

18. Mettre les tubes au congélateur (- 20 °C) durant 24 h.
19. Sortir les tubes du congélateur et les mettre au lyophilisateur afin de sécher le chitosane (3 jours).
20. Récupérer le chitosane sec.

Broyage :

21. Broyer le chitosane et la tamiser afin que les particules soient les plus fines possible.

Préparation de la solution de chitosane 3.33% :

1. Peser la masse de poudre de chitosane broyée puis la solubiliser dans de l'HCl 0,1M afin d'avoir une concentration finale de 3,33% (m/v) de chitosane
2. Laisser sous agitation toute la nuit
3. Stériliser la solution à l'autoclave (121°C pendant 21 min)

ANNEXE II

PROTOCOLE DE PRÉPARATION DES AGENTS GÉLIFIANTS

Les formulations décrites dans ce protocole sont les suivantes (concentrations finales dans le gel):

1. BGP02
2. BGP04
3. SHC005:PB004 (pH8)
4. SHC005:PB008 (pH8)
5. SHC005:BGP01
6. SHC0075:PB004 (pH8)
7. SHC0075:PB008 (pH8)
8. SHC0075:BGP01

Préparation des solutions tampon

Solution de Na_2HPO_4 (0,2M)

2,84 g Na_2HPO_4 + 100 ml H_2O

Solution de NaH_2PO_4 (0,2M)

1,2 g Na_2HPO_4 + 50 ml H_2O

Tampon phosphate à 0,2M (50ml) pH 8

46,6 ml Na_2HPO_4 (0.2M) + 3,4 ml NaH_2PO_4 (0,2M)

Mesurer le pH et le corriger avec NaOH/HCl (0,1M) pour le fixer à 8

Tampon phosphate à 0,1M (50 ml) pH 8

23,3 ml Na_2HPO_4 (0,2M) + 1,7 ml NaH_2PO_4 (0,2M) + 25 ml H_2O

Mesurer le pH et le corriger avec NaOH/HCl (0,1M) pour le fixer à 8

Préparation des agents gélifiants (concentrations initiales avant le mélange)

1. BGP 0,5M

1,0802 g BGP + Qsp 10 ml H₂O

2. BGP 1M

2,1604 g BGP + Qsp 10 ml H₂O

3. PB 0,1M + SHC 0,125M

0,105 g SHC + 10 ml tampon phosphate à 0,1M

4. PB 0,2M + SHC 0,125M

0,105 g SHC + 10 ml tampon phosphate à 0,2M

5. BGP 0,25M + SHC 0,125 M

0,0840 g SHC + 2ml BGP 1M + 6ml H₂O

6. PB 0,1M + SHC 0,1875M

0,1575 g SHC + 10 ml tampon phosphate à 0,1M

7. PB 0,2M + SHC 0,1875M

0,1575 g SHC + 10 ml tampon phosphate à 0,2M

8. BGP 0,25M + SHC 0,1875 M

0,1260 g SHC + 2ml BGP 1M + 6ml H₂O

ANNEXE III

QUANTIFICATION DE L'HÉPARINE PAR DMMB

Matériel nécessaire :

- Acide formique 98%
- Formate de Sodium
- PBS
- 1,9-Diméthyl-Méthylène Blue (DMMB)
- Éthanol 95% (EtOH)
- Chlorure de guanidinium (GuHCl)

Solution de DMMB :

1. Dissoudre 4 mg DMMB dans 6,3 ml EtOH
2. Filtrer la solution dans un filtre à papier
3. Préparer 25 ml d'une solution GuHCl 1M
 - a. Dans 25 ml d'eau distillée, ajouter 2,39g de GuHCl
 - b. + 0,25g de sodium formate
 - c. + 0,25ml d'acide formique 98%
4. Ajouter à la solution éthylique de DMMB
5. Compléter le volume à 125 ml avec de l'eau distillée
6. Dans un autre récipient, répéter les étapes 1 à 5, sans le DMMB Mélanger les 2 solutions dans un rapport volumique 1:1 pour stabiliser la solution DMMB
7. Stocker dans bouteille en verre recouverte de papier d'aluminium (max 3 mois)

Quantification de l'héparine

1. Préparation de 2ml de gel (n=3)
 - a. **1,2 ml** de la solution de chitosane + **0,8 ml** d'agent gélifiant 0,4 ml deux fois concentré + 0,4ml héparine liquide (**1000 IU/ml**) (la dilution fait qu'on aura bien **200 IU/ml** dans les 2ml de gel)
 - b. Laisser gélifier pendant 24h dans des moules couverts de parafilm
 - c. Placer les gels dans des plaques 6 puits avec 10 ml de PBS à 37°C et couvrir de parafilm
2. À des temps prédéterminés retirer le PBS et en remettre du neuf à 37°C
3. Prélever 100µl du milieu et ajouter 1ml de la solution de DMMB
4. Dans une plaque de 96 puits, prélever 200µl du mélange précédent (n=3)
5. Lire l'absorbance à 525nm le plus rapidement possible

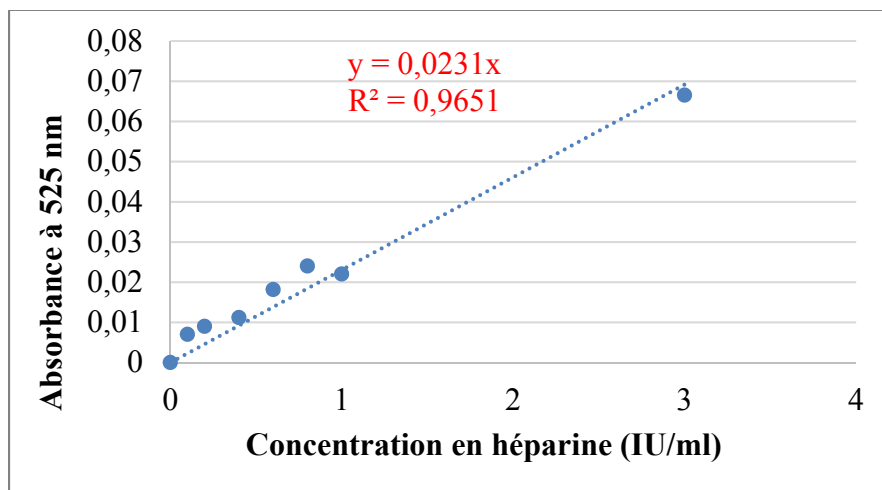


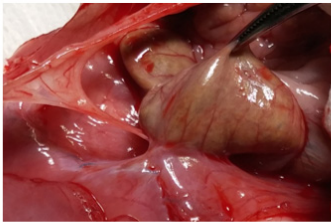
Figure-A III-1 : Courbe d'étalonnage de l'héparine liquide

ANNEXE IV

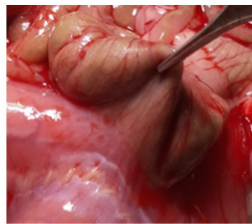
PHOTOGRAPHIES DES TISSUS APRÈS SACRIFICES ET SUVIS DES RATS

Non traités

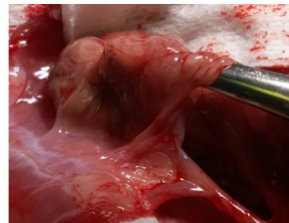
Rat 1



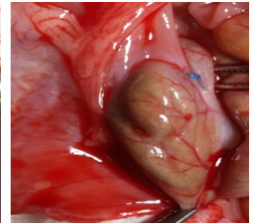
Rat 2



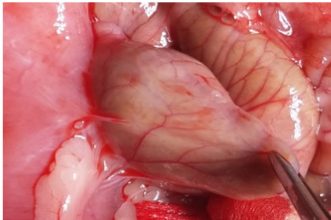
Rat 3



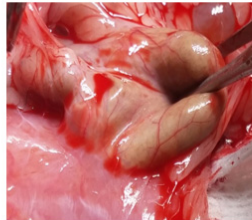
Rat 4



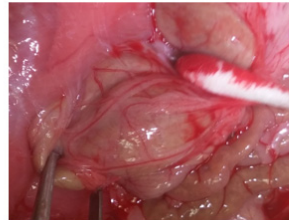
Rat 5



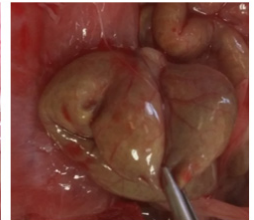
Rat 6



Rat 7

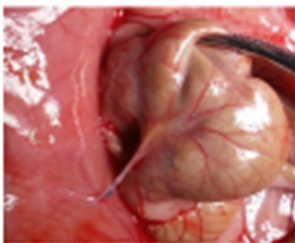


Rat 8



Interceed®

Rat 1



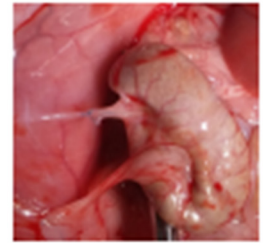
Rat 2



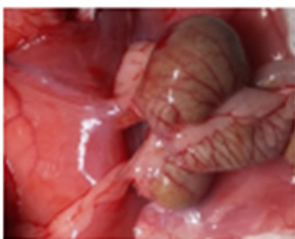
Rat 3



Rat 4



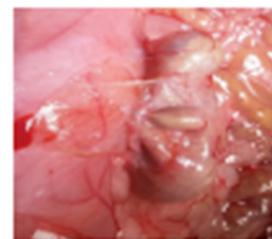
Rat 5



Rat 6



Rat 7



Rat 8



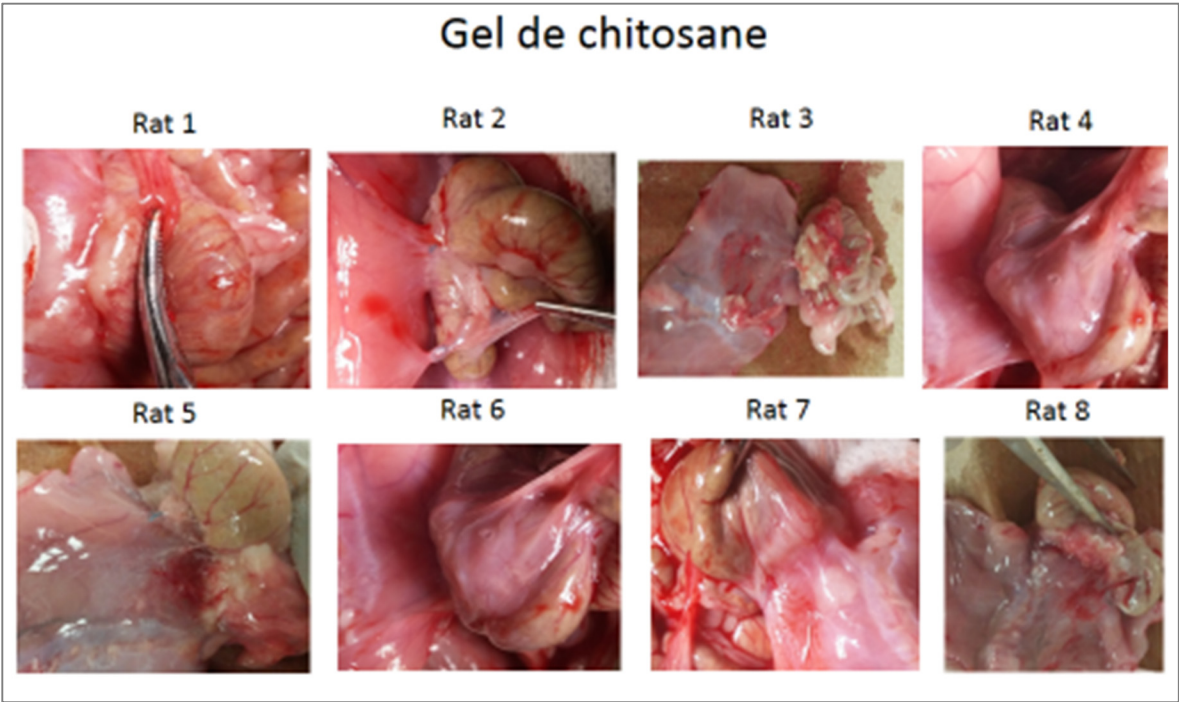


Figure-A IV-1 : Photographies des adhérences suite au sacrifice pour les différents groupes de traitement

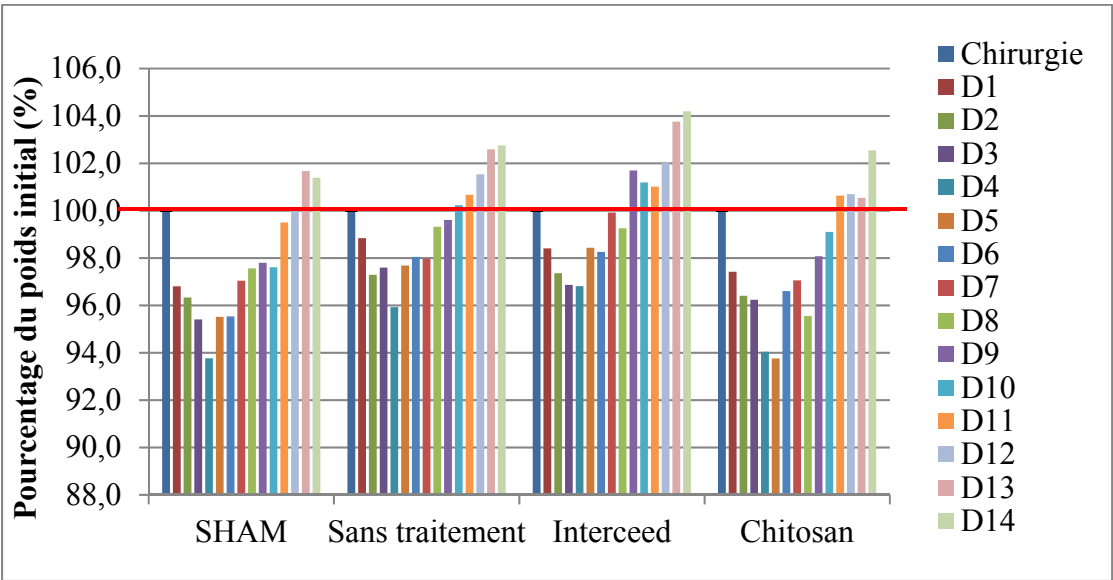


Figure-A IV-2 : Suivi du poids des rats pendant 14 jours, selon les différents groupes de traitement

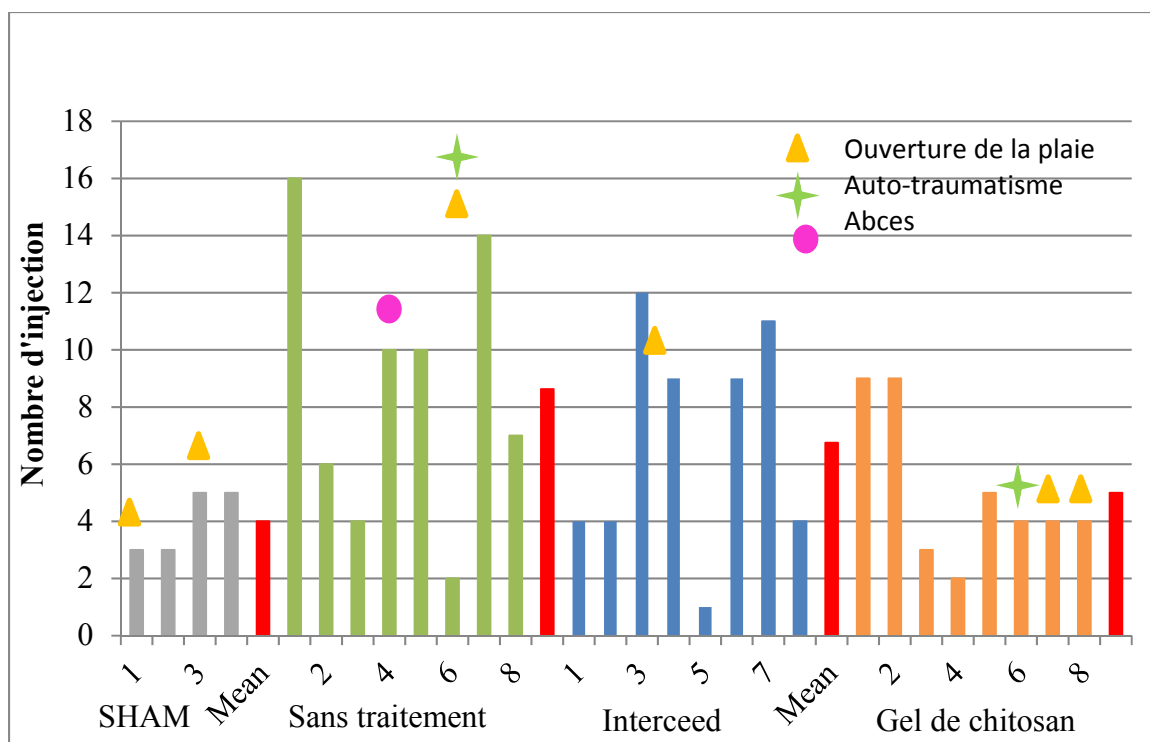


Figure-A IV-3 : Nombre d'injection d'analgésique suivant les groupes de traitement

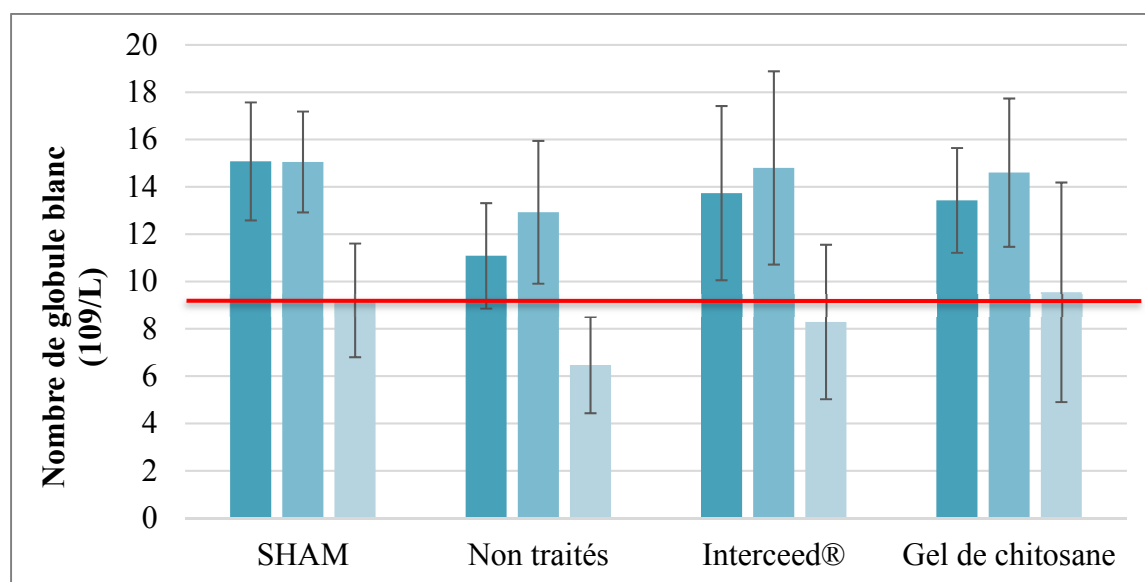


Figure-A IV-4 : Évolution du nombre de globules blancs (moyenne \pm ET, n=8)

ANNEXE V

ÉVALUATION DE L'ACTIVITÉ DE L'HÉPARINE

Nous avons effectués des tests de relargage de l'héparine incorporée dans les hydrogels mais nous n'avons pas évalué son activité après sa libération. Ici, est présenté un test régit par la norme ISO 10993-4 concernant les matériaux implantables en contact indirect avec le sang, qui peut être applicable pour évaluer l'activité de l'héparine libérée.

Temps de céphaline ou PTT (partial thromboplastin time) sans activateur:

La norme F2382-04 (2010) décrit la procédure standardisée pour l'évaluation du PTT pour les dispositifs médicaux. Le but de ce test est de déterminer le temps d'apparition de caillots sanguins lorsque qu'un échantillon de plasma sanguin est exposé au matériau.

Matériel :

- Tubes en polypropylène avec bouchons
- Bain de glace
- Plaque agitation chauffante
- Analyseur de coagulation (automated fibrometer)
- Chlorure de calcium
- Plasma sanguin humain citraté frais (moins de 4h après extraction ou décongelé)
- Céphaline de cerveau de lapin lyophilisée (RBC : Rabbit Brain Cephalin)
- Control négatif : plasma non traité
- Control positif : tube de latex naturel ou bouchon de caoutchouc noir

Préparation :

- 1) Préparer chaque échantillon en triplicata. Tous les échantillons sont préparés avec un ratio équivalent à 4 cm² de matériau dans 1 mL de plasma et sont placés dans le tube en polypropylène dans le bain de glace
- 2) Initialiser l'analyseur de coagulation ($37 \pm 2^{\circ}\text{C}$) et le laisser se stabiliser pendant 10min

- 3) Programmer l'analyser de coagulation sous la fonction aPTT
- 4) Préchauffer les cuvettes d'analyses à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$
- 5) Reconstituer le RBC avec 10mL d'eau distillée et le placer dans le bain ($37 \pm 2^{\circ}\text{C}$, 60 rpm) pendant 15 min
- 6) Vortexer pendant 15s et placer la solution à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$

Test :

- 1) Les matériaux à tester et les contrôles sont placés dans les tubes en polypropylène et exposés à la quantité de plasma établie plus haut. Le contrôle négatif est le tube de polypropylène seul avec le plasma
- 2) Les échantillons sont exposés au plasma pendant 15 ± 1 min à $37 \pm 2^{\circ}\text{C}$ sous agitation dans un bain chauffé (60 rpm)
- 3) Les tubes sont ensuite immédiatement placés dans le bain de glace et transférés dans des nouveaux tubes préchauffés
- 4) Vortexer 15s
- 5) Transférer 100 μL du plasma dans les cuvettes préchauffées
- 6) Ajouter 10 μL de RBC chauffé
- 7) Attendre 2 min
- 8) Ajouter le chlorure de calcium
- 9) Lire les échantillons avec l'analyseur de coagulation
- 10) Enregistrer les temps de coagulation (s)
- 11) Calculer le % de contrôle négatif:

% de contrôle négatif = (Moyenne du temps de coagulation des échantillons) / (Moyenne du temps de coagulation des contrôles négatifs) x 100 Le matériau est considéré comme non thrombinogène si le test **PTT est > 50% du contrôle négatif**

LISTE DE RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Ahmadi, R., & de Bruijn, J. D. (2008). Biocompatibility and gelation of chitosan-glycerol phosphate hydrogels. *J Biomed Mater Res A*, 86(3), 824-832. doi: 10.1002/jbm.a.31676. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18041728>
- Ahmed, E. M. (2015). Hydrogel: Preparation, characterization, and applications: A review. *J Adv Res*, 6(2), 105-121. doi: 10.1016/j.jare.2013.07.006. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25750745>
- Alonso, J. M., Alves, A. L., Watanabe, M. J., Rodrigues, C. A., & Hussni, C. A. (2014). Peritoneal response to abdominal surgery: the role of equine abdominal adhesions and current prophylactic strategies. *Vet Med Int*, 2014, 9. doi: 10.1155/2014/279730. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24587939>
- AltaylarMedical. (2013). *How They Work? Oxidized Regenerated Cellulose*. Repéré à <http://www.altaylarmedikal.com/index-5.html>
- Ammar, T. Y., Pereira, T. A. P., Mistura, S. L. L., Kuhn, A., Saggin, J. I., & Lopes Júnior, O. V. (2015). Viscosupplementation for treating knee osteoarthritis: review of the literature. *Revista Brasileira de Ortopedia (English Edition)*, 50(5), 489-494. doi: 10.1016/j.rboe.2015.07.007
- Arakawa, C. K. (2012). *A novel photopolymerizable chitosan collagen hydrogel for bone tissue engineering* (University of California, Los Angeles).
- Arden, N., & Nevitt, M. C. (2006). Osteoarthritis: Epidemiology. *Best Practice & Research Clinical Rheumatology*, 20(1), 3-25. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.berh.2005.09.007>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521694205001087>
- Assaad, E., Maire, M., & Lerouge, S. (2015). Injectable thermosensitive chitosan hydrogels with controlled gelation kinetics and enhanced mechanical resistance. *Carbohydr Polym*, 130, 87-96. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.04.063. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26076604>
- Beamish, J. A., Geyer, L. C., Haq-Siddiqi, N. A., Kottke-Marchant, K., & Marchant, R. E. (2009). The effects of heparin releasing hydrogels on vascular smooth muscle cell phenotype. *Biomaterials*, 30(31), 6286-6294. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.08.004. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19709740>
- Berger, M. (2014). Surface-modified nanocellulose hydrogels for wound dressing. Repéré à <http://www.nanowerk.com/spotlight/spotid=35162.php>

- Bhattacharai, N., Gunn, J., & Zhang, M. (2010). Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery. *Adv Drug Deliv Rev*, 62(1), 83-99. doi: 10.1016/j.addr.2009.07.019. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19799949>
- Bueno, P. V., Souza, P. R., Follmann, H. D., Pereira, A. G., Martins, A. F., Rubira, A. F., & Muniz, E. C. (2015). N,N-Dimethyl chitosan/heparin polyelectrolyte complex vehicle for efficient heparin delivery. *Int J Biol Macromol*, 75, 186-191. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2015.01.030. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25625782>
- Caló, E., & Khutoryanskiy, V. V. (2015). Biomedical applications of hydrogels: A review of patents and commercial products. *European Polymer Journal*, 65, 252-267. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2014.11.024>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305714004091>
- Campbell, K. A., Erickson, B. J., Saltzman, B. M., Mascarenhas, R., Bach, B. R., Cole, B. J., & Verma, N. N. (2015). Is Local Viscosupplementation Injection Clinically Superior to Other Therapies in the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Systematic Review of Overlapping Meta-analyses. *Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery*, 31(10), 2036-2045.e2014. doi: 10.1016/j.arthro.2015.03.030
- Ceccaldi, C., Assaad, E., Hui, E., Buccionyte, M., Adoungotchodo, A., & Lerouge, S. (2017). Optimization of Injectable Thermosensitive Scaffolds with Enhanced Mechanical Properties for Cell Therapy. *Macromol Biosci*, 1600435. doi: 10.1002/mabi.201600435
- Ceccaldi, C., Strandman, S., Hui, E., Montagnon, E., Schmitt, C., Hadj Henni, A., & Lerouge, S. (2016). Validation and application of a nondestructive and contactless method for rheological evaluation of biomaterials. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 9. doi: 10.1002/jbm.b.33797. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27690332>
- Chambon, F., Petrovic, Z. S., MacKnight, W. J., & Winter, H. H. (1986). Rheology of Model Polyethanes at the Gel point. *Macromolecules*, 19, 2146-2150.
- Chenite, A., Buschmann, M. D., Wang, D., Chaput, C., & Kandani, N. (2001). Rheological characterisation of thermogelling chitosan/glycerol-phosphate solutions. *Carbohydr Polym*, 46, 39-47.
- Chenite, A., Chaput, C., Lerouge, S., Hui, E., & Selmani, A. (Article inédit non soumis). *Preclinical evaluation of a novel injectable hydrogels for the treatment of cartilage chondropathies*.

- Chenite, A., Chaput, C., Wang, D., Combes, C., Buschmann, M. D., Hoemann, C., . . . Selmani, A. (2000). Novel Injectable neutral solutions of chitosan form biodegradable gels in situ. *Biomaterials*, 21, 2155-2161.
- Cheong, Y. C., Laird, S. M., Shelton, J. B., Ledger, W. L., & Cooke, I. D. (2001). Peritoneal healing and adhesion formation/reformation. *Human Reproduction Update*, 7(6), 556-567.
- Chevallay, B., & Herbage, D. (2000). Collagen-based biomaterials as 3D scaffold for cell cultures: applications for tissue engineering and gene therapy. *Med. Biol. Eng. Comput*, 38, 211-219.
- Cho, J., Heuzey, M.-C., Bégin, A., & Carreau, P. J. (2006). Viscoelastic properties of chitosan solutions: Effect of concentration and ionic strength. *Journal of Food Engineering*, 74(4), 500-515. doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.047>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877405001901>
- Cho, J. H., Kim, S.-H., Park, K. D., Jung, M. C., Yang, W. I., Han, S. W., . . . Lee, J. W. (2004). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells using a thermosensitive poly(N-isopropylacrylamide) and water-soluble chitosan copolymer. *Biomaterials*, 25(26), 5743-5751. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.01.051>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014296120400064X>
- Choi, B., Kim, S., Lin, B., Wu, B. M., & Lee, M. (2014). Cartilaginous extracellular matrix-modified chitosan hydrogels for cartilage tissue engineering. *ACS Appl Mater Interfaces*, 6(22), 20110-20121. doi: 10.1021/am505723k. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25361212>
- Chu, C., R., Szczodry, M., & Bruno, S. (2010). Animal Models for Cartilage Regeneration and Repair. *Tissue Eng Part B*, 16(1), 105-117.
- Chuah, Y. J., Peck, Y., Lau, J. E., Hee, H. T., & Wang, D. A. (2017). Hydrogel based cartilaginous tissue regeneration: recent insights and technologies. *Biomater Sci*. doi: 10.1039/c6bm00863a. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28233881>
- Chung, C. (2009). *Development and characterization of photocrosslinkable hyaluronic acid hydrogels for cartilage regeneration* (University of Pennsylvania). (252).
- Coutu, J. M. (2012). *Influence de l'agent de contraste sur les propriétés du thermogel de chitosane: vers un nouvel agent embolisant pour les anévrismes* (École de Technologie Supérieure, Montréal).
- Coutu, J. M., Fatimi, A., Berrahmoune, S., Soulez, G., & Lerouge, S. (2013). A new radiopaque embolizing agent for the treatment of endoleaks after endovascular repair:

- influence of contrast agent on chitosan thermogel properties. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 101(1), 153-161. doi: 10.1002/jbm.b.32828. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23090727>
- Croisier, F., & Jérôme, C. (2013). Chitosan-based biomaterials for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 49(4), 780-792. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2012.12.009>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305712004181>
- Dang, J. M., Sun, D. D., Shin-Ya, Y., Sieber, A. N., Kostuik, J. P., & Leong, K. W. (2006). Temperature-responsive hydroxybutyl chitosan for the culture of mesenchymal stem cells and intervertebral disk cells. *Biomaterials*, 27(3), 406-418. doi: 10.1016/j.biomaterials.2005.07.033. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16115680>
- Dang, Q., Liu, K., Zhang, Z., Liu, C., Liu, X., Xin, Y., . . . Fan, B. (2017). Fabrication and evaluation of thermosensitive chitosan/collagen/ α , β -glycerophosphate hydrogels for tissue regeneration. *Carbohydr Polym*, 167, 145-157. doi: 10.1016/j.carbpol.2017.03.053
- De Jong, J. G. N., Wevers, R. A., Laarakkers, C., & Poorthuis, N. J. H. M. (1989). DMMD spectrophotometry of GAG in untreated urine: a rapid screening procedure for mucopolysaccharidoses. *Clinical Chemistry*, 35(7).
- Deng, A., Kang, X., Zhang, J., Yang, Y., & Yang, S. (2017). Enhanced gelation of chitosan/ β -sodium glycerophosphate thermosensitive hydrogel with sodium bicarbonate and biocompatibility evaluated. *Materials Science and Engineering: C*, 78, 1147-1154. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.109
- Deng, C., Zhang, P., Vulesevic, B., Kuraitis, D., Li, F., Yang, A. F., . . . Suuronen, E. J. (2010). A collagen-chitosan hydrogel for endothelial differentiation and angiogenesis. *Tissue Eng Part A*, 16(10), 3099-3109. doi: 10.1089/ten.tea.2009.0504. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20586613>
- Diamond, M. P., & Freeman, M. L. (2001). Clinical implications of postsurgical adhesions. *Human Reproduction Update*, 7(6), 567-577.
- Drury, J. L., & Mooney, D. J. (2003). Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials*, 24(24), 4337-4351. doi: 10.1016/s0142-9612(03)00340-5
- Duval, N., Chaput, C., Chenite, A., & Selmani, A. (2013, 2013). *A new Injectable Cartilage Void-filler-defect Repair for Osteoarthritis or Trauma Injuries* présentée à ICRS: Stem Cells and Scaffolds: A new frontier for Joint Regeneration.

- Ebara, M., Kotsuchibashi, Y., Uto, K., Aoyagi, T., Kim, Y.-J., Narain, R., . . . Hoffman, J. M. (2014). Smart Hydrogels. 9-65. doi: 10.1007/978-4-431-54400-5_2
- Ergul, E., & Korukluoglu, B. (2008). Peritoneal adhesions: Facing the enemy. *International Journal of Surgery*, 6(3), 253-260. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijssu.2007.05.010>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1743919107001033>
- Fernandes, L. F., Resende, C. X., Tavares, D. S., & Soares, G. A. (2011). Cytocompatibility of chitosan and collagen-chitosan scaffolds for tissue engineering. *Polimeros*, 21(1), 1-6.
- Franklin, R. R., Trout, R. J., & Marks, M. J. (2009). Interceed barrier in the prevention of post-operation adhesions following laparotomy: meta-analysis of its efficacy and safety. *eClinical Compendium-Article Summary*.
- Gao, X., Deng, X., Wei, X., Shi, H., Wang, F., Ye, T., . . . Huang, N. (2013). Novel thermosensitive hydrogel for preventing formation of abdominal adhesions. *Int J Nanomedicine*, 8, 2453-2463. doi: 10.2147/IJN.S46357. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23885172>
- Gelse, K. (2003). Collagens—structure, function, and biosynthesis. *Adv Drug Deliv Rev*, 55(12), 1531-1546. doi: 10.1016/j.addr.2003.08.002
- Gensini, M. (2011). *Brevet USA n° US 2013/0084324 A1*.
- Giraud Guille, M. M., Helary, C., Vigier, S., & Nassif, N. (2010). Dense fibrillar collagen matrices for tissue repair. *Soft Matter*, 6(4963-4983). doi: 10.1039/c0sm00260g
- Grainger, R., & Cicuttini, F. M. (2004). Medical management of osteoarthritis of the knee and hip joints. *MJA*, 180, 232-237.
- Han, T., Nwe, N., Furuike, T., Tokura, S., & Tamura, H. (2012). Methods of N-acetylated chitosan scaffolds and its in vivo biodegradation by lysozyme. *Journal of Biomedical Science and Engineering*, 05(01), 15-23. doi: 10.4236/jbise.2012.51003
- He, X., Li, K., Xing, R., Liu, S., Hu, L., & Li, P. (2016). The production of fully deacetylated chitosan by compression method. *The Egyptian Journal of Aquatic Research*, 42(1), 75-81. doi: <http://doi.org/10.1016/j.ejar.2015.09.003>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1687428515000655>
- He, Z., Wang, B., Hu, C., & Zhao, J. (2017). An overview of hydrogel-based intra-articular drug delivery for the treatment of osteoarthritis. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 154, 33-39. doi: 10.1016/j.colsurfb.2017.03.003. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28288340>

- Hebdom, E., & Häuselmann, H. J. (2002). Molecular aspects of pathogenesis in osteoarthritis: the role of inflammation. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(1), 45-54.
- Heino, J., Huhtala, M., Kapyla, J., & Johnson, M. S. (2009). Evolution of collagen-based adhesion systems. *Int J Biochem Cell Biol*, 41(2), 341-348. doi: 10.1016/j.biocel.2008.08.021. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18790075>
- Hellebrekers, B. W. J., Trimpos-Kemper, T. C. M., Trimpos, J. B., Emeis, J. J., & Kooistra, T. (2000). Use of fibrinolytic agents in the prevention of postoperative adhesion formation. *Fertility and Sterility*, 74(2), 203-213.
- Hoffman, A. S. (2012). Hydrogels for biomedical applications. *Adv Drug Deliv Rev*, 64, 18-23. doi: 10.1016/j.addr.2012.09.010
- Ignat, C.-M. (2012). *Compatibilité et co-structuration dans des systemes contenant des scléropoteines et des polysaccharides* (Université de Pau, France).
- IUPAC. (1997). Mark-Houwink equation. Dans *Compendium of Chemical Terminology* (Vol. 2).
- Iwasaki, N., Kasahara, Y., Yamane, S., Igarashi, T., Minami, A., & Nisimura, S.-i. (2010). Chitosan-Based Hyaluronic Acid Hybrid Polymer Fibers as a Scaffold Biomaterial for Cartilage Tissue Engineering. *Polymers*, 3(1), 100-113. doi: 10.3390/polym3010100
- Jalani, G., Rosenzweig, D. H., Makhoul, G., Abdalla, S., Cecere, R., Vetrone, F., . . . Cerruti, M. (2015). Tough, in-situ thermogelling, injectable hydrogels for biomedical applications. *Macromol Biosci*, 15(4), 473-480. doi: 10.1002/mabi.201400406. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25557500>
- Jin, R., Moreira Teixeira, L. S., Dijkstra, P. J., Karperien, M., van Blitterswijk, C. A., Zhong, Z. Y., & Feijen, J. (2009). Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering. *Biomaterials*, 30(13), 2544-2551. doi: 10.1016/j.biomaterials.2009.01.020. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19176242>
- Jordan, K. M. (2003). EULAR Recommendations 2003: an evidence based approach to the management of knee osteoarthritis: Report of a Task Force of the Standing Committee for International Clinical Studies Including Therapeutic Trials (ESCISIT). *Ann Rheum Dis*, 62(12), 1145-1155. doi: 10.1136/ard.2003.011742

- Kamel, R. M. (2010). Prevention of postoperative peritoneal adhesions. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*, 150(2), 111-118. doi: 10.1016/j.ejogrb.2010.02.003. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20382467>
- Kim, I. Y., Seo, S. J., Moon, H. S., Yoo, M. K., Park, I. Y., Kim, B. C., & Cho, C. S. (2008). Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. *Biotechnol Adv*, 26(1), 1-21. doi: 10.1016/j.biotechadv.2007.07.009. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17884325>
- Koetting, M. C., Peters, J. T., Steichen, S. D., & Peppas, N. A. (2015). Stimulus-responsive hydrogels: Theory, modern advances, and applications. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 93, 1-49. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.mser.2015.04.001>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927796X15000339>
- Krasnokutsky, S., Attur, M., Palmer, G., Samuels, J., & Abramson, S. B. (2008). Current concepts in the pathogenesis of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 16, Supplement 3, S1-S3. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joca.2008.06.025>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1063458408002033>
- Kuo, C. Y., Chen, C. H., Hsiao, C. Y., & Chen, J. P. (2015). Incorporation of chitosan in biomimetic gelatin/chondroitin-6-sulfate/hyaluronan cryogel for cartilage tissue engineering. *Carbohydr Polym*, 117, 722-730. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.10.056. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498693>
- Kweon, D.-K., & Lim, S. T. (2002). Preparation and characteristics of a water soluble chi-heparin complex. *Journal of Applied Polymer Science*, 87, 1784-1790.
- Kweon, D.-K., Song, S.-B., & Park, Y.-Y. (2003). Preparation of water-soluble chitosan/heparin complex and its application as wound healing accelerator. *Biomaterials*, 24(9), 1595-1601. doi: 10.1016/s0142-9612(02)00566-5
- Lavertu, M., Filion, D., & Buschmann, M. D. (2008). Heat-induced transfer of protons from chitosan to glycerol phosphate produces chitosan precipitation and gelation. *Biomacromolecules*, 9, 640-651.
- Lee, C. L., Singla, A., & Lee, Y. (2001). Biomedical applications of collagen. *International Journal of pharmaceuticals*, 221, 1-21.
- Lei, K., Chen, Y., Wang, J., Peng, X., Yu, L., & Ding, J. (2017). Non-invasive Monitoring of In Vivo Degradation of a Radiopaque Thermoreversible Hydrogel and Its Efficacy in Preventing Post-operative Adhesions. *Acta Biomater*, 1-50. doi: 10.1016/j.actbio.2017.03.042. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28363786>

- Li, J., Zhu, J., He, T., Li, W., Zhao, Y., Chen, Z., . . . Li, R. (2017). Prevention of intra-abdominal adhesion using electrospun PEG/PLGA nanofibrous membranes. *Materials Science and Engineering: C*, 1-30. doi: 10.1016/j.msec.2017.04.017
- Li, L., Wang, N., Jin, X., Deng, R., Nie, S., Sun, L., . . . Gong, C. (2014). Biodegradable and injectable in situ cross-linking chitosan-hyaluronic acid based hydrogels for postoperative adhesion prevention. *Biomaterials*, 35(12), 3903-3917. doi: 10.1016/j.biomaterials.2014.01.050. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24507411>
- Liakakos, T., Thomakos, N., Fine, P. M., Dervenis, C., & Young, R. L. (2001). Peritoneal adhesions, etiology, pathophysiology and clinical significance. *Digestive Surgery*, 18, 260-274.
- Lin, L. X., Yuan, F., Zhang, H. H., Liao, N. N., Luo, J. W., & Sun, Y. L. (2017). Evaluation of surgical anti-adhesion products to reduce postsurgical intra-abdominal adhesion formation in a rat model. *PLoS One*, 12(2), 1-9. doi: 10.1371/journal.pone.0172088. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28207824>
- Liu, X., Ma, L., Mao, Z., & Gao, C. (2011). Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Repair and Regeneration. 244, 81-127. doi: 10.1007/12_2011_118
- Loh, Q. L., & Choong, C. (2013). Three-dimensional scaffolds for tissue engineering applications: role of porosity and pore size. *Tissue Eng Part B Rev*, 19(6), 485-502. doi: 10.1089/ten.TEB.2012.0437. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23672709>
- Lohmander, L. S. (2000). What can we do about osteoarthritis ? *Arthritis Res*, 2, 6.
- Mansour, J. M. *Biomechanics of cartilage*.
- Martinez, A., Blanco, M. D., Davidenko, N., & Cameron, R. E. (2015). Tailoring chitosan/collagen scaffolds for tissue engineering: Effect of composition and different crosslinking agents on scaffold properties. *Carbohydr Polym*, 132, 606-619. doi: 10.1016/j.carbpol.2015.06.084. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26256388>
- Medscape. (2016). Osteoarthritis. Repéré à <http://emedicine.medscape.com/article/330487-overview>
- Meng, Q., Hu, X., Huang, H., Liu, Z., Yuan, L., Shao, Z., . . . Ao, Y. (2017). Microfracture combined with functional pig peritoneum-derived acellular matrix for cartilage repair in rabbit models. *Acta Biomater*. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.055>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706117300648>

- Mobasheri, A., & Batt, M. (2016). An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59(5-6), 333-339. doi: 10.1016/j.rehab.2016.07.004
- Monette, A., Ceccaldi, C., Assaad, E., Lerouge, S., & Lapointe, R. (2016). Chitosan thermogels for local expansion and delivery of tumor-specific T lymphocytes towards enhanced cancer immunotherapies. *Biomaterials*, 75, 237-249. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.10.021. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26513416>
- Moreira, C. D., Carvalho, S. M., Mansur, H. S., & Pereira, M. M. (2016). Thermogelling chitosan-collagen-bioactive glass nanoparticle hybrids as potential injectable systems for tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 58, 1207-1216. doi: 10.1016/j.msec.2015.09.075. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26478423>
- Nishiyama, N., Suzuki, K., Nagatsuka, A., Yokota, I., & Nemoto, K. (2003). Dissociation states of collagen functional groups and their effects on the priming efficacy of HEMA bonded to collagen. *J Dent Res*, 82(4), 257-265.
- Nordtweit, R. J., Varum, K. M., & Smidsrod, O. (1996). Degradation of partially N-acetyl chitosan with hen egg white and human lysozyme. *Carbohydr Res*, 29, 163-168.
- Noth, U., Rackwitz, L., Heymer, A., Weber, M., Baumann, B., Steinert, A., . . . Eulert, J. (2007). Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells in collagen type I hydrogels. *J Biomed Mater Res A*, 83(3), 626-635. doi: 10.1002/jbm.a.31254. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17503531>
- Nwe, N., Furuike, T., & Tamura, H. (2009). The Mechanical and Biological Properties of Chitosan Scaffolds for Tissue Regeneration Templates Are Significantly Enhanced by Chitosan from *Gongronella butleri*. *Materials*, 2(2), 374-398. doi: 10.3390/ma2020374
- OligoMedic. Controlled Post-Market clinical Study (Italy). Repéré à <http://oligomedic.com/#jointrep>
- Onishi, H., & Machida, Y. (1999). Biodegradation and distribution of water-soluble chitosan in mice. *Biomaterials*, 20, 175-183.
- Parenteau-Bareil, R., Gauvin, R., & Berthod, F. (2010). Collagen-Based Biomaterials for Tissue Engineering Applications. *Materials*, 3(3), 1863-1887. doi: 10.3390/ma3031863
- Pariente, J.-L., Villars, F., & Conort, P. (2005). Les matériaux biologiques. *Progrès en Urologie*, 15, 964-972.

- Plant, A. L., Bhadriraju, K., Spurlin, T. A., & Elliott, J. T. (2009). Cell response to matrix mechanics: focus on collagen. *Biochim Biophys Acta*, 1793(5), 893-902. doi: 10.1016/j.bbamcr.2008.10.012. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19027042>
- Québec, G. d. (2007). *La viscosuppléance pour le traitement de la gonarthrose*. Québec: ETMIS.
- Raafat, D., & Sahl, H. G. (2009). Chitosan and its antimicrobial potential--a critical literature survey. *Microb Biotechnol*, 2(2), 186-201. doi: 10.1111/j.1751-7915.2008.00080.x. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21261913>
- Rai, V., Dilisio, M. F., Dietz, N. E., & Agrawal, D. K. (2017). Recent Strategies in Cartilage Repair: A Systemic Review of the Scaffold Development and Tissue Engineering. *J Biomed Mater Res A*, 1-42. doi: 10.1002/jbm.a.36087. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28387995>
- Rao, S., B., & Sharma, C., P. (1997). Use of chitosan as a biomaterial: studies on its safety and hemostatic potential. *Journal of Biomedical Materials Research*, 34, 21-29.
- Ren, D., Yi, H., Wang, W., & Ma, X. (2005). The enzymatic degradation and swelling properties of chitosan matrices with different degrees of N-acetylation. *Carbohydr Res*, 340(15), 2403-2410. doi: 10.1016/j.carres.2005.07.022. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16109386>
- Richard, F., Villars, M., & Thibaud, S. (2013, 26-30 Aout 2013). *Comportement viscoélastique du cartilage articulaire humain normal et arthrosique: modélisation et caractérisation à l'aide d'essais d'indentation instrumentée. Vers une quantification des effets de l'arthrose dans l'articulaire coxo-fémorale* présentée à 21ème Congrès Français de Mécanique, Bordeaux, France.
- Richette, P. (2016). Viscosupplémentation au genou. *Revue du Rhumatisme Monographies*, 83(3), 158-161. doi: 10.1016/j.monrhu.2016.03.005
- Rinaudo, M. (2008). Main properties and current applications of some polysaccharides as biomaterials. *Polymer International*, 57(3), 397-430. doi: 10.1002/pi.2378
- Riva, R., Ragelle, H., des Rieux, A., Duhem, N., Jérôme, C., & Préat, V. (2011). Chitosan and Chitosan Derivatives in Drug Delivery and Tissue Engineering. 244, 19-44. doi: 10.1007/12_2011_137
- Rokhati, N., Widjajanti, P., Pramudono, B., & Susanto, H. (2013). Performance Comparison of α - and β -Amylases on Chitosan Hydrolysis. *ISRN Chemical Engineering*, 2013, 1-5. doi: 10.1155/2013/186159

- Sandell, L. J., & Aigner, T. (2001). Articular cartilage and changes in Arthritis: Cell biology of osteoarthritis. *Arthritis Research & Therapy*, 3(2), 1-7. doi: 10.1186/ar148. Repéré à <http://dx.doi.org/10.1186/ar148>
- Schnuriger, B., Barmparas, G., Branco, B. C., Lustenberger, T., Inaba, K., & Demetriades, D. (2011). Prevention of postoperative peritoneal adhesions: a review of the literature. *Am J Surg*, 201(1), 111-121. doi: 10.1016/j.amjsurg.2010.02.008. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20817145>
- Shahram, E., Sadraie, S. H., Kaka, G., Khoshmohabat, H., Hosseinalipour, M., Panahi, F., & Naimi-Jamal, M. R. (2013). Evaluation of chitosan-gelatin films for use as postoperative adhesion barrier in rat cecum model. *Int J Surg*, 11(10), 1097-1102. doi: 10.1016/j.ijsu.2013.09.012. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24090691>
- Shetye, S. P., Godbole, A., Bhilegaokar, S., & Gajare, P. (2015). Hydrogels: Introduction, Preparation, Characterization and Applications.pdf>. *International Journal of Research Methodology*, 1(1), 47-72.
- Sivashanmugam, A., Arun Kumar, R., Vishnu Priya, M., Nair, S. V., & Jayakumar, R. (2015). An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering. *European Polymer Journal*, 72, 543-565. doi: 10.1016/j.eurpolymj.2015.05.014
- Sridhar, B. V. (2009). *Use of biofunctional hydrogel matrices for chondrocyte transplantation applications* (MIT). (228).
- Sweeney, S. M., Orgel, J. P., Fertala, A., McAuliffe, J. D., Turner, K. R., Di Lullo, G. A., . . . San Antonio, J. D. (2008). Candidate cell and matrix interaction domains on the collagen fibril, the predominant protein of vertebrates. *J Biol Chem*, 283(30), 21187-21197. doi: 10.1074/jbc.M709319200. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18487200>
- Thiele, J., Ma, Y., Bruekers, S. M., Ma, S., & Huck, W. T. (2014). 25th anniversary article: Designer hydrogels for cell cultures: a materials selection guide. *Adv Mater*, 26(1), 125-147. doi: 10.1002/adma.201302958. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24227691>
- Tylingo, R., Gorczyca, G., Mania, S., Szweda, P., & Milewski, S. (2016). Preparation and characterization of porous scaffolds from chitosan-collagen-gelatin composite. *Reactive and Functional Polymers*, 103, 131-140. doi: 10.1016/j.reactfunctpolym.2016.04.008
- Ullah, F., Othman, M. B. H., Javed, F., Ahmad, Z., & Akil, H. M. (2015). Classification, processing and application of hydrogels: A review. *Materials Science and*

Engineering: C, 57, 414-433. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.msec.2015.07.053>.
Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0928493115302393>

Upadhyay, R. K. (2017). Use of polysaccharide hydrogels in drug delivery and tissue engineering. *Advances in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2(2), 1-7. doi: 10.15406/atroa.2017.02.00022

Vinatier, C., Mrugala, D., Jorgensen, C., Guicheux, J., & Noël, D. (2009). Cartilage engineering: a crucial combination of cells, biomaterials and biofactors. *Trends in Biotechnology*, 27(5), 307-314. doi: 10.1016/j.tibtech.2009.02.005

Wang, L., & Stegemann, J. P. (2010). Thermogelling chitosan and collagen composite hydrogels initiated with beta-glycerophosphate for bone tissue engineering. *Biomaterials*, 31(14), 3976-3985. doi: 10.1016/j.biomaterials.2010.01.131. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20170955>

Wang, L., & Stegemann, J. P. (2011). Glyoxal crosslinking of cell-seeded chitosan/collagen hydrogels for bone regeneration. *Acta Biomater*, 7(6), 2410-2417. doi: 10.1016/j.actbio.2011.02.029. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21345389>

Ward, B. C., & Panitch, A. (2011). Abdominal adhesions: current and novel therapies. *J Surg Res*, 165(1), 91-111. doi: 10.1016/j.jss.2009.09.015. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20036389>

Yang, J., Shrike Zhang, Y., Yue, K., & Khademhosseini, A. (2017). Cell-Laden Hydrogels for Osteochondral and Cartilage Tissue Engineering. *Acta Biomater*, 1-81. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.actbio.2017.01.036>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1742706117300363>

Yang, J. A., Yeom, J., Hwang, B. W., Hoffman, A. S., & Hahn, S. K. (2014). In situ-forming injectable hydrogels for regenerative medicine. *Progress in Polymer Science*, 39(12), 1973-1986. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2014.07.006>. Repéré à <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0079670014000811>

Yeo, Y., & Kohane, D. S. (2008). Polymers in the prevention of peritoneal adhesions. *Eur J Pharm Biopharm*, 68(1), 57-66. doi: 10.1016/j.ejpb.2007.03.027. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17881201>

Zhang, E., Li, J., Zhou, Y., Che, P., Ren, B., Qin, Z., . . . Yao, F. (2017). Biodegradable and Injectable Thermoreversible Xyloglucan Based Hydrogel for Prevention of Postoperative Adhesion. *Acta Biomater*, 1-42. doi: 10.1016/j.actbio.2017.04.003. Repéré à <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28391053>

- Zhang, Z., Ni, J., Chen, L., Yu, L., Xu, J., & Ding, J. (2011). Biodegradable and thermoreversible PCLA-PEG-PCLA hydrogel as a barrier for prevention of post-operative adhesion. *Biomaterials*, 32(21), 4725-4736. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.03.046. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21482434>
- Zhou, H. Y., Jiang, L. J., Cao, P. P., Li, J. B., & Chen, X. G. (2015). Glycerophosphate-based chitosan thermosensitive hydrogels and their biomedical applications. *Carbohydr Polym*, 117, 524-536. doi: 10.1016/j.carbpol.2014.09.094. Repéré à <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25498667>