



Université de Lille – UFR3S-Médecine

Ecole Graduée Biologie Santé

Thèse

Pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université de Lille
Spécialité chimie des matériaux

Conception et évaluation d'une éponge à base de chitosan et d'acide hyaluronique en tant que support pour la reconstruction du cartilage articulaire

Présentée par **HAMIDI Salim**

Le 16/07/2025 à Lille

Membres du Jury

Dr. Céline Falentin-Daudré	Université Sorbonne Paris Nord	Rapporteure
Dr. Helene Van den Berghe	Université de Montpellier	Rapporteure
Pr. Pierre Weiss	Université de Nantes	Examinateur
Pr. Nicolas Blanchemain	Université de Lille	Directeur de thèse
Pr. Bernard Martel	Université de Lille	Directeur de thèse

Remerciements

Je souhaite adresser mes sincères remerciements à mes directeurs de thèse, le Pr. Nicolas Blanchemain et le Pr. Bernard Martel, pour m'avoir accueilli au sein de leurs unités de recherche respectives, l'INSERM U1008 et l'UMET. Merci pour votre encadrement, votre bienveillance et le soutien dont j'ai bénéficié tout au long de cette thèse.

Je remercie les membres du Jury : Pr. Pierre Weiss, Dr. Céline Falentin- Daudré, Dr. Helene Van den Berghe pour votre disponibilité et d'avoir accepté d'être membre du jury de cette soutenance de thèse.

Je tiens également à remercier l'Université de Lille, en particulier l'École Graduée Biologie Santé de Lille (EGBSL), pour le financement qui a rendu ce travail possible.

Mes remerciements s'adressent aussi à M. Jean-Noël Staelens pour sa disponibilité, son aide, ainsi que sa bienveillance et sa bonne humeur. Un grand merci également au Dr. Cédric Bossard pour son soutien et la richesse des échanges scientifiques que nous avons partagés.

Je souhaite également adresser mes remerciements au Dr. Frédéric Cazaux, Pr. Valérie Gaucher, Dr. Feng Chai et au Dr. Adeline Marin pour leurs conseils et leur aide dans la conduite des expérimentations.

Je remercie chaleureusement mes collègues de l'INSERM U1008, notamment Mme Anne-Sophie Drucbert, M. Mickael Maton, Dr. Sarah Defrançois, pour leur disponibilité et leur assistance dans la réalisation des expérimentations. Mes remerciements vont également à Dr. Mathilde Maillard pour ses encouragements, ainsi qu'à Mme Alexandra Machado.

Je remercie aussi Dr. Henry Chijcheapaza Flores, Kim Vanden Broeck, Camille Duchemin, Hugo Bossut pour les bons moments partagés lors des congrès.

Merci aux stagiaires Daniel Bonfils, Pierre Dupond pour leur implication et les échanges enrichissants que nous avons eus.

Enfin, un remerciement tout particulier à ma famille et à mes amis, pour leur soutien indéfectible durant cette aventure doctorale.

Table des matières

Abréviations.....	7
Introduction générale.....	9
Partie 1 : Etude bibliographique	13
1. L'arthrose.....	13
2. Physiologie de l'unité ostéochondrale.....	14
2.1. Le cartilage articulaire.....	14
2.2. L'os sous-chondral.....	17
2.3. Propriétés mécaniques du cartilage.....	17
3. Traitement des défauts ostéochondraux.....	18
3.1. Les traitements non chirurgicaux	18
3.2. Les traitements chirurgicaux	19
3.3. Utilisation de dispositifs médicaux.....	20
4. L'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire.....	22
4.1. Les cellules.....	22
4.1.1. Les chondrocytes.....	22
4.1.2. Les cellules souches	22
4.2. Les signaux	23
4.2.1. Les molécules de signalisation	23
4.2.2. La stimulation mécanique	23
4.3. Les scaffolds.....	24
4.3.1. Cahier des charges d'un scaffold pour l'ingénierie tissulaire	24
4.3.2. Organisation architecturale des scaffolds.....	25
4.3.3. Composition du scaffold.....	26
5. Le chitosan dans la régénération cartilagineuse	30
5.1. Le chitosan	30
5.1.1. Mécanismes de dégradation du CHT	33
5.2. Les hydrogels à base de CHT.....	34
5.2.1. Hydrogels physiques de CHT.....	36

5.2.2.	Hydrogels chimiques de CHT.....	38
6.	Historique des hydrogels et éponges à base de CHT développés au laboratoire 43	
7.	Synthèse bibliographique, objectifs de la thèse et cahier des charges.....	46
	Partie 2 : Matériels et Méthodes	48
1.	Produits	48
1.1.	Le chitosan (CHT).....	48
1.2.	L'acide hyaluronique (HA).....	48
1.3.	La maltodextrine oxydée (MDo)	48
1.4.	L'hexaméthylentétramine (HMTA).....	50
2.	Méthodes.....	51
2.1.	Préparation des hydrogels	51
2.2.	Préparation des éponges.....	53
2.3.	Caractérisation des hydrogels.....	53
2.3.1.	Etude rhéologique des hydrogels à base de CHT	53
2.4.	Caractérisation des éponges	54
2.4.1.	Spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (IRTF)	54
2.4.2.	Etude des propriétés d'adsorption et d'absorption des éponges	54
2.4.2.1.	<i>Etude de gonflement dans le PBS</i>	54
2.4.2.2.	<i>Mesure de l'adsorption de vapeur d'eau par DVS</i>	54
2.4.3.	Etude de la dégradation des éponges.....	55
2.4.4.	Microscopie électronique à balayage (MEB)	55
2.4.5.	Analyse mécanique dynamique (DMA)	55
2.4.6.	Etude du profil de libération de la ciprofloxacine (CFX).....	56
2.4.7.	Activité antibactérienne des milieux de libération	57
2.4.8.	Étude de cytotoxicité des éponges.....	57
	Partie 3 : Résultats et Discussions.....	58
	Chapitre 1 : Caractérisation rhéologique des hydrogels de CHT et CHT:HA.....	58
1.	Etude rhéologique des hydrogels physiques de CHT:HA.....	58

1.1.	Etude rhéologique des solutions de CHT	58
1.1.1.	Courbes de viscosité.....	58
1.1.2.	Propriétés viscoélastiques des solutions de CHT	60
1.2.	Etude des propriétés rhéologiques du système CHT:HA	65
1.2.1.	Propriétés viscoélastiques du CHT:HA	65
1.3.	Etude de la cohésion des hydrogels de CHT et CHT:HA en milieu aqueux..	67
2.	Synthèse des hydrogels chimiques.....	69
2.1.	Réticulation des hydrogels de CHT par la MDo.....	69
2.2.	Etude rhéologique de l'hydrogel CHT:HA:MDo	72
Chapitre 2 : Conception et évaluation des éponges à base de CHT		77
1.	Analyse infrarouge (ATR-IRTF) des éponges	78
2.	Aspect morphologique et structurel.....	82
3.	Etude de gonflement des éponges.....	83
3.1.	Gonflement des éponges réticulées par MDo	84
3.2.	Gonflement des éponges réticulées par l'HMTA	85
4.	Etude de la sorption dynamique en vapeur	88
5.	Etude de la dégradation des éponges.....	91
5.1.	Dégradation hydrolytique dans le PBS à pH = 7.4	91
5.2.	Dégradation enzymatique	93
5.3.	Dégradation en milieu acide.....	95
6.	Caractérisation des éponges par MEB.....	96
Chapitre 3 : Analyse des propriétés mécaniques, biologiques et de la libération de la CFX des éponges		102
1.	Analyse mécanique dynamique (DMA)	103
2.	Etude de la libération de la ciprofloxacine par les éponges	112
3.	Evaluation microbiologique	118
4.	Evaluation biologique - cytotoxicité	120
5.	Conclusion.....	121
6.	Conclusion générale et perspectives	122
7.	Annexes 1- Spectres infra rouge de la maltodextrine et maltodextrine oxydée	

8.	Annexe 2- Publication	127
	Références bibliographiques:	128

Abréviations

AFLAR	: Association Française de Lutte Anti-Rhumatismale
AINS	: Anti inflammatoire non stéroïdien
ACAN	: Aggrecan
AFAM	: Atomic force microscopy
BMP	: Bone morphogenetic protein
CHT	: Chitosan
COL	: Collagène
CFX	: Ciprofloxacine
CSE	: Cellules souches embryonnaire
CSM	: Cellules souches mésenchymateuses
CS	: Chondroïtine sulfate
CD	: Cluster of differentiation
CBFb	: Core-binding factor b
DD	: Degré de désacétylation
DMA	: Dynamic mechanical analysis
DVS	: Dynamic vapor sorption
E'	: Module de stockage
E''	: Module de perte
FGF	: Fibroblast growth factor
FDA	: Food and drug administration
FTIR	: Fourier transform infrared spectroscopy
G'	: Module de stockage
G''	: Module de perte
GAG	: Glycosaminoglycanes
GDF	: Growth differentiation factor
HA	: Hyaluronic acid
HPLC	: High-performance liquid chromatography
HMTA	: Hexaméthylènetétramine
HR	: Humidité relative
HAp	: Hydroxyapatite
HPN	: Hybrid polymer network
IPN	: Interpenetrating polymer network

ICA	: Implantation de chondrocytes autologues
ICAM	: Implantation de chondrocytes autologues assistée par matrice
IL-1 β	: Interleukine 1 beta
IGF	: Insulin-like growth factor
MDo	: Maltodextrine oxydée
MEB	: Microscope électronique à balayage
MEC	: Matrice extracellulaire
MPC	: Matrice péri-cellulaire
PBS	: Phosphate-buffered saline
PBT	: Poly(butylene terephthalate)
PCL	: Poly(ϵ -caprolactone)
PEG	: Poly(ethylene glycol)
PEGT	: Poly(ethylene glycol terephthalate)
PLA	: Poly(lactic acid)
PLGA	: Poly(lactic-co-glycolic acid)
PLLA	: Poly(L-lactic acid)
PGA	: Poly(glycolic acid)
PVA	: Poly(vinyl alcohol)
PEO	: Polyéthylène oxide
PCD	: Polymère de cyclodextrine
rpm	: Rotation par minute
RVL	: Région viscoélastique linéaire
RUNX1	: Runt-related transcription factor 1
Sox 9	: SRY-box transcription factor 9
tan δ	: Facteur de perte
TGF	: Transforming growth factor
TNF- α	: Tumor necrosis factor alpha
TT	: Traitement thermique
γ_c°	: Taux de cisaillement critique
η_0	: Viscosité newtonienne limite à faible cisaillement
λ	: Temps de relaxation
ω	: Fréquence angulaire
ε	: Amplitude / contrainte

Introduction générale

Le cartilage articulaire, ou cartilage hyalin, est un tissu conjonctif hautement spécialisé dont la fonction principale est d'assurer un glissement harmonieux entre les pièces osseuses, tout en minimisant les forces de friction et en permettant la transmission des charges vers le tissu osseux sous-jacent. Il est constitué de quatre couches distinctes : superficielle, intermédiaire, profonde et calcifiée. Son épaisseur varie en fonction du type d'articulation, par exemple pour le genou humain, elle se situe généralement entre 1,5 mm et 4 mm. Cependant, une caractéristique majeure du cartilage articulaire est son absence de vascularisation, de nerfs et de vaisseaux lymphatiques, ce qui limite considérablement sa capacité d'auto régénération à l'âge adulte après une lésion. Cette contrainte biologique est à l'origine de nombreuses pathologies articulaires, notamment l'arthrose.

L'arthrose est une maladie dégénérative fréquente qui affecte les articulations diarthrosiques et constitue une problématique majeure de santé publique. Selon l'AFLAR, environ 17 % de la population française était atteinte d'arthrose en 2018, et cette prévalence pourrait atteindre 22 % d'ici 2030. Il s'agit d'une des premières causes d'incapacité fonctionnelle chez les sujets de plus de 40 ans. Si le vieillissement représente un facteur de risque majeur, d'autres éléments contribuent également au développement de cette pathologie, notamment l'obésité, l'ostéoporose, le stress, la suractivité sportive, ainsi que les traumatismes et accidents professionnels. Cliniquement, l'arthrose se manifeste principalement par des douleurs articulaires associées à une inflammation, une gêne fonctionnelle et une altération des mouvements.

Différentes approches thérapeutiques ont été employées pour le traitement de l'arthrose. Celles-ci incluent l'utilisation des AINS et les infiltrations intra-articulaires de corticoïdes ou d'acide hyaluronique, souvent associées à une prise en charge par rééducation fonctionnelle. Cependant, ces traitements offrent uniquement un soulagement temporaire des symptômes. Lorsque les lésions cartilagineuses deviennent plus sévères, des interventions chirurgicales telles que les microfractures ou les greffes de cartilage peuvent être envisagées. Dans les cas les plus avancés, où l'articulation est gravement détériorée, l'implantation d'une prothèse articulaire constitue une solution de dernier recours.

Face aux limites des traitements conventionnels, la recherche s'oriente vers de nouvelles approches visant à ralentir la dégénérescence du cartilage et à favoriser sa réparation tissulaire. L'ingénierie tissulaire et les thérapies cellulaires, notamment l'utilisation de

chondrocytes, apparaissent comme des pistes prometteuses. Toutefois, ces stratégies présentent encore plusieurs défis, tels que le coût élevé des interventions, la morbidité des sites donneurs en cas d'autogreffe, et la nécessité de conditions techniques rigoureuses. Un enjeu majeur réside dans la capacité à maintenir les chondrocytes dans un phénotype stable, ce paramètre est directement influencé par la nature du support utilisé, sa composition, sa structure et son environnement. L'optimisation de ces facteurs constitue donc une orientation clé des recherches actuelles en régénération cartilagineuse.

L'ingénierie tissulaire est un domaine en pleine expansion dont l'objectif est de restaurer, et d'induire la formation d'un nouveau tissu de remplacement, cela est possible en associant cellules, biomatériaux et facteurs bioactifs. Dans ce cadre, ce travail de thèse se concentre sur le développement d'un scaffold poreux tridimensionnel conçu pour favoriser la régénération du cartilage articulaire par un processus de formation tissulaire *in situ*. L'approche adoptée repose sur l'utilisation de polymères naturels, notamment le chitosan (CHT) et l'acide hyaluronique (HA), deux matériaux largement utilisés en ingénierie tissulaire pour leurs biocompatibilité, bioactivité et leur capacité à interagir avec la MEC du cartilage.

La principale problématique de cette recherche réside dans les propriétés mécaniques limitées du CHT et du HA, en particulier pour ce dernier, ainsi que dans leur susceptibilité à la dégradation enzymatique. Il est donc essentiel d'améliorer leur résistance mécanique tout en maintenant leur biocompatibilité. Dans cette optique, des éponges poreuses ont été élaborées à partir de solutions visqueuses ou d'hydrogels composés de CHT et d'HA. La stratégie expérimentale repose sur la préparation d'un mélange homogène de poudres de CHT et de HA, mis en solution dans de l'eau pure. L'ajout d'acide lactique permet la formation d'un hydrogel physique. Deux approches de réticulation chimique ont ensuite été mises en œuvre pour renforcer la stabilité et les propriétés mécaniques des structures obtenues. La première consiste à introduire de la maltodextrine oxydée (MDo), un polysaccharide modifié, qui induit une réticulation spontanée avant la lyophilisation. La seconde repose sur l'ajout d'hexaméthylènetétramine (HMTA) au mélange CHT:HA, suivi d'une lyophilisation, puis d'un traitement thermique de l'éponge, nécessaire pour provoquer la réticulation. Ce procédé, innovant, n'a encore jamais été décrit dans la littérature pour la réticulation du CHT.

L'évaluation expérimentale débute par l'étude de la réticulation chimique, d'abord sur le CHT seul, puis sur le complexe CHT:HA, accompagnée d'une caractérisation rhéologique. L'analyse physico-chimique des éponges est réalisée à l'aide de plusieurs techniques : spectroscopie FTIR pour identifier les interactions chimiques, microscopie électronique à balayage (MEB) pour examiner la morphologie, et évaluation des propriétés d'absorption et

d'adsorption via des tests de gonflement et par DVS. La stabilité des matériaux est étudiée à travers des tests de dégradation hydrolytique (PBS, 37°C), enzymatique (lysozyme) et acide (acide lactique, pH 2,3). Les propriétés mécaniques des éponges sont ensuite caractérisées par analyse mécanique dynamique (DMA), La libération de la ciprofloxacine (CFX), un antibiotique de la famille des fluoroquinolones utilisé dans le traitement des infections ostéoarticulaires, est évaluée en fonction des différentes formulations d'éponges employées. Enfin, l'étude de la cytotoxicité indirecte est menée conformément à la norme ISO 10993-5 afin de vérifier la biocompatibilité des matériaux développés. Le plan de la thèse se divise en deux parties : une partie bibliographique et une partie expérimentale.

La partie bibliographique commence par une introduction au tissu ostéochondral, suivie d'une description des principaux éléments qui le constituent. Elle présente ensuite l'arthrose, en détaillant ses principales causes, sa classification et les traitements thérapeutiques actuels. Ensuite, la stratégie d'ingénierie tissulaire est abordée, en mettant l'accent sur les cellules, les signaux et les matrices (scaffolds). Les différents types de scaffolds sont présentés, ainsi que le cahier des charges à respecter. Les sous parties suivantes présentent le CHT et de l'HA et discute de leur rôle dans la stratégie d'ingénierie du cartilage, parallèlement nous aborderons les principales méthodes de réticulation du CHT.

La partie expérimentale commence par les matériels et méthodes utilisés, puis la partie résultats et discussions est présentée en 3 chapitres. Le chapitre 1 porte sur l'étude rhéologique des solutions de CHT et des hydrogels de CHT, CHT:HA avec la MDo. Le chapitre 2 se concentre sur la conception et la caractérisation physico-chimique des éponges de CHT et CHT:HA réticulée avec la MDo ou l'HMTA en utilisant des techniques de spectroscopie IRTF, MEB, absorption par batch et adsorption par la technique DVS, ainsi que l'étude de la dégradation hydrolytique (PBS), enzymatique (lysozyme) et acide (acide lactique). Le chapitre 3 se concentre sur la caractérisation mécanique des éponges par analyse mécanique dynamique (DMA), l'évaluation de la cytotoxicité des éponges selon la norme ISO 10993-5 et l'évaluation des profils de libération d'une molécule ayant une activité antibactérienne exemple de la CFX.

En conclusion les travaux réalisés dans cette étude ont mis en évidence le rôle des agents réticulants chimiques, en particulier la MDo et le formaldéhyde issu de la décomposition thermique de l'HMTA, dans la modulation des propriétés physico-chimiques et mécaniques des éponges à base de CHT et d'HA, l'introduction de ces réticulants dans les formulations de CHT et de CHT:HA a permis d'augmenter la rigidité des éponges, d'améliorer leur résistance à la dégradation enzymatique et acide, et de réduire leur capacité de gonflement en milieu

physiologique. Par ailleurs, les profils de libération de la CFX ont montré une cinétique plus rapide pour les éponges réticulées comparées aux non réticulés, indiquant que la libération est principalement régulée par l'interaction CHT-CFX. L'ajout du HA n'altère pas les profils de libération des éponges réticulées ou pas avec la MDo, mais il augmente la quantité de CFX libérée par les éponges CHT:HA:HMTA traitées thermique.

Les résultats obtenus confirment la pertinence de la stratégie de réticulation chimique pour l'optimisation des performances des éponges à base de CHT et de CHT:HA. La possibilité de moduler les propriétés physico-chimiques et mécaniques de ces éponges ouvre des perspectives intéressantes pour la conception future de supports stratifiés intégrant un gradient de rigidité, en adéquation avec l'organisation architecturale du cartilage. Cette approche constitue un axe prometteur pour le développement de scaffolds biomimétiques, adaptés aux exigences spécifiques de l'ingénierie du tissu cartilagineux.

Partie 1 : Etude bibliographique

Cette partie abordera l'arthrose, la physiopathologie de l'unité ostéochondrale et les stratégies thérapeutiques disponibles, englobant les dispositifs médicaux et les concepts d'ingénierie tissulaire appliqués à la réparation du cartilage. Nous discuterons des caractéristiques des scaffolds, qu'ils soient d'origine naturelle ou synthétique, en définissant les critères essentiels pour favoriser la régénération d'un cartilage fonctionnel. Nous discuterons ensuite du rôle du CHT et de l'HA dans la stratégie d'ingénierie du tissu cartilagineux, ainsi que les méthodes de réticulation employées pour produire des hydrogels de CHT. Enfin, nous concluons ce chapitre par une présentation des travaux de recherche réalisés au sein du laboratoire et la présentation de la stratégie de recherche suivie pour ce travail de thèse.

1.L'arthrose

L'arthrose est une maladie dégénérative fréquente caractérisée par un trouble musculo-squelettique affectant les articulations diarthrosiques ¹. Selon l'AFLAR, 17% de la population en France était atteinte d'arthrose en 2018, ce taux pourrait atteindre les 22% à l'horizon 2030. Cette pathologie constitue l'une des premières causes d'incapacité fonctionnelle chez les sujets de plus de 40 ans. En plus du phénomène de vieillissement lié à l'âge, les facteurs de risque de l'arthrose sont également présents chez les personnes souffrant d'obésité ², d'ostéoporose, de stress, de suractivité sportive, de traumatismes et d'accidents professionnels. Les manifestations cliniques de l'arthrose incluent souvent l'apparition d'une douleur du fait de la présence d'une inflammation au niveau de l'articulation, celle-ci est accompagnée d'une gêne fonctionnelle et d'une perturbation des mouvements articulaires ³. Plusieurs articulations peuvent être concernées par cette maladie, l'articulation du genou est la plus affectée (Figure 1). Le signe pathognomonique de l'arthrose est la perte du cartilage articulaire qui est visible radiologiquement et cela se traduit par une réduction de l'espace articulaire ⁴.

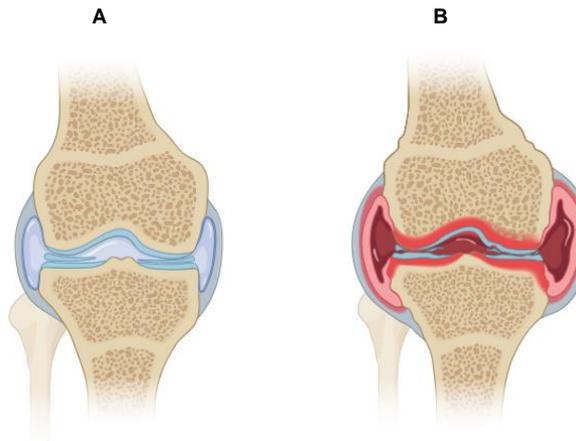


Figure 1 : Représentation schématique de l'articulation du genou dans un état physiologique (image A) et dans un état inflammatoire (image B). Généré à partir du site web Biorender.com

Les options thérapeutiques disponibles à ce jour comprennent l'administration d'AINS, les infiltrations intra-articulaires de corticoïdes ou d'HA, combinées à une prise en charge par rééducation fonctionnelle. Lorsque les lésions cartilagineuses atteignent un stade sévère, des interventions chirurgicales telles que la micro-fracture ou les greffes de cartilage peuvent être envisagées. Pour les atteintes plus avancées, susceptibles de provoquer une destruction complète de l'articulation, l'implantation d'une prothèse articulaire représente une solution thérapeutique de dernier recours.

2. Physiologie de l'unité ostéocondrale

2.1. Le cartilage articulaire

Le cartilage articulaire ou cartilage hyalin est un tissu conjonctif spécialisé qui assure la protection du système musculo-squelettique. Il transmet les charges mécaniques à l'os sous-chondral et assure le bon fonctionnement des articulations en réduisant les forces de frictions entre les surfaces osseuses articulaires³. Le cartilage articulaire est composé d'une seule population cellulaire ; les chondrocytes dont le nombre est inférieur à 10% du volume totale du cartilage.

Les chondrocytes assurent la synthèse et l'homéostasie de la MEC^{3,5}. Ils dérivent des cellules mésenchymateuses hautement spécialisés, ces dernières présentent des variations au niveau de la forme, du nombre et de la taille en fonction de la localisation anatomique dans l'épaisseur du tissu⁶. Ces cellules présentent une forme elliptique à l'âge juvénile à la surface du cartilage articulaire puis sont susceptibles d'évoluer vers la forme ronde. Le processus de maturation et de développement des chondrocytes est appelé « chondrogenèse ». Des signaux sont impliqués dans ce processus telle que : les BMP, GDF5, TGF- β . Le processus de spécialisation et de développement des chondrocytes est assuré par la voie de signalisation

Wnt / β caténine ⁷. Les chondrocytes du cartilage articulaire présentent la particularité d'évoluer dans un milieu faible en oxygène, produisent de l'énergie par glycolyse en condition d'anaérobie et génèrent de l'acide lactique comme déchet de la fermentation⁷. Les chondrocytes sont sensibles à leur environnement. En effet, quand ils sont cultivés *in vitro* en monocouche, ils sont susceptibles de perdre leur phénotype et modifier leur activité métabolique. Lorsqu'ils sont cultivés en trois dimensions, les cellules préservent leurs morphologies rondes et leur potentiel de synthèse des différents éléments de la MEC. De plus, l'application d'une contrainte sous la forme d'un stimulus mécanique extérieur peut affecté l'activité métabolique et l'expression phénotypique des chondrocytes par le phénomène de mécanotransduction⁸. Les chondrocytes sont entourées d'une matrice MPC appelée également *chondron* de 2 à 4 μm les isolant les unes des autres perdant de ce fait leur capacité de connexion. La composition de cette matrice est différente de celle de la MEC, elle est composée essentiellement de protéines comme la décorine et le collagène VI. Les chondrocytes sont reliés aux différents éléments de la MPC par l'intermédiaire des récepteurs membranaires CD44 et les intégrines⁹. La MPC joue un rôle dans la transduction des signaux dans le cartilage lors de la mise en charge¹⁰.

La MEC du cartilage est composée essentiellement d'eau (68- 85%), de collagène (60- 86% du poids sec du cartilage) et de glycoprotéines (15- 40% du poids sec du cartilage) ainsi que d'autres protéines matricielles. Le collagène de type II est le plus abondant du cartilage articulaire (90- 95%) suivi des collagènes I, IV, V, IX, XI qui contribuent avec le collagène II à la résistance structurelle et élastique du cartilage articulaire³. Les glycoprotéines sont des protéines liées aux glycosaminoglycanes (GAG) par des liaisons covalentes. La principale protéoglycane au niveau du cartilage articulaire est l'agrécane, les principaux GAG sont l'HA, le chondroïtine sulfate, le kératine sulfate et enfin le dermatane sulfate³. Le réseau complexe formé de collagène et de glycoprotéines de la MEC permet la résistance à la compression du cartilage³.

L'anisotropie et la viscoélasticité non linéaire du cartilage articulaire, décrits par *Mow et al.* sont liés à l'organisation biphasique du cartilage à savoir la phase solide et la phase liquide ⁸. L'organisation structurale et la composition de la matrice du cartilage présente des variations régionales. Dans le sens perpendiculaire, le cartilage articulaire est organisé en 4 zones, chacune ayant une organisation spécifique et un rôle biomécanique distinct. : La zone superficielle, la zone intermédiaire, la zone profonde ainsi que le cartilage calcifié.

1) La **zone superficielle** représente environ 10 à 20 % du volume total du cartilage. Elle est en contact direct avec le fluide synovial. Cette zone se caractérise par la présence de fibres de collagène de type II orientées parallèlement à la surface du tissu, ainsi que par des

chondrocytes de forme aplatie. Elle joue un rôle essentiel dans la lubrification de l'articulation et confère au cartilage sa résistance à la traction. 2) La **zone intermédiaire**, ou zone moyenne, constitue entre 40 et 60 % du volume du cartilage. Elle contient des fibres de collagène plus épaisses, orientées de manière aléatoire, et des chondrocytes de forme arrondie. Cette organisation contribue à la résistance du cartilage face aux forces de compression. 3) La **zone profonde** représente quant à elle entre 30 et 40 % du volume total. Les fibres de collagène y sont regroupées et orientées perpendiculairement à la surface articulaire, tandis que les chondrocytes s'alignent parallèlement à ces fibres. Cette zone est cruciale pour supporter les forces de compression générées par les mouvements du corps. Enfin, 4) le **cartilage calcifié** forme une interface entre le cartilage et l'os sous-jacent. Les fibres de collagène y sont continues, et les chondrocytes présentent un phénotype hypertrophique, produisant du collagène de type X qui permet la calcification de la matrice. Cette zone assure la transmission et la répartition des charges vers l'os sous-chondral tout en offrant une résistance aux forces de cisaillement. Elle combine des caractéristiques propres au cartilage et à l'os, et reste perméable aux nutriments et aux molécules de faible poids moléculaire nécessaires à l'homéostasie des différentes couches cartilagineuses^{3,5}.

Les chondrocytes assurent l'homéostasie du tissu cartilagineux. Dans les conditions physiologiques, il y a un équilibre entre la synthèse (anabolisme) et la dégradation (catabolisme) des différents éléments de la MEC. Lors d'un processus pathologique de l'arthrose, un déséquilibre se produit en faveur de l'activité de dégradation. Les chondrocytes produisent des enzymes telles que les métalloprotéinases matricielles et les agrécanases ainsi que d'autres facteurs catabolisants comme l'IL-1 β et le TNF- α , ces éléments sont responsables de la dégradation du réseau de collagène et d'agrécans engendrant une altération des propriétés mécaniques du cartilage¹¹.

Le cartilage articulaire présente la problématique d'être un tissu non vascularisé. Il est dépourvu de nerfs et de vaisseaux lymphatiques et par conséquent, il ne présente pas de capacité d'auto-régénération après un dommage³. Les lésions peuvent atteindre l'os sous-chondral et entraîner l'inflammation de toute l'articulation. Le degré d'atteinte de l'unité ostéo-chondrale est donc un facteur important dans l'évolution de la pathologie et dans le choix d'un plan de traitement. A cet effet, *l'International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society* (ICRS) a mis en place une classification qui prend en compte les paramètres suivants : La localisation, la profondeur, la taille et le pourtour de la lésion. La classification est donnée sur le tableau 1.

Tableau 1 : Classification des lésions ostéochondrales selon l'International Cartilage Regeneration & Joint Preservation Society (ICRS)³

Classification	Etendue de la lésion
Grade I	Lésions superficielles avec présence de fissures
Grade II	Lésions profondes d'épaisseur inférieure à la profondeur du cartilage
Grade III	Lésions étendues à au moins la moitié de l'épaisseur du cartilage n'atteignant pas l'os sous chondral
Grade IV	Lésions ostéochondrales

2.2. L'os sous-chondral

Le tissu osseux sous chondral est situé immédiatement en dessous de la zone calcifiée du cartilage articulaire. Il est anatomiquement constitué d'os cortical et d'os trabéculaire³. La partie trabéculaire de l'os sous chondral est poreuse et hautement vascularisée et présente un métabolisme actif³. L'os sous chondral est constitué d'une MEC calcifiée contenant des cristaux d'hydroxyapatite ainsi que d'autres minéraux. La phase organique de la matrice est composée essentiellement de fibres de collagène de type I (90%). Ce tissu joue un rôle important dans l'absorption des chocs transmis par le cartilage et dans l'apport en éléments nutritifs au tissu cartilagineux grâce à ses nombreux vaisseaux sanguins. De par son innervation, l'os sous chondral permet la sensation de douleur lors d'un processus pathologique tel que l'arthrose^{3,5}.

2.3. Propriétés mécaniques du cartilage

Selon S. Davis *et al.* le cartilage articulaire présente une rigidité comprise entre 0,1 et 6,2 MPa¹⁰. Ce dernier est soumis à des contraintes de cisaillement, traction et compression. Les contraintes mécaniques pouvant s'appliquer au cartilage articulaire dépendent du type d'articulation concernée. Dans des conditions physiologiques, la contrainte de compression appliquée à un cartilage articulaire de la hanche humaine est estimée entre 5 et 8 MPa et peut atteindre 18 MPa lors d'un mouvement (action de se lever d'une chaise)¹². L'application d'une contrainte mécanique physiologique est primordiale pour le maintien de l'homéostasie et d'un équilibre entre les réponses cataboliques et anaboliques de la MEC assurée par les chondrocytes¹⁰. Cela entraîne la réduction des facteurs pro-inflammatoires par exemple les cytokines (1L-1 β)¹³, mais aussi les médiateurs pro-inflammatoires et des enzymes qui assurent la dégradation de la MEC comme les métalloprotéinases.

Le cartilage articulaire est résistant aux contraintes mécaniques et cela est principalement lié à son comportement viscoélastique découlant de la viscoélasticité intrinsèque des deux composants majeurs de la matrice du cartilage : les fibres de collagènes et les protéoglycanes

¹⁴, ainsi qu'aux interactions entre les différentes molécules de la MEC. La phase solide du cartilage articulaire représentée par les protéoglycanes de la matrice comporte des groupements chimiques pouvant être chargés négativement tels que les fonctions carboxylates et sulfates. Elles forment des liaisons chimiques avec des molécules chargées positivement et entraînent la formation d'un gradient osmotique¹⁰. Quand une force constante est appliquée au cartilage, la pression du fluide interstitiel augmente ce qui entraîne la sortie de ce fluide à travers la MEC, ce phénomène est dépendant du temps¹⁰. Le comportement de fluage et de relaxation des contraintes du cartilage articulaire en compression est attribué à l'exsudation du fluide interstitiel. Ce phénomène inclut également la redistribution du fluide à travers le tissu cartilagineux¹⁴. En résumé, le cartilage articulaire présente un comportement de fluage suite à l'application d'une contrainte de compression constante et présente une relaxation des contraintes en réponse à une déformation (déplacement) constante.¹⁵ Selon A.F. Mak *et al.* le frottement causé par l'écoulement du fluide interstitiel avec les différents composants organiques de la matrice dissipe de l'énergie, ce mécanisme joue un rôle dans le comportement viscoélastique du cartilage articulaire ¹⁴.

Le cartilage articulaire est sensible à la nature ainsi qu'à l'intensité de la force appliquée, mais également à la durée, la direction et la fréquence des sollicitations mécaniques. Ainsi, une déformation importante provoque des dommages au niveau du réseau de collagène du tissu, alors que de faibles taux de déformations entraînent des destructions au niveau du réseau non fibrillaire du tissu. Il a été également rapporté qu'une fréquence des contraintes supérieures à la fréquence physiologique de 1Hz était responsable de l'apparition des dommages au niveau de la surface du tissu¹⁶.

Sur le plan mécanique, le cartilage articulaire est caractérisé par différentes grandeurs. Le module global (aggregate modulus) varie de 0,1 à 2 MPa ¹⁵, le module d'Young en compression varie de 0,24 à 0,85 MPa ¹⁷ et le module de relaxation à l'équilibre varie de 6,5 à 45 MPa. La contrainte de traction varie de 15 à 35 MPa, l'élongation à la rupture est de 80% ¹⁸. Le module de cisaillement complexe varie de 0,05 – 0,4 MPa ¹⁹ et le coefficient de Poisson varie de 0,06 à 0,3 ¹⁷ selon le cartilage.

3. Traitement des défauts ostéocondraux

3.1. Les traitements non chirurgicaux

Des traitements sont indiqués en première intention pour réduire la douleur par la kinésithérapie, les exercices physiques de relaxation articulaire ou le port d'appareillages (orthèses, attelles, ...). Des traitements pharmacologiques peuvent aussi y être associés afin de traiter la douleur telles que les antalgiques, les AINS et les corticoïdes avec un mode

d'administration *per os*. Toutefois, la prise répétée de ces médicaments peut entraîner des effets indésirables hépatiques et gastro-intestinaux ².

D'autres solutions thérapeutiques existent actuellement pour le traitement local de l'inflammation au niveau de l'articulation comme les infiltrations intra articulaires d'AINS ou de corticostéroïdes qui sont réalisées à proximité de la lésion afin de traiter la douleur. D'autres produits sont utilisés afin de rétablir la fonction de lubrification de l'articulation tel que l'injection d'HA, glucosamine, chondroïtine sulfate, ou encore l'injection de plaquettes riches en plasma. Toutefois, le bénéfice thérapeutique apporté par ces traitements est limité dans le temps ²⁰.

Plus récemment, des thérapies par injections intra-articulaires de cellules souches mésenchymateuses de la moelle osseuse ont montré un rôle bénéfique dans la modulation du processus inflammatoire de l'articulation. Ces injections induisent la sécrétion des cytokines anti-inflammatoires et la production de facteurs de croissance par les chondrocytes. Cependant cette méthode de traitement reste incertaine et nécessite de plus amples investigations ²¹.

3.2. Les traitements chirurgicaux

Le recours aux traitements chirurgicaux est destiné à traiter des lésions plus sévères. Les procédures chirurgicales palliatives consistent à effectuer un lavage articulaire ou débridement sous arthroscopie et une chondroplastie visant à rendre plus lisse les bords de la lésion. Toutes ces thérapeutiques ont pour objectif commun de réduire la douleur et améliorer la fonction du cartilage en luttant contre les facteurs pro-inflammatoires au niveau de l'articulation. Cependant ces traitements dont l'efficacité est à court terme ne permettent pas d'arrêter la progression de la maladie. Les chirurgiens sont amenés à employer des traitements réparateurs en fonction de l'étendu de la lésion comme l'arthroplastie par abrasion arthroscopique, les perforations de Pridie et les microfractures.

Ces traitements consistent à provoquer une hémorragie en créant des micro pertuis de 2 à 4 mm de profondeur au niveau de l'os sous chondral et induire la formation d'un caillot sanguin contenant des facteurs de croissance et des CSMs au niveau du défaut du cartilage, entraînant la formation d'un tissu de comblement. La technique de micro fractures a été introduite dans les années 1980 par le Dr. Steadman et approuvée par la FDA. Elle a connu un large succès et elle a longtemps été considérée comme le gold standard des chirurgies restauratrices de l'articulation du genou. Toutefois, cette technique peut engendrer une fragilisation de l'os sous-chondral et une détérioration du traitement à long terme en induisant la formation d'un tissu cartilagineux de type fibreux riche en collagène de type I présentant un comportement biomécanique et des propriétés viscoélastiques inférieures au cartilage hyalin ^{3,5}.

Le traitement régénératif consiste à des transplantations ostéochondrales utilisant des greffons autologues ou allogreffes permettant le traitement des défauts ostéochondraux sévères de taille importante. Cependant, ces procédures chirurgicales ne sont pas sans risques, la morbidité des sites donneurs d'autogreffes ainsi que le risque de transmission des maladies et de réactions immunitaires liées à l'utilisation des allogreffes constituent un inconvénient majeur pour les patients ³.

L'émergence des thérapies cellulaires par implantation de chondrocytes autologues associée ou non à une matrice en collagène ont été considérées comme des stratégies innovantes pour la régénération du cartilage hyalin. Le principe consiste à prélever un échantillon de cartilage sain autologue lors d'une première chirurgie, puis après un traitement enzymatique par digestion de la MEC, les chondrocytes sont amplifiés *in vitro* (12 à 48 millions de cellules)²² et réimplantés chirurgicalement au niveau du défaut du cartilage. Dans le cas des défauts du cartilage (supérieur à 4 cm²) localisés au niveau du genou, l'implantation des chondrocytes autologues est souhaitable et stable dans le temps (suivi sur 10 ans) ²³. L'inconvénient majeur de cette technique est le fait que la chirurgie se déroule en deux temps et nécessite des moyens financiers et matériels importants, ainsi que le risque d'hypertrophie du lambeau périosté utilisé pour recouvrir les cellules ²².

3.3. Utilisation de dispositifs médicaux

Plus récemment, l'émergence de moyens thérapeutiques innovants pour le traitement des défauts du cartilage et des défauts ostéochondraux comme les dispositifs médicaux sont apparus. Ils doivent obtenir l'approbation des autorités réglementaires (marquage CE en Europe, FDA aux USA) pour permettre leur commercialisation.

Selon W. Wei *et al.* ces dispositifs médicaux sont classés en 3 catégories :

- Allogreffes sous la forme de particules / cylindres : BioCartilage[®] et Cartiforme[®] (Arthrex). DeNovo[®] et Chondrofix[®] (Zimmer Biomet).
- Hydrogel acellulaire injectable à base de polymères : Cargel[™] (Smith & Nephew)
- Implants multicouches à base de polymères naturels ou synthétiques : Chondromimetic[®] (Collagen Solutions Plc)

Les principaux dispositifs médicaux commercialisés pour la régénération du cartilage articulaire sont résumés dans le tableau 2.

Tableau 2 : Les dispositifs médicaux commercialisés pour le traitement des défauts du cartilage articulaire

Produit	Composition	Résultats cliniques	Références
Cartipatch®	ICA de 3 ^{ème} génération cultivée dans des hydrogels d'agarose-alginate	Résultats inférieurs après 2 ans de suivi, en comparaison avec la technique de mosaïcoplastie.	Clave <i>et al.</i> 2015 ²⁴
CaReS®	Hydrogel de collagène I associé à des chondrocytes autologues de 3 ^{ème} génération	Score IKDC satisfaisant après 12 à 60 mois de l'implantation	Schneider <i>et al.</i> 2011 ²⁵
Bioseed-C®	Fibrine + PLGA, cultivé avec des chondrocytes autologues de 3 ^{ème} génération	Amélioration des signes cliniques après 1 an d'implantation	Peter C.K <i>et al.</i> 2009 ²⁶
Novocart®3D	Eponge de collagène I et de chondroïtine sulfate (architecture en biphasique)	Présence d'une hypertrophie tissulaire	Niethamme <i>et al.</i> 2014 ²⁷
CarGel™	CHT injecté avec le sang du patient pour stabiliser le caillot sanguin en complément d'une microfracture. Traitement de défauts de grade IV	Résultats préliminaires favorable pour le traitement des défauts du cartilage de pleine épaisseur	R.Calvo <i>et al.</i> 2021 ²⁸
Chondrofix®	Allogreffe ostéocondral composé de cartilage hyalin décellularisé / os spongieux pour le traitement de défaut de pleine épaisseur	Taux d'échec de 72% mesuré 2 ans après l'implantation	M. E. Bishop <i>et al.</i> 2018 ²⁹

Bien que ces dispositifs médicaux puissent apporter un bénéfice thérapeutique, des limitations sont relevées et nécessite plus d'investigations et d'amélioration. L'amélioration de l'intégration, la stabilité et l'efficacité à long terme du scaffold est directement lié aux propriétés physico-chimiques et mécaniques des matériaux le composant. Il est donc important de se rapprocher

des caractéristiques structurelles et biomécaniques du tissu d'origine afin de reconstruire un scaffold biomimétique ³⁰.

4. L'ingénierie tissulaire du cartilage articulaire

Le principe de l'ingénierie tissulaire repose sur le fait d'associer des matériaux (naturels ou synthétiques), des cellules (chondrocytes, CSM...) avec ou sans facteurs de croissance (TGF beta, BMP, IGF) et / ou principes actifs (kartogenine, ...). Ceci permet de développer une nouvelle solution thérapeutique destinée à induire une réaction biologique de régénération tissulaire au niveau du site de la lésion. L'objectif est de remplacer un tissu endommagé par un tissu artificiel produit au laboratoire. Ainsi, un support biocompatible et biodégradable avec une structure tridimensionnelle est utilisé en combinaison à des cellules et/ou à des facteurs de croissance ou stimuli physiques. L'organisation structurelle du support joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire, et cela permet de favoriser la synthèse des différents éléments de la MEC et de produire un tissu fonctionnel qui s'intègre parfaitement au tissu environnant ³¹.

Selon B. Balakrishnan *et al.*, le tissu de remplacement doit combler intégralement l'espace créé par la lésion et doit conserver son étanchéité. Sur le plan mécanique, le tissu régénéré doit maintenir ses propriétés à long terme surtout au niveau des défauts de taille importantes. Idéalement, le tissu doit pouvoir supporter des contraintes atteignant 2 à 6 MPa et avoir un module dynamique en compression entre 12-20 MPa, similaire au cartilage natif ³².

4.1. Les cellules

4.1.1. Les chondrocytes

Les chondrocytes sont les seules cellules présentes dans le cartilage articulaire. Les chondrocytes autologues sont préférées pour la réparation et la régénération du cartilage. Leur disponibilité reste cependant très limitée. Même après amplification *in vitro*, ces cellules montrent une instabilité phénotypique, souvent marquée par une dédifférenciation ³³.

D'autres alternatives ont été envisagées, en variant les sources de prélèvements des chondrocytes : allogénique ou xénogénique, ce dernier présentent un risque de réponse immunitaire et de transmission de maladies ³³.

4.1.2. Les cellules souches

C'est une source cellulaire très intéressante pour la régénération du cartilage et de l'os sous chondrale. Les CSMs sont des cellules multipotentes capables de se différencier en ostéoblastes et en chondrocytes. De plus, elles sont capables de s'autorenouveler et de proliférer *in vitro*. Ces cellules peuvent être retrouvées au niveau du sang, des tissus adipeux, des cordons ombilicaux et membranes synoviales ³⁴. Elles présentent une alternative possible

à l'utilisation des chondrocytes et constitue un atout majeur pour l'ingénierie tissulaire. Selon L. Zhang *et al.* les CSM et CSE représentent des sources cellulaires prometteuses pour l'ingénierie du tissu cartilagineux ³³.

4.2. Les signaux

Avec les cellules, les stimuli biochimiques et biomécaniques représentent les principaux éléments permettant une régénération du cartilage. Différents signaux biochimiques ont été impliqués dans la différenciation chondrogénique afin de stimuler la synthèse de la MEC du cartilage.

4.2.1. Les molécules de signalisation

L'utilisation des facteurs de croissances (TGF- β , FGF 2, IGF-1, BMP-7 ; ...) a montré leur effet stimulant sur l'activité des chondrocytes en améliorant la prolifération et le potentiel chondrogénique des chondrocytes. Selon M. Jakob *et al.* l'association des différents facteurs de croissance (FGF 2 et TGF- β) favorise la prolifération cellulaire et la synthèse des protéines matricielles ³⁵. L'utilisation de facteurs de croissance contribue significativement au maintien du phénotype des chondrocytes et permet également la formation et le développement du tissu cartilagineux. Selon H. Kwon *et al.*, divers paramètres peuvent affecter l'efficacité des facteurs de croissance, notamment leur concentration et leur éventuelle combinaison avec d'autres facteurs. Les supports de culture cellulaire, qu'ils soient en 2D ou en 3D, peuvent également influencer la réponse cellulaire ³⁶. La kartogénine est décrite dans la littérature comme une petite biomolécule capable de favoriser la différenciation des CSMs en chondrocytes, dans le but de régénérer le cartilage articulaire. Cette molécule libère le facteur CBFb, qui s'associe au facteur RUNX1 pour former le complexe CBFb-RUNX1. Ce complexe active la transcription de protéines telles que le collagène de type II et les agrécanes, composants essentiels de la MEC du cartilage articulaire ³⁷.

4.2.2. La stimulation mécanique

Les chondrocytes réagissent positivement à certaines contraintes mécaniques, notamment la compression dynamique. Il est rapporté que l'application d'une contrainte de compression à une amplitude comprise entre 2% et 10% (0,5 à 1 MPa) et à une fréquence de 0,01 à 1Hz stimule la production de collagène, des protéoglycanes et de la fibronectine par les cellules³². Dans l'étude de I. Villanueva *et al.*³⁸ les auteurs ont étudié la réponse des chondrocytes articulaires bovins encapsulés dans des gels de polyéthylène glycol (PEG) réticulés. Différentes contraintes ont été appliquées, à la fois statiques et dynamiques. Pour les conditions dynamiques, une amplitude sinusoïdale de [0-15%] a été appliquée à deux fréquences : 1Hz et 0,3Hz. Les auteurs ont évalué plusieurs paramètres liés à la viabilité

cellulaire, à l'activité catabolique du cartilage, ainsi qu'à la formation de protéoglycanes et à la prolifération cellulaire. Les résultats ont montré pour les gels fortement réticulés une augmentation de la production de protéoglycanes et de la prolifération cellulaire dans les conditions statiques. De plus, une production élevée de protéoglycanes a été observée à la fréquence de 1Hz dans les conditions dynamiques. En revanche, les niveaux d'oxyde nitrique et de prolifération cellulaire sont restés constants ³⁸.

4.3. Les scaffolds

Le support (scaffold) est un échafaudage qui fournit le support nécessaire pour la prolifération cellulaire et le maintien de leur capacité de différenciation ³⁹. Ils peuvent se présenter sous différentes formes ; hydrogels, éponges et nanofibres. Ils jouent un rôle important dans les différentes stratégies de reconstruction de l'unité ostéochondrale. En effet, ils doivent présenter une structure en trois dimensions, mimer la structure et la fonction du tissu de remplacement et fournir un microenvironnement pour la restauration du tissu complexe ³. Plusieurs critères ont été décrits dans la littérature pour la conception et la fabrication d'un support pour la régénération du tissu ostéochondral. Le biomatériau de choix doit être biocompatible, bioactif et stable sur le plan physicochimique et mécanique, biodégradable permettant ainsi la formation du nouveau tissu, et doit pouvoir combler parfaitement le défaut du cartilage en s'intégrant avec les tissus environnants ³².

4.3.1. Cahier des charges d'un scaffold pour l'ingénierie tissulaire

Le scaffold idéal pour l'ingénierie du tissu cartilagineux doit posséder des propriétés spécifiques favorisant la régénération du cartilage, tout en offrant un support mécanique adapté. Il doit permettre l'adhésion cellulaire, la diffusion des nutriments et la biodégradation contrôlée pour faciliter le remodelage tissulaire.

Sur le plan **architectural**, une porosité élevée est essentielle afin de favoriser la prolifération et la croissance cellulaire. Une macroporosité interconnectée permet de s'adapter au type de cellules ciblées : une taille de pores comprise entre 150 et 250 μm est idéale pour les chondrocytes articulaires, tandis qu'une taille supérieure à 300 μm est plus adaptée aux CSMs. Par ailleurs, la présence d'une microporosité contribue à assurer la diffusion efficace des nutriments et de l'oxygène, indispensables à l'activité cellulaire ⁴⁰. En ce qui concerne la **biodégradation**, le matériau doit présenter une dégradation contrôlée, ni trop rapide, ni trop lente, et proportionnelle à la formation du nouveau tissu. Les produits issus de cette dégradation ne doivent induire aucun effet indésirable et doivent pouvoir être métabolisés par l'organisme. Le matériau utilisé doit pouvoir être stérilisé sans altération de ses propriétés, tout en garantissant une bonne adhésion et prolifération des chondrocytes ⁴¹.

Enfin, sur le plan **mécanique**, le matériau doit résister aux diverses contraintes exercées

notamment les forces de compression, de traction, de cisaillement et de frottement. Ces exigences orientent le choix vers des matériaux possédant d'excellentes propriétés mécaniques. De plus, leur mode d'implantation doit être compatible avec une chirurgie mini-invasive, qu'il s'agisse d'un matériau injectable ou d'un implant posé en un seul temps opératoire ⁵.

4.3.2. Organisation architecturale des scaffolds

4.3.2.1. Scaffold uniphase

Ce type de support correspond à une structure homogène est conçu pour s'adapter à la géométrie du défaut ostéochondral. Il peut être constitué d'un matériau unique, tel que l'hydroxyapatite, ou de polymères comme le PLGA, le PLLA ou le PCL. Dans certains cas, une combinaison de plusieurs polymères est utilisée afin d'optimiser les propriétés mécaniques, de dégradation ⁴². Chu *et al.* ont proposé l'utilisation d'un support en PLLA ensemencé par des perichondrocytes. Le dispositif a été implanté au niveau de défauts ostéochondraux de condyles fémoraux de 16 lapins adultes. 6 semaines après l'implantation, les tissus de réparation ont été prélevés puis analysés par histologie et microscopie. Les résultats ont montré la formation d'un néocartilage riche en collagène de type I ⁴³.

J. Malda *et al.* ont proposé deux techniques de fabrication d'un scaffold – Une méthode par moulage en compression associée à la technique d'extraction par lavage de sel et l'impression 3D de fibres ^{42,44}. Le scaffold est composé d'un copolymère de poly(éthylène glycol téréphtalate)/poly(butylène téréphtalate) (PEGT/PBT), comportant un segment hydrophile (PEGT) et un segment hydrophobe (PBT).

La caractérisation des scaffolds par MicroCT a montré une taille de pores de 525 µm pour le scaffold imprimé en 3D et de 180 µm pour le scaffold obtenu par moulage. Les résultats histologiques de l'implantation sur un modèle sous-cutané de souris ont montré une augmentation de la production des GAGs pour le groupe implanté avec les fibres 3D. Cependant, ces structures ne reproduisent pas l'architecture complexe du tissu ostéochondral et restent insuffisantes pour répondre aux exigences de l'ingénierie de ce type de tissu ⁴⁵.

4.3.2.2. Scaffolds hybrides

Les scaffolds hybrides multicouches sont obtenus en combinant des polymères avec des métaux ou des céramiques. Des études se sont concentrées sur la production en deux phases de l'unité ostéochondrale, comprenant à la fois un tissu cartilagineux et un os sous-chondral ³. Plusieurs de ces scaffolds ont été étudiés *in vivo* et une partie d'entre eux sont commercialisés et utilisés en clinique (ChondroMimetic ©) ⁴⁶.

G. Chen *et al.* ont proposé l'utilisation d'un scaffold poreux ayant une architecture en 2 phases associant un polymère synthétique de PLGA à du collagène. La technique de fabrication de l'éponge appelée « particulate leaching technic » consiste à rajouter à une solution de polymères, des particules de NaCl (diamètre compris de 355 à 425 μm) à une solution de polymère pour apporter de la porosité à l'éponge. Après évaporation du solvant (le chloroforme dans cet exemple), les particules de NaCl sont dissoutes pendant le rinçage laissant ainsi les pores dans la structure du polymère. Dans cette étude, les éponges de PLGA ont été fabriquées après congélation puis lyophilisation. Les éponges de PLGA de forme cylindrique sont immergées au niveau d'une seule face dans une solution contenant du collagène I puis lyophilisée une deuxième fois. Le scaffold final est composé du scaffold A (éponge de PLGA / collagène) et du scaffold B contenant uniquement du collagène. Le scaffold estensemencé par des CSMs prélevées à partir du fémur de Beagle. Les résultats ont montré une bonne fixation de l'implant au niveau du défaut. Cette étude a montré également qu'il était possible d'induire la formation de cartilage et de l'os au sein du même dispositif en utilisant une structure stratifiée comportant différents biomatériaux biodégradables ⁴⁷.

4.3.3. Composition du scaffold

Différents matériaux sont utilisés pour la régénération du cartilage articulaire et de l'os sous-chondral : Les matériaux inorganiques, les matériaux à base de matrice décellularisée, les métaux et les matériaux composites. Différentes méthodes de fabrication du scaffold ont été décrites dans la littérature. Les supports les plus connus sont les scaffolds en 3D (éponges) et les hydrogels. Les scaffolds utilisés pour la régénération du cartilage sont classés en 3 catégories : Naturels, synthétiques et hybrides ⁴⁸.

4.3.3.1. Les scaffolds synthétiques

Les supports à base de polymères synthétiques sont utilisés comme le poly-éthylène glycol (PEG), l'acide poly-lactique (PLA), l'acide poly-glycolique (PGA) le polycaprolactone (PCL) et le polyvinyl alcool (PVA) et des copolymères comme l'acide poly-lactique-co-glycolique (PLGA).

Les polymères synthétiques les plus couramment utilisés dans les différentes stratégies d'ingénierie du cartilage articulaire sont présentés dans le tableau 3.

Tableau 3 : Principaux polymères synthétiques utilisés pour l'ingénierie du cartilage articulaire

Polymères synthétiques	Avantages	Inconvénients
PCL	Biocompatible, dégradation lente, favorise l'attachement, et prolifération des chondrocytes et la production de la MEC.	Faible hydrophilie, produits de dégradation acide pouvant entraîner une réaction inflammatoire ^{49,50} .
PLGA	Biocompatible, possibilité de synthèse à la forme et à la taille souhaitée, bonne solubilité dans l'eau, biodégradation contrôlée.	Coûts de production élevé, dégradation du polymères, difficulté d'obtenir un profil de libération contrôlé du principe actif, produits de dégradation acides pouvant engendrer une dénaturation de protéines, lors que le PLGA est utilisé comme vecteur ^{51,52}
PLA	Matériau stable, résistant à la dégradation enzymatique. Ses propriétés mécaniques modifiables, possibilités de combinaison avec d'autres polymères synthétique, naturels ou biocéramiques.	Faible dégradation, faible adhésion cellulaire, produits de dégradation acide (L- acide lactique) qui est potentiellement toxique pour les cellules ^{53,54} .

Tamai N.*et al.* se sont intéressés à l'évaluation d'un matériau composite à base d'hydroxyapatite poreux (HAp) chargé avec une protéine (BMP2) et de polymères synthétiques biodégradables (PLA, PEG) pour induire une régénération du cartilage articulaire. L'étude a été menée sur un modèle animal de lapin (New Zeland) avec des défauts de cartilage de pleine épaisseur (4mm x 6mm) au niveau du fémur. L'étude présente 4 groupes : PLA-PEG- BMP2 / HAp- (groupe 1), PLA-PEG / HAp (groupe 2), HAp seul (groupe 3) et enfin le groupe contrôle ne comportant aucun matériau. L'évaluation radiologique et histologique ont montrés après 3 semaines de l'implantation du composite (groupe 1), une réparation tissulaire avec la présence du cartilage hyalin similaire au tissu natif, avec une réparation complète après 6 semaines du défaut au niveau du fémur⁵⁵.

Y. Zhang *et al.* ont testé l'utilisation d'un hydrogel composé d'un copolymère tribloc: PLGA-PEG-PLGA avec une transition sol-gel activée thermiquement à 37°C. Les CSMs de la moelle osseuse ont été encapsulées dans ce gel pour le traitement des défauts du cartilage (5 mm de diamètre et 4 mm de profondeur). L'étude a été menée sur un modèle animal de lapin,

l'injection des gels a été réalisée dans le genou avec 3 groupes : 1) Gel renfermant des CSMs, 2) Gel, 3) Contrôle. Les résultats ont montré une prolifération importante des CSMs pour l'hydrogel contenant les cellules CSMs après 21 jours de l'implantation accompagné par l'expression des marqueurs Coll II et GAG par rapport aux groupes de lapins traités par injection de gels seul. De plus, l'hydrogel cellularisé a montré un module d'Young de 6,56 MPa⁵⁶. Une autre approche visant à produire un scaffold dégradable pour la régénération du cartilage articulaire est proposé par K.Y.Ching *et al.* avec l'utilisation de nanofibres de CHT mimant la MEC du cartilage articulaire. La technique d'électrospinning a été employée en utilisant un mélange de CHT et de polyéthylène oxide (PEO). Les nanofibres avaient une épaisseur de 100 nm mimant les fibres de collagène du cartilage articulaire humain. Dans cette étude, un réticulant d'origine naturelle (génipine) a été rajouté, afin d'apporter plus de stabilité et d'augmenter les propriétés mécaniques du CHT. L'indentation par AFM a montré que la réticulation du scaffold CHT/PEO avec 1% de génipine confère une rigidité similaire à la zone superficielle du cartilage (600 ± 150 kPa) et favorise la prolifération cellulaire ainsi que la production de la MEC. En revanche, une concentration de 1,5% en génipine augmente la rigidité (1854 ± 483 kPa) mais limite l'activité métabolique des chondrocytes en rendant le scaffold non dégradable⁵⁷.

4.3.3.2. Les scaffolds à base de polymères naturels

Ces biomatériaux sont biocompatibles et non toxiques pour les cellules. Structurellement, ils peuvent mimer la MEC du cartilage et offrent un environnement favorable à la prolifération des chondrocytes mais également maintiennent le phénotype de ces cellules. Les polymères naturels restent les biomatériaux les plus largement utilisés pour leur diversité et leur capacité à reproduire la MEC d'un tissu³.

Le collagène est le principal biomatériau utilisé dans les différentes stratégies de reconstruction du cartilage, car il est le composant principal de la MEC. Néanmoins, ce matériau présente des insuffisances sur le plan mécanique et ne permet pas de soutenir la formation du cartilage hyalin, entraînant la formation d'un tissu fibrocartilagineux⁵⁸. D'autres polymères naturels couramment utilisés pour l'ingénierie du cartilage articulaire sont présentés dans le tableau 4.

Tableau 4 : Principaux polymères naturels utilisés pour l'ingénierie du cartilage articulaire

Polymères naturels	Origine	Avantages	Inconvénients	Références
Alginate	Polysaccharide anionique obtenu à partir d'algues brunes, ou de bactéries.	Biodégradable, hydrophile, Injectable, réticulable par les ions Ca ²⁺ et faible toxicité.	Faible résistance mécanique, risque de réponse immunitaire.	<i>Nastaran Shojarazavi et al. 2021</i> ⁵⁹
Agarose	Polysaccharide non chargé, retrouvé au niveau des algues rouges.	Hydrogel à base d'agarose permet l'encapsulation des chondrocytes, Maintient le phénotype des chondrocytes.	Faible adhésion cellulaire et propriétés mécaniques limités.	<i>Hani A Awad et al. 2004</i> ⁶⁰
Hyaluronate de sodium	Polysaccharide anionique GAG le plus abondant du cartilage.	Composant essentiel de la MEC du cartilage, sur le plan biologique et physicochimique.	Dégradation rapide et faible propriété mécaniques.	<i>Giroto, D et al. 2003</i> ⁶¹
Collagène type I	Protéine retrouvée au niveau des tissus conjonctifs	Stimule la sécrétion de la MEC et biocompatibilité	Dédifférenciation des chondrocytes	<i>Vincent Irawan et al. 2018</i> ⁶²
Collagène type II	Protéine la plus abondante de la MEC du cartilage.	Préservation du phénotype des chondrocytes, interactions cellulaires favorables.	Cout élevé, production difficile, faible propriété mécanique.	
Chitosan	Polysaccharide cationique dérivé de la chitine.	Biocompatible, propriétés antibactériennes. Structure similaire au GAG du cartilage.	Faibles propriétés mécaniques.	<i>Francis Suh et al. 2000</i> ⁶³
Sulfate de Chondroïtine	GAG sulfaté Présent au niveau cartilage.	Modulation de l'inflammation, rôle dans la signalisation cellulaire.	Dégradation rapide et faibles propriétés mécaniques.	<i>F. Zhou et al. 2017</i> ⁶⁴
Fibroïne de soie	Protéine fibreuse naturelle, biocompatible	Présente de très bonnes propriétés mécaniques, et facilite l'adhésion et la prolifération cellulaire.	Biomatériau hydrophobe et fragile.	<i>G. Cheng et al. 2018</i> ⁶⁵

5. Le chitosan dans la régénération cartilagineuse

La régénération du tissu cartilagineux vise à remplacer un tissu endommagé par un tissu ayant des caractéristiques similaires au tissu natif. Pour ce faire, un support biocompatible et biodégradable avec une structure tridimensionnelle est utilisé en combinaison à des cellules et / ou à des facteurs de croissance ou stimuli physiques. L'organisation structurale de l'échafaudage joue un rôle important dans la croissance et la prolifération cellulaire, favorisant la synthèse des différents éléments de la MEC afin de produire un tissu fonctionnel qui s'intègre parfaitement au tissu environnant. La MEC du cartilage articulaire fournit un microenvironnement aux cellules afin de maintenir l'homéostasie du tissu et de préserver le phénotype cellulaire. Parmi les différents composants de la MEC, on retrouve l'HA qui est l'un des principaux GAGs de la matrice du cartilage. Il peut également influencer l'activité des chondrocytes en activant une voie de signalisation conduisant à améliorer la fonction cellulaire. L'HA est un polymère chargé négativement et lorsque il est utilisé en grande concentration dans un scaffold, il pourrait réduire l'adhésion cellulaire car les membranes cellulaires sont chargées négativement et l'adhésion est réalisée avec les surfaces chargées positivement ⁶⁶. Plusieurs approches utilisant les GAGs ou leur analogue comme composant du scaffold pour l'ingénierie du cartilage ont été décrits dans la littérature. Le CHT présente une similarité aux GAGs sur le plan structurel. A. Subramanian *et al.*⁶⁷ ont montré que ce polymère favoriserait la chondrogenèse et la biosynthèse des marqueurs associés à l'activité métaboliques des chondrocytes. De plus, le contrôle des propriétés mécaniques du CHT par réticulation chimique permet d'augmenter la rigidité des supports. Ceci permet aussi d'augmenter l'adhésion et la prolifération des chondrocytes et préserver la morphologie cellulaire par rapport au support non réticulé ⁶⁷. L. Ping Yan *et al.* ont étudié la réticulation d'un support poreux de CHT / collagène par la génipine et ont montré une amélioration des propriétés physicochimiques et mécaniques par DMA sans affecter la viabilité des chondrocytes ⁶⁸. Dans une étude menée *in vivo*, Lu *et al.* a mis en évidence l'intérêt de l'injection de solutions de CHT dans l'articulation du genou chez le rat, en observant une augmentation de la densité des chondrocytes articulaires. Cette bioactivité est liée à la présence de groupes N-acétylglucosamine sur la chaîne du CHT, capables d'interagir spécifiquement avec certains récepteurs cellulaires, protéines d'adhésion et facteurs de croissance ⁶⁹.

5.1. Le chitosan

Le CHT est un polysaccharide provenant de la désacétylation partielle de la chitine présente au niveau des exosquelettes des crustacés. Ce polymère naturel est le plus abondant dans la biomasse après la cellulose, il présente un poids moléculaire compris entre 50 kDa et 2000 kDa ⁷⁰. Le CHT est structurellement composé de résidus de glucosamine et de N-acétyl-

glucosamine, reliées par des liaisons covalentes glycosidiques de type β -1 \rightarrow 4⁷⁰. Le rapport glucosamines / (glucosamines + N-acétyl-glucosamine) définit le degré de désacétylation (DD) du CHT, celui-ci peut varier entre 30 et 98%, contrairement à la chitine qui présente un degré de désacétylation faible qui la rend insoluble⁷¹.

Le CHT est biocompatible et biodégradable, non mutagène, présente une activité antibactérienne, et se distingue par ses propriétés intrinsèques qui font de lui un matériau de choix pour la réparation et la régénération tissulaire. En effet, le CHT contient des fonctions amines qui, en milieu acide, se chargent positivement, permettant ainsi des interactions électrostatiques avec divers composants de la MEC tels que les GAGs (HA par exemple), les protéoglycanes, l'héparine ou encore les groupements phosphates des nucléotides de l'ADN et de l'ARN⁷¹. D'autre part, ces fonctions amines présentent aussi une réactivité vis-à-vis des époxydes, des dérivés d'acides carboxyliques, des halogénures, et des aldéhydes.

De par ses propriétés, le CHT a suscité un intérêt particulier dans le domaine biomédical. Il présente de multiples applications dans les stratégies d'ingénierie et de réparation tissulaire comme la régénération osseuse, cartilagineuse, cardiaque, dentaire, nerveuse ou encore la régénération des tissus de la peau (figure 2)⁷². Le CHT présente des propriétés biologiques intrinsèques très intéressantes, comme des propriétés mucoadhesives⁷³, anti-inflammatoires⁷⁴, antioxydant⁷⁵, antimicrobien⁷⁶, antifongique⁷⁷, cicatrisante⁷⁸, antitumoral⁷⁹ et anti hyperglycémique⁸⁰.

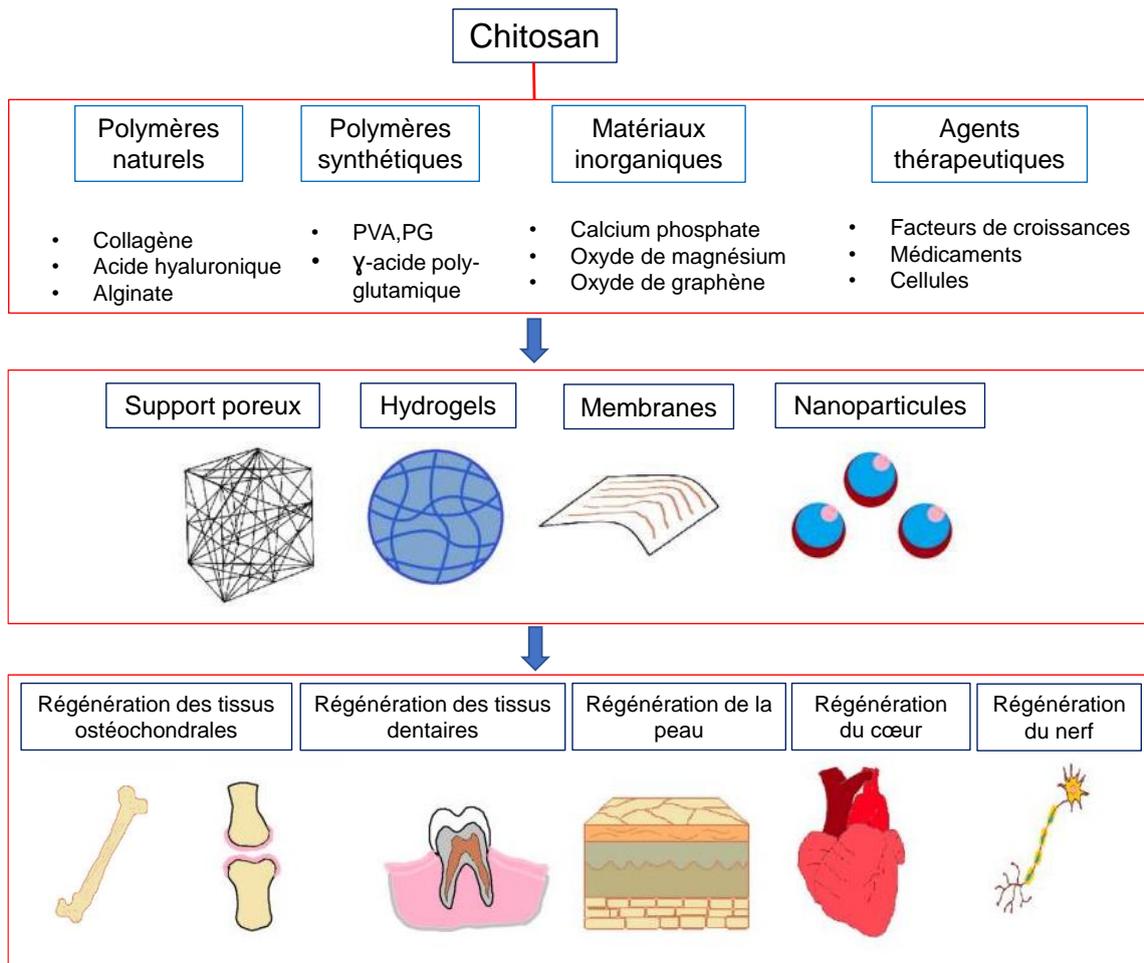


Figure 2 : Illustration des différentes associations, formes et applications du CHT dans le domaine de l'ingénierie tissulaire selon Y. Kim *et al.*⁷²

Plusieurs paramètres peuvent influencer la solubilité du CHT tels que la masse molaire, le degré de désacétylation, le pH, la température, et la cristallinité du polymère⁸¹. Le CHT est solubilisé dans un milieu à pH acide inférieur à 6, cela implique la protonation des groupes amines⁸², la valeur du pKa est d'environ de 6,5⁸¹. La masse molaire ainsi que le DD influencent considérablement la solubilité du CHT, ses propriétés mécaniques ainsi que sa dégradation. Un DD élevé augmente la cristallinité du matériau et ainsi ralentit sa dégradation dans un milieu enzymatique, en raison d'une réduction des groupes acétyles^{83,84}. H. Zhang *et al.* ont montré qu'une masse molaire élevée contribuait à accroître la résistance à la dégradation du CHT⁸⁵.

Le DD affecte la réponse biologique du CHT. S. Tigli *et al.* ont montré qu'une augmentation du degré de désacétylation du CHT renforce les interactions électrostatiques avec les membranes cellulaires, favorisant ainsi l'adhésion cellulaire⁸⁴. Sur le plan chimique, le CHT présente des groupements fonctionnels permettant de le modifier pour obtenir les propriétés souhaitées, notamment avec les groupes amine primaire (-NH₂) en position C₂, hydroxyles primaire (-OH) en position C₆ et secondaire en position C₃ et plus difficilement avec les liaisons

glycosidiques et les groupes acétamides ⁸¹. Les 3 principaux groupes fonctionnels du CHT sont classés comme suit : 1) C₂-NH₂ 2) C₆-OH 3) C₃-OH ⁷⁰. La modification par carboxylation du CHT consiste à introduire des groupes carboxyles dans la structure chimique du CHT. La réaction peut se produire avec les groupes hydroxyles ou amines ou les deux en même temps. Les réactifs les plus utilisés sont l'acide glyoxylique ou l'acide chloro-acétique. Dans le cas de l'acide glyoxylique, cela entraîne l'oxydation des groupes hydroxyles du CHT en groupements carboxyles. Dans le cas de l'acide chloro-acétique, la réaction se produit par les groupes NH₂ (C₂ et C₆) entraînant la formation de N,O carboxymethyl CHT⁷⁰. L'intérêt d'introduire des groupes carboxyles est d'améliorer les propriétés antibactériennes, la solubilité et la biocompatibilité du CHT par un contrôle des propriétés physico chimiques du CHT⁷⁰. Le CHT carboxylé est utilisé dans le domaine médical, en agriculture et pour l'hygiène ⁷⁰.

Un autre procédé de modification chimique du CHT est la synthèse du N-Alkyl CHT (NA-CHT) par réaction de réduction. En présence d'un aldéhyde, une réaction de Schiff au niveau des amines primaires du CHT produit le NA-CHT en condition acide et à température ambiante.

5.1.1. Mécanismes de dégradation du CHT

Selon J.A Jennings *et al.*, il existe plusieurs mécanismes de dégradation du CHT dans le corps humain. Le mécanisme de dégradation physique repose sur le gonflement et la dissolution, tandis que le mécanisme de dégradation chimique implique des processus de dépolymérisation, oxydation, et hydrolyse (enzymatique ou non enzymatique) ⁸⁶.

5.1.1.1. Dégradation enzymatique

La dégradation par le lysozyme est le principal mécanisme de dégradation du CHT *in vivo*. Il cible les unités acétylées et agit en dégradant les liaisons glycosidiques β (1 → 4) entre les unités polysaccharides du CHT. Ce processus génère des oligosaccharides de tailles variées. En conditions physiologiques, la concentration du lysozyme varie entre 1 et 14 µg/mL. Cependant, lors de situations pathologiques, cette concentration augmente en raison de la sécrétion élevée par les macrophages et les neutrophiles. En outre, lorsque le degré de désacétylation (DD) est supérieur à 85%, la dégradation se fait lentement, et le matériau peut rester dans l'organisme pendant plusieurs mois. D'autres enzymes tels que la chitosanase agit par un clivage partiel des unités désacétylées dans les chaînes polysaccharidiques du CHT ⁸⁶⁻⁹⁰.

5.1.1.2. Dégradation hydrolytique

Ce processus est caractérisé par la rupture des liaisons glycosidiques. Il est relativement lent et dépend du degré de désacétylation et du poids moléculaire, et dans certain cas du pH de la solution, En effet, en condition acide, la dégradation par ce mécanisme est plus prononcée

lorsque l'hydrogel à base de CHT est faiblement réticulé, ou lorsque le complexe de polyélectrolytes présente de faibles interactions ⁸⁶.

5.1.1.3. Dégradation oxydative

Ce mécanisme est peu fréquent dans le corps humain. Il peut se produire localement, en raison des espèces réactives d'oxygène (comme le peroxyde d'hydrogène) produites par les macrophages. Il peut également être induit par irradiation lors de la stérilisation par rayonnement gamma. Cette dégradation entraîne une dépolymérisation ou une ouverture de cycle dans la structure chimique du CHT ⁸⁶.

5.2. Les hydrogels à base de CHT

Les hydrogels sont très utilisés pour la restauration du tissu cartilagineux¹⁹. Ils sont constitués essentiellement d'eau et de chaînes polymères enchevêtrées en interaction par des liaisons ioniques, hydrophobes et hydrogènes formant des hydrogels physiques. Elles peuvent également être reliées entre elles via des liaisons covalentes par réaction avec des agents réticulants, ou par réaction entre les fonctions chimiques respectives de chacun, formant des hydrogels chimiques (figure 3). Dans ce paragraphe, nous allons nous focaliser sur différentes possibilités recensées à travers la littérature sur la préparation d'hydrogels de CHT.

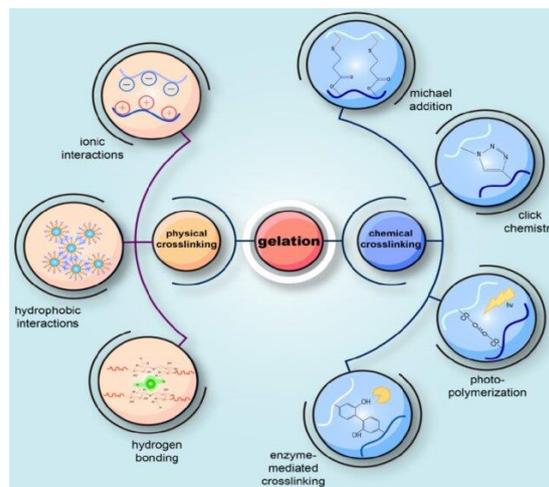


Figure 3 : Représentation des différentes stratégies d'obtention d'hydrogels physiques et chimiques selon J.Wu et al.¹⁹

Différentes réticulations des hydrogels de CHT ont été décrites dans la littérature, impliquant la formation de gels de CHT par réticulation chimique ou physique. L'organisation des chaînes polymères au sein d'un hydrogel peut donner lieu à plusieurs réseaux. Selon J. Berger et al.⁹¹ les hydrogels de CHT peuvent être réticulés selon 3 méthodes : la réticulation du CHT sur lui-même, la mise en place d'un réseau de polymères hybrides (hybrid polymer network) et enfin la formation d'un réseau de polymères semi- interpénétré (Semi interpenetrating polymer networks) où entièrement interpénétré (full interpenetrating polymer networks) ⁹¹.

- Réseau de polymères interpénétrés : Deux réseaux où plus de polymères réticulés sont interconnectés d'une façon non covalente (Figure 4B) ⁹²,
- Réseau de polymères semi-interpénétrés : Les chaînes du second polymère sont disposées librement dans le réseau du premier polymère réticulé (Figure 4C) ⁹¹,
- La réticulation par la mise en place dans un réseau hybride de polymères intervient entre l'unité structurale du CHT et l'unité structurale d'une chaîne d'un autre polymère (Figure 4D) ⁹¹.

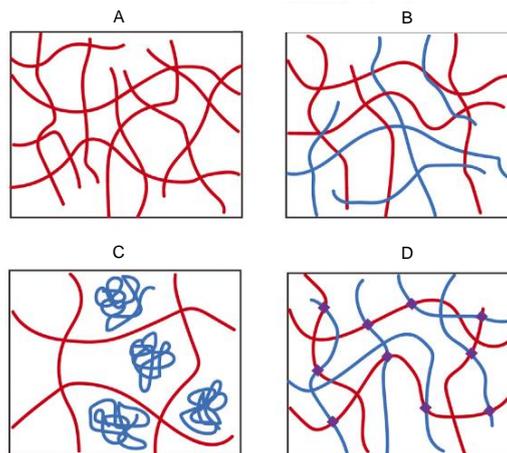


Figure 4 : Schéma des différents réseaux que peut prendre un hydrogel de CHT selon S.Zhu *et al.* ⁹² A) hydrogel simple, B) hydrogel avec un réseau de polymères interpénétrés (IPN), C) hydrogel avec un réseau de polymères semi-interpénétrés (Semi-IPN), D) Hydrogel avec un réseau de polymères hybride (HPN) ^{91,92}.

G. Guo *et al.* ont étudié l'utilisation d'un hydrogel avec un réseau de polymères semi-interpénétrés à base de CHT réticulé avec de l'acide citrique après traitement thermique (140°C, 1h). Un second polymère a été utilisé ; le poly vinyl alcool (PVA) réticulé physiquement. L'objectif était de construire un scaffold avec une structure similaire à l'os sous chondral avec des propriétés mécaniques se rapprochant du cartilage. L'hydrogel a présenté une microstructure avec des micro-canaux interconnectés présentant des pores supérieurs à 56 µm de diamètre similaire à ceux de l'os sous chondral. De plus, ces micro-canaux étaient suffisamment larges pour permettre la migration des cellules osseuses mésenchymateuses, ainsi que les chondrocytes ⁹³. Les auteurs ont également mis en évidence l'importance des propriétés mécaniques du scaffold pour mimer le comportement mécanique du cartilage mais également maintenir l'intégrité du scaffold. D'après les auteurs, l'hydrogel a présenté un module d'Young de 0,26 MPa, très similaire à celui de la MEC du cartilage natif (0,3 MPa), tout en étant capable de se déformer jusqu'à 85%. De plus, cet hydrogel était capable de préserver sa structure après stérilisation à l'oxyde d'éthylène sans que cela puisse modifier son comportement mécanique ou altérer son intégrité ⁹³.

5.2.1. Hydrogels physiques de CHT

La formation d'un hydrogel physique de CHT est obtenue par les interactions acide-base avec des polyacides organiques ou minéraux ou avec d'autres polymères par des interactions hydrophobes, hydrogènes ou ioniques (anions ou complexes de polyélectrolytes) ⁹⁴. Le tableau 5 résume les principales méthodes de réticulation physique pour la formation d'hydrogels physiques de CHT.

Tableau 5 : Les principales interactions pour la formation d'un hydrogel physique du CHT

Réticulation	Principe	Exemple	Référence
Ionique	Interactions entre les groupes cationiques du CHT et les groupes anionique du réticulant.	CHT-tripolyphosphate (TPP)	R. Rodriguez <i>et al.</i> 2020 ⁹⁵
		β -glycerophosphate (GB)	A.Chenite <i>et al.</i> 2000 ⁹⁶
Interactions hydrophobes et hydrogènes	Production d'un hydrogel de CHT par ajout d'un agent de coacervation basique provoquant la neutralisation de la densité des amines chargés, réduit la répulsion entre les chaines polymères et entraînant la formation des interactions hydrophobes et des liaisons hydrogènes.	L'hydroxyde de sodium (NaOH) / urée	J. Nie <i>et al.</i> 2016 ⁹⁷ M L Pita-Lopez <i>et al.</i> 2021 ⁹⁴
		Le bicarbonate de sodium	L. Liu <i>et al.</i> 2011 ⁹⁸
		L'ammoniac	A.Montembault <i>et al.</i> 2005 ⁹⁹
Complexes de polyélectrolytes	Formation d'interactions électrostatiques entre des poly-électrolytes de charges opposées. Il est utilisé dans plusieurs domaines d'applications, exemple dans l'industrie pharmaceutique comme revêtement.	CHT-HA	V S. Meka <i>et al.</i> 2017 ¹⁰⁰ C. Correia <i>et al.</i> ⁶⁶ S. Escalante <i>et al.</i> ¹⁰¹
		CHT-chondroïtine sulfate	S.Sharma <i>et al.</i> ¹⁰²
		CHT-carboxyméthylcellulose	J. O. Echavarría <i>et al.</i> ¹⁰³
		CHT-pectine	M.Marudova <i>et al.</i> ¹⁰⁴
		CHT-alginate	K.Baysal <i>et al.</i> ¹⁰⁵
		ICTH-carraghénane	T.Khaliq <i>et al.</i> ¹⁰⁶

Les complexes de poly-électrolytes formés par les interactions électrostatiques du CHT avec des polymères chargés négativement (exemple : alginate, HA), peuvent prendre plusieurs formes comme des nano microparticules, des hydrogels, des films (layer-by-layer) ou encore des cryogels. Ces complexes formés avec le CHT ont des applications biomédicales et pharmaceutiques, tel que l'administration de médicament par vectorisation pour les systèmes d'administration de gènes et enfin dans le domaine de l'ingénierie tissulaire ¹⁰⁷. Plusieurs stratégies associant le CHT à l'HA pour la formation d'un hydrogel physique injectable en ingénierie du tissu cartilagineux ont été employées ¹⁰⁸⁻¹¹⁰, Ces hydrogels ont démontré une efficacité biologique, cependant, une concentration élevée d'HA peut compromettre les performances mécaniques du scaffold. Cette limitation est principalement liée à l'hydrophilie élevée de l'HA, qui entraîne une dégradation de ses propriétés mécaniques ⁶⁶.

C R. Correia *et al.* ont préparé des hydrogels lyophilisés à base de CHT:HA en faisant varier les concentrations d'HA, les ratios de CHT:HA sont de 100/0, 99/1, 95/5, 90/10. L'objectif était d'évaluer l'influence de l'HA sur les propriétés mécaniques et biologiques du support CHT/HA⁶⁶. Les résultats ont montré que les compositions contenant 1% et 5% d'HA (99/1, 95/5) avaient un module de compression proche (2,43 et 2,3 kPa), en raison de leur porosité très similaire, contrairement à la formulation avec 10% d'HA (90/10), où une diminution du module de compression était observée (1,21 ± 0,47 kPa). Sur le plan biologique, l'évaluation *in vitro* de la prolifération cellulaire et de la synthèse des composants de la matrice cartilagineuse a révélé la formation d'une MEC constituée de GAGs et de collagène, après 35 jours de culture. Ce phénomène a été observé spécifiquement dans les formulations contenant 1% d'HA. Par ailleurs, la formulation avec 5% d'HA a démontré une capacité à favoriser la différenciation des chondrocytes en comparaison avec la formulation contenant uniquement du CHT.

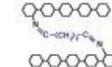
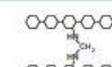
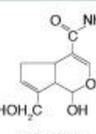
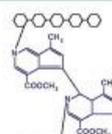
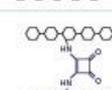
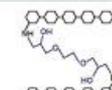
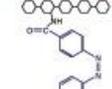
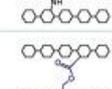
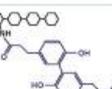
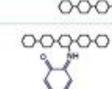
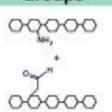
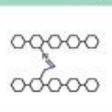
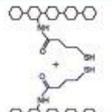
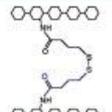
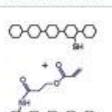
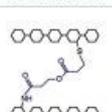
Cette étude a montré que l'incorporation de l'HA influence positivement les propriétés physicochimiques du scaffold CHT:HA lorsque la quantité d'HA utilisée ne dépasse pas les 5%. De plus, il a montré un rôle important dans la régulation de la réponse biologique et la formation des différents éléments de la MEC, ces derniers sont essentiels à la constitution d'un tissu cartilagineux. Dans une autre étude, S. Escalante *et al.* proposent l'utilisation des hydrogels interpénétrés de CHT:HA contenant du sulfate de chondroïtine (CS). L'objectif est de permettre une meilleure stabilisation du caillot sanguin obtenu par la technique chirurgicale de microfracture, et ce grâce aux propriétés mucoadhésives et hémostatiques du CHT et du CS ¹⁰¹. Une analyse des propriétés viscoélastiques a été réalisée par DMA après le gonflement des éponges dans l'eau. Les résultats ont montré des valeurs du module d'Young compris entre 0,5 et 0,8 MPa, en comparaison de celui du cartilage natif (1 MPa pour un cartilage

immature, 5 à 16 MPa pour un cartilage mature). Selon les auteurs, ces valeurs permettent de supporter la formation d'un nouveau tissu dans un défaut de cartilage quand ce dernier est en complément d'un traitement par microfracture¹⁰¹. *S.Perni et al.* ont également mesuré les paramètres viscoélastiques (G' , G'') du cartilage articulaire bovin par rhéologie. Les résultats ont montré des valeurs de G' et G'' comprises entre 0,1 à 0,5 MPa voire 1 MPa¹¹¹. Sur le plan biologique, les scaffolds CHT:HA:CS ont démontré un effet pro-chondrogénique à travers la différenciation des CSM et la production de marqueurs Sox 9 et de protéoglycanes. Elle est toutefois plus importante pour les scaffolds CHT/HA/CS et CHT/HA, en comparaison avec le CHT seul¹⁰¹.

5.2.2. Hydrogels chimiques de CHT

La structure chimique du CHT, riche en groupes hydroxyles et surtout en fonctions amines, lui confère une grande réactivité et permet une diversité de stratégies de réticulation. Ces fonctions peuvent interagir avec de petites molécules bifonctionnelles ou d'autres polymères, par des voies chimiques classiques, enzymatiques, ou même photochimiques, offrant ainsi une large gamme d'applications. Dans une logique d'optimisation des matériaux à base de CHT, la réticulation joue un rôle central pour moduler et contrôler les propriétés mécaniques des structures obtenues. Cette section s'intéressera plus particulièrement aux principales voies de réticulation chimique du CHT, mettant l'accent sur l'utilisation d'agents moléculaires chimiques ainsi que les polysaccharides dialdéhydes. Elle présentera également un aperçu des travaux réalisés au sein du laboratoire U1008/UMET sur les hydrogels et les éponges à base de CHT. Les principales voies de réticulation du CHT avec des petites molécules bifonctionnelles, réactions photochimiques, enzymatiques et les réactions avec d'autres polymères sont résumés dans le tableau 6.

Tableau 6 : Les principaux agents réticulant du CHT : petite molécules, enzymes, composé photosensible, réaction polymère- polymère ¹¹²

	Agent	Target Functional Groups	Reaction Conditions	Cross-linkage	Comments
Small Molecule	 Glutaraldehyde	Primary amines & aldehydes	Reaction favors basic & neutral pH		Reaction completes within 1 h; Difficult to remove trace glutaraldehyde
	 Formaldehyde	Primary amines & aldehydes	Basic & neutral pH		Reaction completes within 1 h; Difficult to remove trace formaldehyde
	 Genepin	Primary amines & aldehydes	Independent of pH		Nontoxic linker; Can undergo self polymerization
	 Diethyl Squarate (DES)	Primary amines	pH 4.5-5.5; Solution precipitates at higher pH; Reaction favors elevated temperatures		Reacts under mild conditions & is nontoxic; Long reaction time precludes use for in situ gelation
	 Ethylene glycol diglycidyl ether (EGDE)	Primary amines and oxiranes	Basic pH; Reaction favors elevated temperatures		Difficult to remove EDGE traces; Long reaction times & basic pH can yield hydrogel beads
	 Blocked Diisocyanate	Primary amines	Basic pH; Reaction requires elevated temperatures		Long reaction times & basic pH requirements preclude in situ gelation; Can produce hydrogel beads
Photo-Sensitive	 Functional azides	Primary amines	Independent of pH		Multi step crosslinker; Suitable for injectable hydrogel preparation
	 Functional acrylates	Other acrylic acids	Independent of pH		Multi step crosslinker; Suitable for injectable hydrogel preparation
Enzymatic	 Phloretic acid	Primary amines	Physiological pH		Fast gelation; Suitable for in situ gelation
	 Activated Quinone	Primary amines	pH 5.8-6 at 35°C		Gelation occurs under 2 hr; Suitable for in situ gelation
	Reaction	Reaction Conditions	Reactive Polymer Groups	Cross-linkage	Comments
Polymer-Polymer	Schiff Base Formation	Neutral pH			Good candidate for in situ gel formation; Hydrogel formation in around 10 min
	Disulfide Bonding	Neutral pH			Good candidate for in situ gel formation; Hydrogels have enhanced mucoadhesive properties
	Michael Addition	Weak base; Catalysts required			Good candidate for in situ gel formation; Hydrogels have enhanced mucoadhesive properties

5.2.2.1. Agents réticulants moléculaires

Plusieurs molécules chimiques ont été utilisées pour la réticulation du CHT (Tableau 6). L'utilisation de ces réticulants permet de contrôler les propriétés physico chimiques, mécaniques et biologiques des hydrogels de CHT. Cependant, la biocompatibilité de certains réticulants présente un risque de toxicité (glutaraldehyde, formaldéhyde) ¹¹². Pour limiter la toxicité des réticulants, l'utilisation de la génipine, un composé d'origine naturelle, biocompatible et peu cytotoxique par rapport au formaldéhyde, a été rapportée dans la littérature ¹¹³. Cette dernière interagit avec les tissus biologiques et les biopolymères contenant des groupements amines dans leur structure chimique. En tant que réticulant pour le CHT, la génipine améliore ses propriétés en réduisant son taux de dégradation. Toutefois, elle peut interférer avec les principes actifs, ce qui pourrait perturber le processus de gélification ^{112,114}. Des agents de couplages chimiques peuvent être utilisés pour induire une réaction de réticulation chimique, on cite l'exemple du N'-ethylcarbodiimide hydrochloride (EDC) et N-hydroxy-succinimide (NHS), epichlorohydrine, métaphosphate de sodium ou encore l'acide citrique ou bien l'acide tannique ^{115,116}. L'utilisation du formaldéhyde comme agent réticulant pour le CHT est largement rapporté dans la littérature (figure 5). En effet, selon A. Singh *et al.* ont montré que la réticulation des hydrogels de CHT par le formaldéhyde permet de moduler leur hydrophilie et leur capacité de rétention d'eau. En étudiant différentes concentrations de formaldéhyde, ils ont observé que le taux de gonflement des hydrogels diminuait lorsque la concentration de formaldéhyde augmentait. Ces résultats soulignent le rôle central du formaldéhyde dans la réticulation et la modification des propriétés des hydrogels de CHT ¹¹⁷.

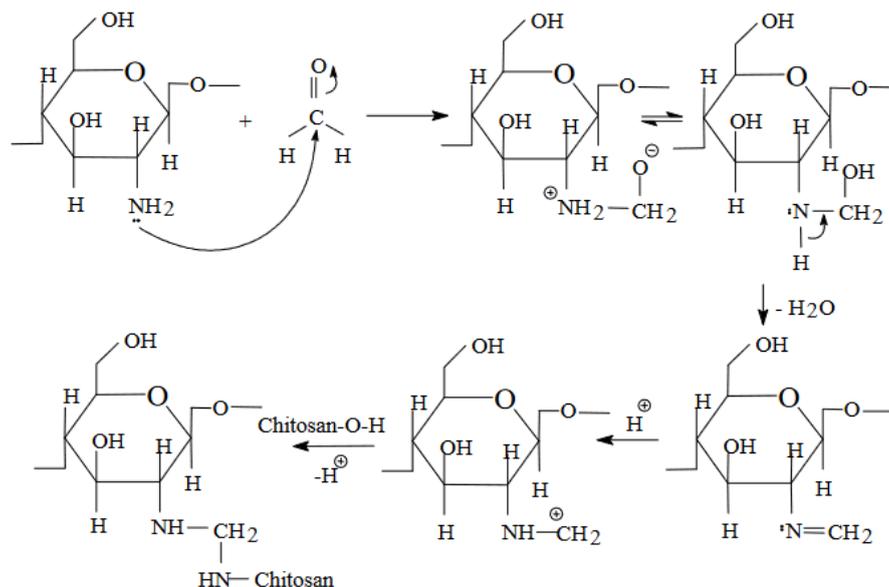


Figure 5 : Réaction de réticulation du CHT par le formaldéhyde selon Singh *et al.*¹¹⁷

Cependant, le formaldéhyde reste cancérigène, toxique, et très peu écologique ¹¹⁸, il est donc nécessaire d'explorer d'autres alternatives. L'utilisation de l'HMTA comme précurseur de formaldéhyde pourrait être une solution prometteuse. Selon A.M. Araghi *et al.* l'HMTA se distingue des autres précurseurs du formaldéhyde (le glyoxal ou le 1,3,5-trioxane) par sa capacité à former des gels stables et durables¹¹⁹. L'HMTA présente la propriété de se décomposer sous l'effet de la chaleur et de l'humidité, générant du formaldéhyde *in situ*. Ce mécanisme est déjà exploité dans la réticulation des résines phénoliques ou de polyacrylamides, mais à ce jour, aucune étude n'a exploré l'utilisation de cette réaction pour la réticulation du CHT.

L'HMTA est un composé organique de formule C₆H₁₂N₄, et présente une structure en cage. Il est soluble dans l'eau, le chloroforme, l'éthanol ainsi que d'autres solvants organiques, l'HMTA est synthétisé par la réaction du formaldéhyde à l'état aqueux ou gazeux avec de l'ammoniaque à l'état de gaz ou liquide selon la réaction chimique suivante¹²⁰ :



En milieu acide et sous l'effet de la température, l'HMTA se décompose en formaldéhyde et en ammoniaque¹²¹ (soit la réaction inverse de celle présentée ci-dessus) ; il peut ainsi être considéré comme un agent précurseur de formaldéhyde. Ce composé présente de nombreuses applications, en effet, il est utilisé comme accélérateur de durcissement des caoutchoucs, agent de polymérisation pour les résines thermodurcissables, stabilisateur chimique, pesticide, fongicide. Il est également utilisé dans la production d'adhésifs et de revêtements et la production d'explosifs et comme retardateur de flammes¹²⁰. L'HMTA est utilisé en cosmétique comme agent ayant une activité biocide, il est utilisé également pour le traitement des infections intestinales. L'HMTA a été approuvé par la FDA pour une utilisation dans l'industrie alimentaire, dans le domaine pharmaceutique.

5.2.2.2. Réticulation du CHT avec des polysaccharides dialdéhydes

A travers la littérature et comme souligné ci-dessus, le CHT présente une excellente réactivité vis-à-vis des composés aldéhydiques. Cependant ces agents réticulants sont potentiellement toxiques. Une solution a émergé avec l'utilisation de polysaccharides oxydés par le periodate pour générer des fonctions aldéhydes (au moins partiellement) sur les unités de répétitions. Ainsi on retrouve dans la littérature le xanthane¹²², le chitosan¹²³, l'amidon¹²⁴, la cyclodextrine¹²⁵ ou la dextrine¹²⁶ ainsi modifiés, utilisés pour l'obtention de différents matériaux (hydrogels, films, éponges etc.). L'oxydation des fonctions OH en positions 2 et 3 du cycle saccharidique conduit à un dialdéhyde porté dans l'unité de répétition. La figure 6 donne différents exemples de dérivés dialdéhydes de polysaccharides. Ces composés mélangés au

CHT provoquent sa réticulation par formation de bases de Schiff comme représenté dans la figure 7.

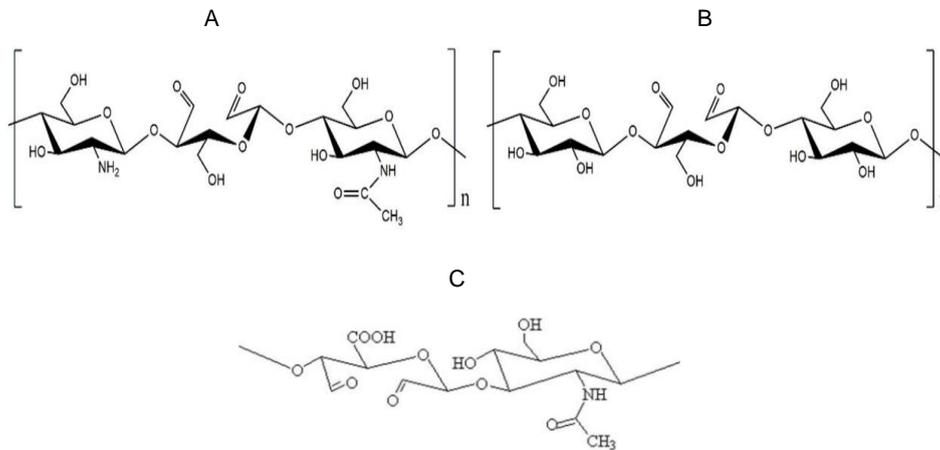


Figure 6 : Formules du CHT dialdéhyde (A), l'amidon dialdéhyde (B) et de l'HA dialdéhyde (C) ^{123,127}

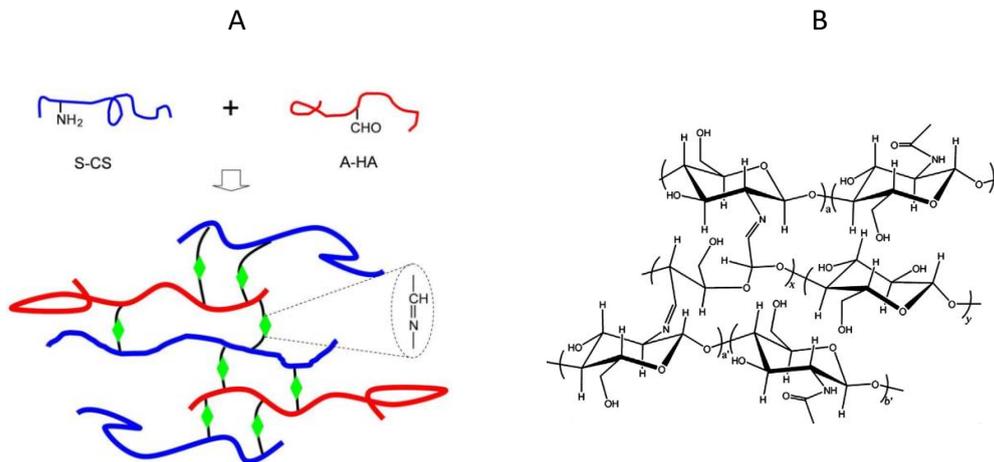


Figure 7 : (A) Principe de la réaction de réticulation entre le S-CHT et le HA dialdéhyde, (B) réaction de réticulation du CHT avec la dextrine oxydée ^{126,127}

Les chercheurs dans le domaine des hydrogels à base de polysaccharides ont exploré diverses méthodes de réticulation pour améliorer les propriétés physico-chimiques et mécaniques de ces matériaux, tout en garantissant leur biocompatibilité. Dans cette optique, H. Tan *et al.* ont préparé un hydrogel injectable à base de polysaccharides contenant des chondrocytes d'origine bovine avec pour objectif d'induire la formation d'un tissu cartilagineux. Pour ce faire, une modification de la structure chimique de l'HA a été réalisée après oxydation au periodate de sodium (NaIO₄). La réaction avec les fonctions amines du N-succinyl-CHT (S-CHT) permet de former des bases de Schiff (-C=N-). Cette réticulation chimique a permis d'améliorer les propriétés physico-chimiques et mécaniques de l'hydrogel HA /S-CHT et d'obtenir une viabilité cellulaire de plus de 93% ¹²⁷. Dans une autre étude, L. Weng *et al.* ont utilisé une dextrine oxydée afin d'étudier le processus de gélification des hydrogels à base de

N-carboxyethyl-CHT. La réticulation d'une solution de N- carboxyethyl-CHT a été confirmée par rhéologie ¹²⁸. G. Gomez-Mascaraque *et al.* ont développé un hydrogel à base de CHT et d'agarose, réticulé à l'aide d'une dextrine oxydée. Ils ont étudié l'impact du degré d'oxydation de la dextrine sur les propriétés physiques et mécaniques du réseau réticulé. Les résultats ont révélé que le degré d'oxydation influençait significativement les caractéristiques mécaniques de l'hydrogel CHT / agarose. L'utilisation de ce réticulant présente l'avantage d'être moins cytotoxique, ce qui en fait une alternative intéressante pour des applications en ingénierie tissulaire ¹²⁶. Plus récemment, l'utilisation de l'amidon dialdéhyde a été rapporté comme agent de réticulation chimique du CHT et du collagène. Selon Kaczmarek *et al.* les produits de cette réaction ne sont pas cytotoxiques et ne modifient pas la réponse cellulaire, l'amidon dialdéhyde a été utilisé afin de réticuler et modifier les propriétés des éponges composées de CHT/ collagène / HA. L'analyse IRTF a montré la présence d'un pic d'absorption à 1553 cm^{-1} correspondant selon l'auteur à la liaison C=N validant la réaction. De plus, l'augmentation de la concentration du réticulant entraîne l'augmentation de la porosité du scaffold. Sur le plan mécanique, la réticulation avec l'amidon dialdéhyde a significativement amélioré le module de compression des éponges de CHT / COL / HA, et un effet synergique a été observé avec l'utilisation du phosphate de calcium ¹²⁹. K.W Drzymalska *et al.* proposent la préparation de films de CHT réticulés par le CHT dialdéhyde en comparaison avec l'amidon dialdéhyde et le glutaraldéhyde¹²³. L'amidon dialdéhyde et le CHT dialdéhyde sont synthétisés par oxydation au periodate de sodium. Le CHT et les deux composés dialdéhydes sont ensuite mélangés pour former des hydrogels chimiques par réaction entre les amines du CHT et les aldéhydes des deux composés. Trois concentrations de réticulant ont été testées (5%, 10% et 15%). Les auteurs ont noté la formation d'une base de Schiff d'après l'analyse infrarouge avec la présence d'un pic d'absorption correspondant à la liaison imine (1636 cm^{-1}). Sur le plan mécanique, les propriétés de résistance à la traction, le module d'Young et l'élongation à la rupture ont été étudiés. Le CHT réticulé avec le CHT dialdéhyde ou l'amidon dialdéhyde ont montré une augmentation des propriétés mécaniques. Le module d'Young du CHT ainsi réticulé était 3,5 fois supérieur à celui du CHT seul. En termes de cytotoxicité, le CHT réticulé avec l'amidon dialdéhyde ou le CHT dialdéhyde ne montrait pas de cytotoxicité comparativement à l'utilisation du glutaraldéhyde ¹²³.

6. Historique des hydrogels et éponges à base de CHT développés au laboratoire

Plusieurs études portant sur la conception d'hydrogels et de supports poreux à base de CHT ont été réalisés au sein de l'unité U1008 et de l'UMET.

Claudia Flores a évalué l'utilisation d'une éponge à base de CHT et de polymère de cyclodextrine (PCD) pour la libération contrôlée de CFX dans le traitement des infections osseuses. Elle a mis en œuvre une méthode de formulation innovante, aujourd'hui brevetée, ¹³⁰. Alice s'est intéressée à l'impact du ratio CHT/PCD et à l'effet d'un traitement thermique sur les performances des éponges, notamment pour la libération de la CFX et de la rifampicine, pour le traitement du pied diabétique. Ses travaux ont également mis en évidence la possibilité d'incorporer plusieurs antibiotiques et de moduler leur libération via l'ajustement de la porosité du matériau. L'ensemble de ces contributions a orienté et enrichi les recherches menées dans cette thèse, notamment en termes de formulation, et d'exploitation des molécules cages pour une libération contrôlée d'antibiotique ¹³¹. Carla Palomino Durand (2019) a développé pendant sa thèse des hydrogels injectables et des éponges à base de CHT et polymère de cyclodextrine (PCD). Le PCD comporte des fonctions carboxyliques associées au CHT et forme un complexe de polyélectrolytes pour des applications en ingénierie tissulaire osseuse a été exploré (figure 8). Ces éponges ont été réticulées par un traitement thermique à 160°C. Elles ont révélé une structure poreuse avec des pores interconnectés, présentant un gonflement limité dans le PBS, de plus, elles ont présenté une résistance à la dégradation enzymatique, avec une perte de masse de 12 % après 21 jours. Sur le plan mécanique, un module de compression de 256 kPa a été mesuré. En outre, ces éponges ont démontré une capacité de bio-fonctionnalisation, ainsi qu'une libération prolongée du facteur de croissance de l'endothélium vasculaire ¹³².

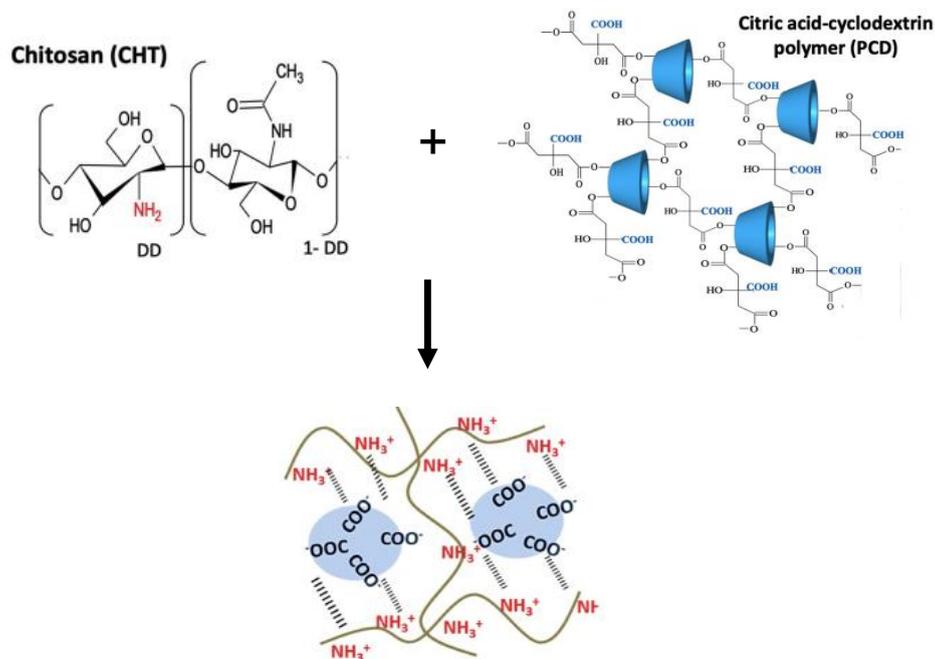


Figure 8 : représentations schématiques des structures chimiques chargées du CHT, polymère de cyclodextrine (PCD), ainsi que les interactions CHT/PCD ¹³³.

Maya Abdallah (travaux non publiés), a travaillé sur le développement d'un hydrogel physique injectable à base de CHT et d'HA pour la régénération du tissu adipeux. Combinant les avantages des deux polysaccharides, l'hydrogel CHT/HA peut être un candidat pour la régénération tissulaire. Le mélange des polymères forme un complexe de polyélectrolytes stabilisé par les interactions ioniques des deux polymères. Trois formulations d'hydrogels CHT/HA ont été testées : 3/1, 4/1 et 5/1. Les hydrogels étaient injectables et stables sous agitation dans le PBS à 37°C. L'analyse rhéologique a montré que pour toutes les formulations, un hydrogel élastique s'est formé ($G' > G''$), avec un écart entre G' et G'' plus marqué pour la formulation 5/1 en raison de sa plus forte teneur en CHT. En outre, ces résultats ont été confirmés par analyse mécanique dynamique (DMA), avec un module d'Young plus élevé pour les éponges ayant la formulation 5/1 (3500 Pa). De plus, le test de gonflement a révélé que la formulation 5/1 gonflait moins que les autres et le test de dégradation des hydrogels a montré une dégradation lente dans le PBS (37°C, 80 rpm) sur une durée d'un mois. Cependant, aucune des formulations, y compris la 5/1, n'a montré une résistance suffisante à la dégradation enzymatique. Une dégradation complète a été observée dans un milieu enzymatique (lysozyme) après 30 jours.

Dans notre projet de thèse, nous avons choisi de travailler avec le système CHT/HA en raison des nombreux avantages de ces deux polymères pour la régénération du tissu cartilagineux. Le HA possède des propriétés biologiques favorables à la régénération du cartilage articulaire. Ce polymère participe à la prolifération cellulaire, à la modulation de l'inflammation ainsi qu'à la réparation tissulaire. Par ailleurs, les hydrogels à base d'HA soutiennent la formation de la MEC par les chondrocytes et stimule la prolifération des CSMs. Selon I. L. Kim *et al.* l'HA est l'un des matériaux les plus utilisés en ingénierie du cartilage. De plus, Il est chargé négativement, ce qui favorise les interactions chimiques avec le CHT.

Le CHT se distingue par ses propriétés antibactériennes, sa biodégradabilité et son aptitude à soutenir l'adhésion cellulaire et sa capacité à être chargé positivement en milieu acide. L'association de ces deux polymères repose sur leur complémentarité, l'un recrée un environnement favorable aux cellules cartilagineuses, tandis que l'autre apporte soutien mécanique, ce qui en fait un choix stratégique. La formulation 5/1 a été retenue pour ses propriétés rhéologiques et biologiques intéressantes, toute fois un travail devait être mené pour moduler ses propriétés mécaniques et par conséquent avoir un impact sur les propriétés biologiques. Dans notre étude, 2 approches ont été testées ; la première a été de préparer un hydrogel physique à base de CHT et d'HA, et d'un précurseur de formaldéhyde l'HMTA, d'appliquer une étape de lyophilisation pour obtenir un matériaux poreux aéro-gel (ou éponge), suivi d'un traitement thermique pour provoquer la réticulation de l'éponge. La

seconde stratégie a été d'élaborer directement et en une étape un hydrogel chimique à partir de ces deux polymères additionnés d'une maltodextrine dialdéhyde (ou maltodextrine oxydée, MDo) qui provoque la réticulation chimique spontanée de cet hydrogel, suivie de l'étape de lyophilisation pour obtenir le second type de scaffold poreux. L'objectif de ces deux approches est de développer un scaffold combinant les avantages du CHT et de l'HA, tout en surmontant leurs limitations mécaniques. La réticulation du CHT par la MDo ou l'HMTA va permettre de renforcer ses propriétés mécaniques, de limiter son gonflement ainsi que sa dégradation en milieu enzymatique, tout en modulant sa capacité de libération de principes actif.

7.Synthèse bibliographique, objectifs de la thèse et cahier des charges

Différentes approches ont été employées, afin de reproduire la nature même du tissu cartilagineux et du tissu sous chondral, et cela passe par l'utilisation de biopolymère et/ou une protéine (ex : collagène, HA...), sous la forme d'un hydrogel injectable où de matériaux implantables (éponges, membranes, nanofibres...). Ces stratégies ont porté leurs fruits en induisant et supportant la formation d'un tissu cartilagineux, cependant, les caractéristiques mécaniques du tissu néoformé (cartilage fibreux) sont différentes du tissu natif (cartilage hyalin). En effet, ce dernier est riche en fibres de collagènes de type II dont les propriétés mécaniques sont supérieures aux fibres de collagène de type I. L'utilisation des biopolymères de CHT et d'HA revêt un intérêt particulier dans la stratégie d'ingénierie du cartilage. En effet, le CHT présente une structure chimique similaire aux GAG de la MEC du cartilage et il est l'un des rares biopolymères cationiques qui peut interagir avec les différents éléments de la MEC du cartilage chargés négativement. L'HA est également un autre biopolymère naturellement présent dans le MEC du cartilage, son utilisation est particulièrement intéressante dans la stratégie d'ingénierie du cartilage, favorisant la régénération de ce tissu. La formation d'un complexe de polyélectrolytes entre le CHT et le HA entraîne la formation d'un scaffold stabilisé pas des interactions électrostatiques réversibles. Cependant, ce système est limité en termes de propriétés mécaniques et nécessite de ce fait une réticulation chimique.

Cette thèse a pour objectif de développer un support poreux biocompatible à base de CHT et d'HA destiné à promouvoir la régénération du tissu cartilagineux. L'axe principal de ce travail consiste à optimiser les propriétés mécaniques des éponges de CHT:HA, tout en renforçant leur résistance à la dégradation enzymatique ainsi que leur stabilité en milieu aqueux. À cet effet, une réticulation chimique du CHT est réalisée, et l'impact de la réticulation chimique sera étudiée sur le système CHT:HA. Par ailleurs, une évaluation des capacités de libération de la CFX a été réalisée à partir des différentes formulations d'éponges. Cette analyse comparative

des cinétiques de libération permet de caractériser l'efficacité de chaque système à moduler la diffusion du principe actif. Le plan de cette thèse se présente en trois étapes principales. La première concerne l'étude des propriétés rhéologiques des hydrogels de CHT et de CHT:HA, en particulier l'impact de la réticulation chimique par la MDo sur leurs propriétés viscoélastiques. La deuxième étape vise à caractériser les propriétés physico-chimiques des éponges de CHT et CHT:HA incorporant de la MDo et l'HMTA sachant que dans le cas des éponges avec HMTA, la réticulation nécessite une activation thermique afin de provoquer la réticulation du CHT. Enfin, la troisième étape porte sur l'évaluation des propriétés mécaniques des éponges réticulées via l'analyse mécanique dynamique DMA, ainsi que l'analyse de leur capacité à libérer un principe actif et d'évaluer l'activité antibactérienne des milieux de libération et enfin l'analyse de l'innocuité biologique au contact avec les cellules MC3T3.

Le scaffold développé doit répondre à plusieurs critères fondamentaux. Il doit être biocompatible et présenter une biodégradation contrôlée, idéalement lente, le taux de dégradation doit correspondre au rythme de formation du tissu de remplacement. La formation d'une MEC d'un cartilage mature prend environ 8 semaines¹³⁴. Sa structure tridimensionnelle doit permettre une bonne adhésion, prolifération et différenciation cellulaire. De plus, une porosité adaptée, avec des pores dont la taille varie généralement entre 100 et 500 μm , est nécessaire pour favoriser la colonisation cellulaire, notamment des chondrocytes, tout en assurant des échanges nutritifs suffisants essentiels à la survie et au métabolisme des cellules. En ce qui concerne les propriétés mécaniques, le scaffold doit présenter un module idéalement proche du cartilage natif, généralement comprise entre 0,2 et 2 MPa, afin de soutenir la synthèse de la MEC et de maintenir le phénotype chondrogénique sur le long terme. Les propriétés de gonflement en milieu aqueux doivent également être optimisées pour permettre une diffusion contrôlée des agents thérapeutiques sans compromettre la stabilité mécanique du matériau par un gonflement excessif. Par ailleurs, le scaffold peut être chargé avec des facteurs de croissance tels que le TGF- β 3 ou des agents pro-chondrogéniques comme la kartogénine, afin de stimuler la régénération cartilagineuse. Dans une étude, la libération a été évaluée en utilisant la ciprofloxacine (CFX), un antibiotique choisi comme molécule de référence, pour analyser la cinétique de libération des différentes formulations d'éponges, en vue d'une application future à la délivrance de facteurs de croissance.

Partie 2 : Matériels et Méthodes

1. Produits

1.1. Le chitosan (CHT)

Le CHT est un polysaccharide composé d'unités D glucosamine et de N-acétyl- glucosamine reliées par les liaisons β (1 \rightarrow 4). Le CHT utilisé est fourni par Sigma-Aldrich© (Saint-Quentin Fallavier, France). Il est de haut poids moléculaire (395 KDa) et présente un DD de 76% (données fournies par le fabricant, numéro de lot : BCCG3724, réf. 419419).

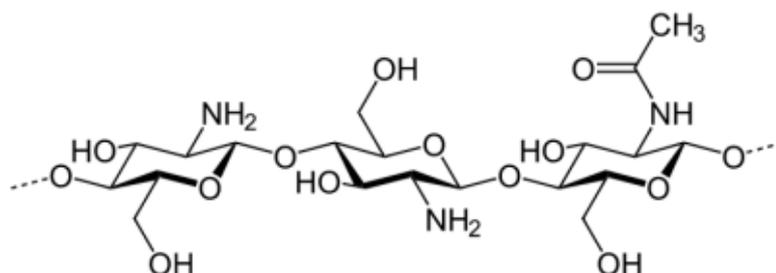


Figure 9 : Structure chimique du CHT (source image : www.vignevin.com)

1.2. L'acide hyaluronique (HA)

L'HA est un glycosaminoglycane anionique d'origine naturel. Il est composé d'unités de répétition d'acide D-glucuronique et N-acétylglucosamine. Dans notre cas, un sel de sodium d'HA (hyaluronate de sodium) a été utilisé (figure 10). Il se présente sous la forme d'une poudre d'origine bactérienne (*Streptococcus*). Ce produit est fourni par Thermo Fisher (Paris, France), le numéro de lot : MKCG2305, réf. 252476. Le poids moléculaire est de 1 MDa.

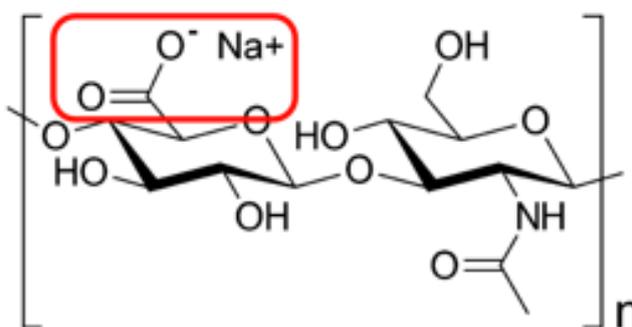


Figure 10 : Structure chimique du hyaluronate de sodium (Source image : www.Contipro.com)

1.3. La maltodextrine oxydée (MDo)

La maltodextrine (Glucidex D19, Roquette, Lestrem, France) de formule C₆H₁₀O₅, est un produit obtenu par une hydrolyse partielle de l'amidon (figure 11). Elle se présente sous la

forme d'une poudre blanche, gout légèrement sucré, et soluble dans l'eau. La maltodextrine est caractérisée par le paramètre de « dextrose équivalent » (DE). En effet, la DE indique le pouvoir réducteur de la maltodextrine, et donne indirectement la masse molaire de la dextrose ¹³⁵. La maltodextrine Glucidex D19[®] utilisée présente un DE de 19. La masse molaire moyenne est de 947 g/mol (donnée fabricant).

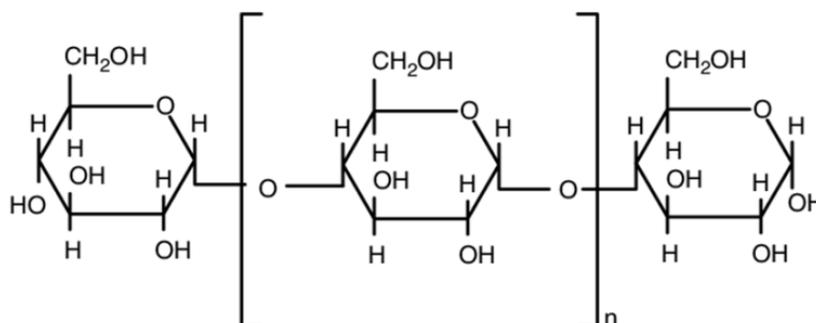


Figure 11 : Structure chimique du polymère de maltodextrine

L'oxydation de la maltodextrine par le periodate de sodium (NaIO_4) a été réalisée au laboratoire UMET en suivant le protocole de T. P. Clark *et al.* (EP 2 894 172 A1) ¹³⁶. Brièvement, les étapes de la synthèse de la MDo se résument aux points suivants :

- Dissolution de 41,03 g de la maltodextrine dans 800 mL d'eau ultra pure, puis laissé sous agitation à 500 rpm jusqu'à dissolution complète
- Ajout de 56,4 g de periodate de sodium au mélange précédent. La réaction est faite sous atmosphère d'azote et à l'abri de la lumière pendant 24h (réaction photosensible)
- Après réaction, le periodate de sodium est retiré du mélange en utilisant une colonne contenant une résine échangeuse d'ions (Amberlite™ IRN150, Alfa Aesar®, Paris, France), puis un rinçage à l'eau est réalisé
- Lyophilisation de la MDo pendant 24h à une température de -55°C . (Christ Alpha 1-2 LD, Grosseron, Couëron, France)

Le processus d'oxydation entraîne le clivage de la liaison $\text{C}_2\text{-C}_3$ du diol vicinal de l'unité glucose aboutissant à l'ouverture de l'anhydroglucose et la formation de deux fonctions aldéhyde (-CHO) (Figure 12) ¹²⁶. Le degré d'oxydation est de 60% mesuré par titration acide base.

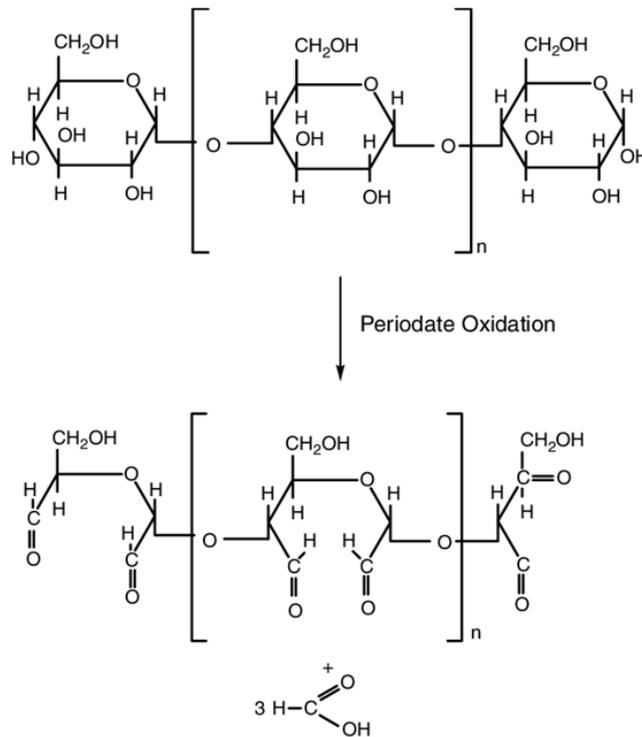


Figure 12 : Réaction d'oxydation de la maltodextrine par le periodate de sodium ¹³⁷.

La formation des fonctions dialdéhydes a été confirmée par analyse infra rouge (ATR- FTIR) du produit avant et après oxydation (voir annexe 1, figure 59).

1.4. L'hexaméthylènetétramine (HMTA)

L'hexaméthylènetétramine ou hexamine (HMTA) est fourni par Sigma-Aldrich© (Saint-Quentin-Fallavier, France) sous la forme de poudre et présente un poids moléculaire de 140,19 g/mol. C'est un composé organique ayant la formule chimique brute $C_6H_{12}N_4$. Le processus de décomposition par traitement thermique de l'HMTA est représenté dans le schéma ci-dessous (figure 13):

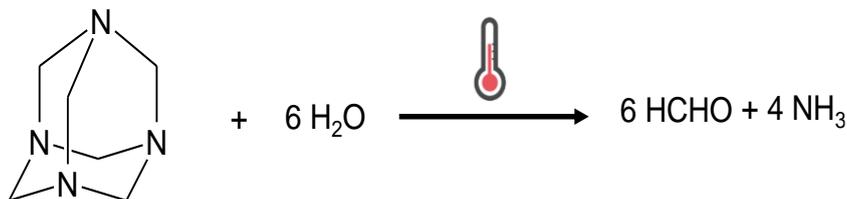


Figure 13 : Réaction de décomposition de l'HMTA en ammoniac et formaldéhyde sous l'effet d'un traitement thermique

2. Méthodes

2.1. Préparation des hydrogels

Afin de faciliter la nomenclature des différentes formulations testées, un choix de la classification est réalisé en suivant l'ordre suivant : CHT:HA:MDo ou CHT:HA:HMTA, le tableau ci-dessous donne les différents composants utilisés :

Tableau 7 : Pourcentages des différents réactifs utilisés pour la préparation des hydrogels et éponges à base de MDo et d'HMTA. CHT : chitosan, HA : acide hyaluronique, MDo : maltodextrine oxydée, HMTA : hexaméthylénetétramine, TT : traitement thermique.

Formulations	% CHT	% HA	Agent réticulant	
			% MDo	% HMTA
CHT 2%	2			
CHT 5%	5			
CHT:MDo (2:0,4)	2		0,4	
CHT:MDo (5:0,4)	5		0,4	
CHT:HA (5:1)	5	1		
CHT:HA:MDo (5:1:0,4)	5	1	0,4	
CHT 5%+TT	5			
CHT:HMTA (5:1)+TT	5			1
CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT	5	1		1

Afin d'utiliser le CHT dans la formulation de l'hydrogel, la préparation des poudres a été réalisée en 2 étapes :

- Etape 1 : Pulvérisation du CHT (FRITSCH Pulverisette 14, Champlan, France). La vitesse de rotation est de 8000 rpm pendant 3 minutes.
- Etape 2 : Tamisage de la poudre de CHT pulvérisée à l'aide d'un tamis (Retsch, Éragny, France) permettant d'obtenir une granulométrie inférieure à 125 µm.

Dans un premier temps, un mélange homogène des deux poudres de CHT et d'HA tamisées à 125 µm est effectué dans un cobroyeur (Retsch MM 400, Éragny, France) à une fréquence de 10 Hz pendant 3 minutes. Le cobroyat de CHT:HA est mis en suspension dans l'eau à l'aide de seringues interconnectées pendant 1 minute, puis un second mélange par seringues interconnectées est réalisé en rajoutant de l'acide lactique (1%) pendant 1 min. Le cobroyat forme rapidement un hydrogel par déploiement et enchevêtrement des chaînes macromoléculaires d'HA et de CHT, mais aussi grâce à la formation de complexes polyélectrolytiques par interactions électrostatiques entre les groupes fonctionnels opposés du CHT et d'HA. Le volume total du mélange est de 1,5 mL. Ce premier mélange permet d'obtenir

un hydrogel physique par interactions ioniques entre les deux poly électrolytes (CHT:HA). Afin de réticuler ce système, 2 voies sont envisagées :

1) en utilisant la MDo à 0,4%. La préparation se fait via les seringues interconnectées, la MDo est ajouté à l'hydrogel CHT:HA formé puis laissé 2 heures à température ambiante pour que la réticulation se produise et former l'hydrogel chimique (CHT:HA:MDo) (Figure 14).

2) en utilisant l'HMTA, une concentration de 1% a été testée, cela permet de produire des hydrogels de CHT:HA:HMTA. Ces hydrogels sont ensuite lyophilisés pour produire des éponges. L'activation du processus de réticulation se fera via un traitement thermique des éponges à une température de 130°C, pour une durée de 30 minutes.

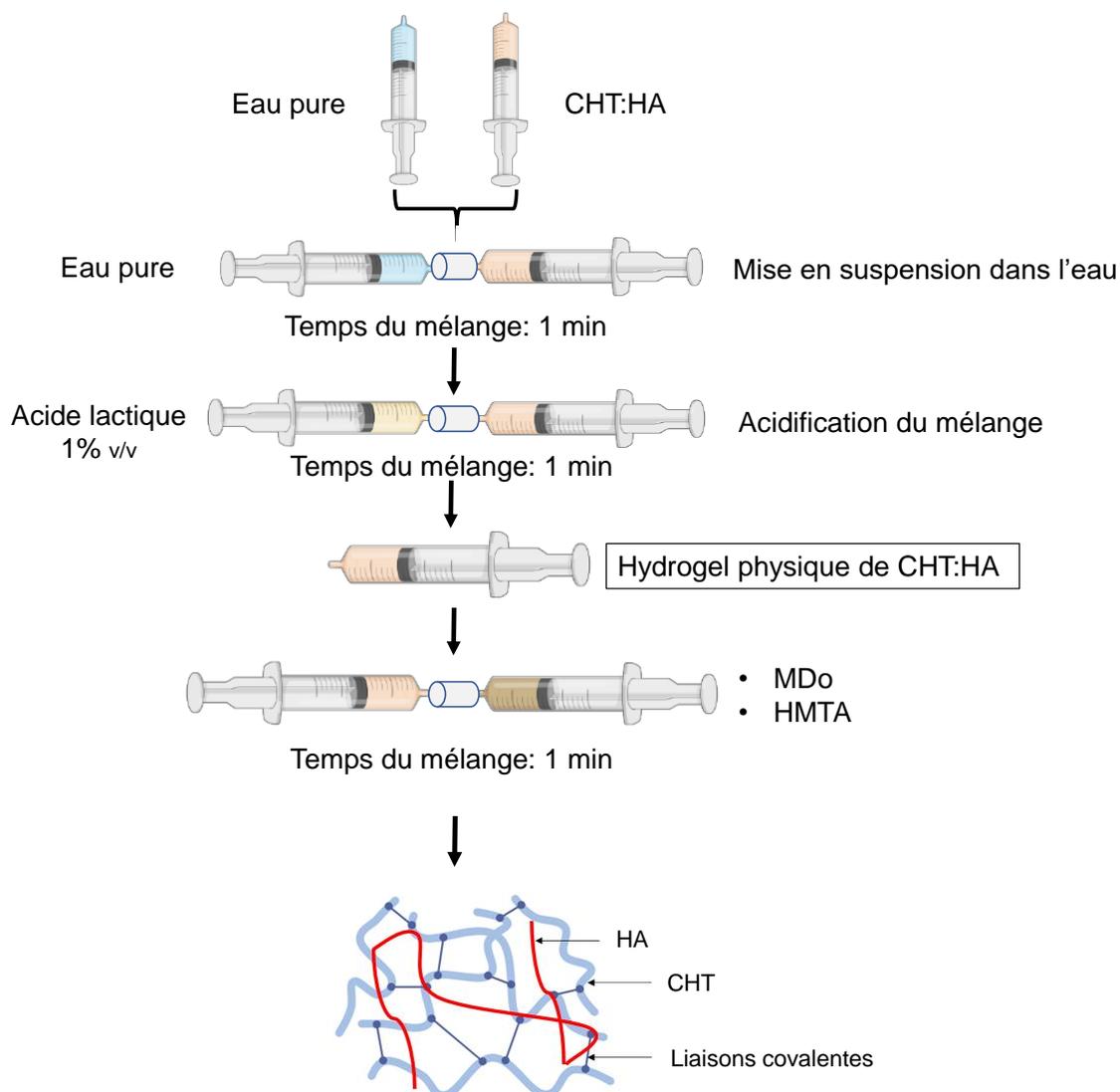


Figure 14 : Représentation graphique des différentes étapes de préparation des hydrogels de CHT:HA réticulés par la MDo ou l'HMTA en utilisant la méthode des seringues interconnectés.

2.2. Préparation des éponges

Les hydrogels sont congelés à - 21°C pendant une nuit. La lyophilisation est ensuite réalisée à l'aide du lyophilisateur (Buchi L-200, Suisse), avec les conditions de lyophilisation suivantes : - 53°C, 0,06 mbar, 48h. Les éponges des formulations CHT:HMTA et CHT:HA:HMTA subissent un traitement thermique à 130°C pendant 30 min afin de provoquer la réticulation. Les éponges sont ensuite stockées à température ambiante.

2.3. Caractérisation des hydrogels

2.3.1. Etude rhéologique des hydrogels à base de CHT

2.3.1.1. Etude de la viscosité

Une étude de la viscosité des solutions de CHT (1% - 5%) en fonction du taux de cisaillement a été réalisée à 25°C à l'aide du rhéomètre HR 10 (TA Instruments, Guyancourt, France). Il est utilisé en mode rotatif, avec un système de géométrie plan-plan de 25 mm de diamètre.

2.3.1.2. Etude des propriétés viscoélastiques

Les propriétés viscoélastiques des solutions ou des hydrogels ont été évaluées en mode oscillatoire, en fonction de l'amplitude de déformation, de la fréquence et du temps. Cette caractérisation a permis de mesurer le module de stockage (G'), le module de perte (G'') ainsi que le facteur de perte ($\tan \delta$).

- Le module G' , est une mesure de l'énergie stockée par le matériau lorsqu'il est soumis à une contrainte de cisaillement, elle représente la composante élastique (solide) du matériau.
- Le module G'' , est une mesure de l'énergie dissipée par le matériau lors qu'il est soumis à une contrainte de cisaillement, elle décrit le comportement visqueux (liquide) du matériau ¹³⁸.
- $\tan \delta$ est une mesure de la dissipation associé à un matériau viscoélastique, il représente le rapport G'' / G' , l'angle de déphasage (δ) est compris entre 0° et 90°, lorsque le matériau est purement élastique $\delta = 0^\circ$ et lorsque le matériau est purement visqueux $\delta = 90^\circ$ ¹³⁹.

Dans un premier temps, un balayage en amplitude de cisaillement a été réalisé à une fréquence de 6,28 rad/s afin de déterminer la limite du domaine viscoélastique linéaire de chaque hydrogel. Dans un second temps un balayage en fonction de la fréquence de cisaillement est réalisé à une amplitude de 1%, ceci permet d'étudier le comportement viscoélastique des hydrogels en fonction de la fréquence angulaire (rad/s). Une évaluation des propriétés viscoélastiques des hydrogels en fonction du temps à amplitude et fréquence ($\epsilon = 1\%$, $\omega = 6,28 \text{ rad/s}$) a été réalisé à une température de 25°C.

La réticulation des solutions de CHT 2 % a été effectuée par l'ajout de 0,4 % de MDo. L'étude a été menée en fonction du temps, en maintenant des conditions de fréquence et d'amplitude ($\omega=6,28 \text{ rad/s}$, $\varepsilon=1\%$) et à une température de 25°C. Le point de gel a été identifié par le croisement des modules G' et G'' .

2.4. Caractérisation des éponges

2.4.1. Spectroscopie infra rouge à transformée de Fourier (IRTF)

Les éponges ont été caractérisées par IRTF avec le Spectrum100 (Perkin Elmer, France) en mode ATR. Cela a permis l'enregistrement de spectres dans une gamme de nombre d'ondes qui s'étend de 4000 à 600 cm^{-1} . Cette technique permet d'analyser les bandes d'absorption des différents groupes d'éponges avec ou sans MDo / HMTA et éventuellement, vérifier la présence de liaisons chimiques spécifiques.

2.4.2. Etude des propriétés d'adsorption et d'absorption des éponges

2.4.2.1. Etude de gonflement dans le PBS

Les éponges sont préalablement pesées puis placées dans un flacon contenant 10 mL de PBS dans un incubateur à 37°C sous agitation (80 rpm). A différents temps (2h, 4h, 6h, 24h), les éponges sont retirées du PBS et l'excès d'eau est extrait avec du papier absorbant. La masse des éponges humides est mesurée. L'étude a été réalisée en triplicata ($n=3$). Le taux de gonflement a été déterminé selon la formule suivante :

$$\text{Gonflement (\%)} = \left[\frac{m_g - m_0}{m_0} \right] \times 100$$

m_g : masse de l'éponge gonflée dans le PBS. m_0 : masse initiale de l'éponge.

A la fin du test, les éponges sont séchées à l'étuve à une température de 60°C pendant 12h afin d'estimer la perte de masse sèche au cours du test de gonflement de l'éponge réalisé ci-dessus. Le taux de masse restante est calculé en appliquant la formule ci-dessous :

$$\text{masse restante (\%)} = \left[1 - \frac{m_0 - m_f}{m_0} \right] \times 100$$

m_f : masse de l'éponge sèche suite à un traitement thermique de 60°C pendant 1 nuit. m_0 : masse initiale de l'éponge.

2.4.2.2. Mesure de l'adsorption de vapeur d'eau par DVS

Le comportement hygroscopique des éponges a été mesuré par l'analyse d'absorption dynamique de vapeur à l'aide de l'appareil Q5000 SA (TA Instrument, Guyancourt, France). L'instrument se compose d'une microbalance et d'une chambre contrôlée par l'humidité et la température. L'humidité relative (HR) a été contrôlée par un flux de gaz N_2 sec ($\text{HR}=0\%$) et saturé en eau ($\text{HR}=100\%$), le flux global réglé avec un débit de 200 mL/min dans la chambre

¹⁴⁰. Une éponge de 5 mg environ a été placée dans la chambre. L'isotherme d'adsorption d'eau a été obtenu après un cycle de séchage à 60°C et 0% HR, cette étape a été maintenue jusqu'à ce que le poids se stabilise. L'isotherme d'adsorption est ensuite réalisé à 25°C, par augmentation progressive de l'HR (plateaux de 5%) jusqu'à ce qu'elle atteigne 95%. Enfin, l'HR est ensuite abaissée jusque 0% par paliers de 5% pour tracer l'isotherme de désorption.

2.4.3. Etude de la dégradation des éponges

La dégradation des éponges a été évaluée dans trois milieux : une solution de PBS à pH 7,4, une solution de PBS contenant ou pas le lysozyme à pH 7,4, et dans l'acide lactique à 1%. Pour chaque condition, les éponges sèches ont été pesées, immergées dans 10 mL de milieux, puis incubées à 37°C sous agitation (80 rpm) pour des périodes de 1, 2, 7, 14, 21, 40, 60, 90 jours.

Dans le cas de la dégradation enzymatique, une solution de lysozyme (75 579 U/mg) a été préparée dans du PBS filtré à une concentration de 0,5 mg/mL, le milieu est renouvelé toutes les semaines. À chaque temps, les éponges ont été soigneusement rincées à l'eau distillée pour éliminer les résidus de sels, séchées à 60°C pendant 12 heures puis pesées. L'étude dans l'acide lactique à 1 % *v/v* (pH 2,3) a été réalisée sur une période de 7 jours.

La méthode de calcul de la dégradation des éponges est donnée ci-dessous :

$$\text{masse restante (\%)} = \left[1 - \frac{m_0 - m_f}{m_0} \right] \times 100$$

m_0 : masse initiale de l'éponge (masse sèche), m_f : masse de l'éponge après incubation (au temps t) et séchage à 60°C pendant 12h.

2.4.4. Microscopie électronique à balayage (MEB)

L'observation morphologique des éponges a été réalisée à l'aide du MEB (Hitachi Flex 1000, Tokyo, Japon). La tension d'accélération étant de 5 kV. Tous les échantillons ont été traités avec une couche de chrome de 10 nm. Les éponges ont été découpées en tranches, et seule la partie centrale a été sélectionnée pour l'analyse. La mesure de la taille des pores a été réalisé avec le logiciel Flex SEM 1000. Une moyenne a été calculée sur la base de 20 mesures.

2.4.5. Analyse mécanique dynamique (DMA)

Les propriétés mécaniques des éponges ont été mesurées par DMA à l'aide de l'appareil RSA III (TA instruments, Guyancourt, France). Cette technique de caractérisation consiste à appliquer une contrainte sinusoïdale $\varepsilon = \varepsilon_0 \sin(2\pi ft)$ en compression et de mesurer la réponse à cette contrainte, dans le domaine viscoélastique linéaire avec un déphasage compris entre 0 et 90°. Le module de stockage E' (qui représente la réponse en phase avec la contrainte appliquée) exprime le comportement élastique du matériau, tandis que le module de perte E''

(qui représente la partie de la réponse déphasée de 90° par rapport à la contrainte appliquée) exprime la dissipation de l'énergie sous forme de chaleur, et est associée au comportement visqueux du matériau. Dans cette étude, les essais ont été effectués en compression à l'aide de plateaux de 25 mm de diamètre, appliqués sur des échantillons cylindriques de 10 mm de hauteur et 12 mm de diamètre (figure 15), à une température de 37°C. Une charge initiale de 0,5 N a été appliquée aux échantillons. Avant les mesures, les éponges ont été immergées pendant 24 heures dans une solution de PBS à 37°C.

Deux expériences ont été réalisées : 1) Un test de balayage de déformation dans lequel une amplitude de déformation croissante (ϵ_0) de 0,1% à 10% à une fréquence de 1 Hz est appliquée pour déterminer le domaine viscoélastique linéaire des éponges, puis une étude de balayage de fréquence dynamique de 0,1 à 10 Hz à une amplitude de déformation de 1% est appliquée pour se rapprocher des contraintes susceptibles d'être subies par le biomatériau en conditions réelles.

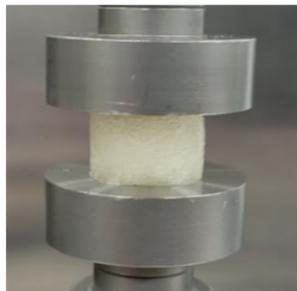


Figure 15 : Test de compression uni axial d'un échantillon d'éponge humide, 25°C

2.4.6. Etude du profil de libération de la ciprofloxacine (CFX)

Le profil de libération de la CFX par les éponges a été analysé en condition stérile. Les éponges de 8 mm de diamètre et 5 mm d'hauteur ont été décontaminées aux UV pendant 30 minutes puis imprégnés dans 10 mL d'une solution de chlorhydrate de CFX (CFX hydrochloride, Fagron) à 200 mg / 100 mL pendant 4 heures sous agitation. Les éponges ont été conservées à 37°C pendant 12h, puis placées dans une boîte de culture stérile (24 puits). 1 mL de PBS stérile est utilisé comme milieu de libération puis renouvelé après 1h, 2h, 4h, 6h, 24h, puis toutes les 24 heures jusqu'à 312 heures. Le test est réalisé à 37°C et sous agitation (80 rpm). Toutes les manipulations ont été effectuées sur le poste de sécurité microbiologique, l'étude a été réalisée en triplicata (n=3).

Le dosage de la CFX a été réalisé par HPLC Shimadzu LC2010AHT (Shimadzu, Kyoto, Japon), équipée d'un détecteur UV. Les échantillons sont élués sur une colonne Gemini-NX C18, 250 x 4,6mm, 5 μ m (Phenomenex, Le Pecq, France). 20 μ L de milieu de libération ont été injectés dans une phase mobile constituée d'un mélange de tampon KH₂PO₄ 0,01M, pH=3

/ Acétonitrile, 82/18, v/v, circulant à un débit de 0,8 mL/min. La détection est effectuée à 278 nm et les chromatogrammes sont retraités à l'aide du logiciel LabSolution (Shimadzu, Kyoto, Japon), l'équation de la gamme étalon $y = 1 \cdot 10^8 x + 120512$, $r^2 = 0,9997$. La gamme étalon est comprise entre 0,02 et 0,2 mg/mL.

2.4.7. Activité antibactérienne des milieux de libération

Parallèlement à l'étude de la libération de la CFX, un test de diffusion a été réalisé en utilisant les solutions de CFX libérées par les éponges pour évaluer son activité antibactérienne. Brièvement, des boîtes de Pétri ont été préparées avec 18 mL d'une gélose Mueller-Hinton (MHA) (ThermoScientific, Oxiod29 Microbiological Products, France).

La souche bactérienne *E. coli* (souche K12) a été mise en suspension dans 10 mL de solution de Ringer cystéinée pour former une suspension mère d'une densité de 10^4 UFC/mL. Chaque gélose a été inoculée avec 0,1 mL de suspension, puis 50 μ L du milieu de libération a été déposé dans chaque puits de 6 mm préalablement creusé dans la gélose. Toutes les plaques ont été incubées pendant 24h à 37°C. Le diamètre d'inhibition été mesuré en (mm) en fonction du temps (h), le test a été réalisé en triplicata (n=3).

2.4.8. Étude de cytotoxicité des éponges

La cytotoxicité des éponges a été évaluée par la méthode de l'extrait en utilisant des cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 (ATCC® CRL 2593™, Manassas, VA, USA) selon la norme ISO 10993-5. Les éponges ont été préalablement imprégnées dans un milieu de culture pendant 5 heures à 37°C sous 80 rpm. Après cette incubation, elles ont été rincées, séchées au papier absorbant, et puis pesées. Une quantité de 200 mg de masse de chaque groupe d'éponges a été prélevée, puis immergée dans 1 mL de milieu de culture complet composé d' α -MEM (Gibco, France), de 10 % de sérum bovin fœtal. L'ensemble est laissé 24 heures à 37 °C sous agitation (80 rpm) dans un incubateur (New Brunswick Scientific, Innova 40). Parallèlement, les cellules ont étéensemencées à une densité de 4×10^3 cellules par puits dans une plaque à 96 puits afin d'obtenir une monocouche ne dépassant pas 80% de recouvrement du fond du puit. Après incubation, le milieu d'extraction a été filtré (0,22 μ m), puis 100 μ L de ce milieu d'extraction stérile ont été ajoutés à chaque puits. Les cellules ont été cultivées dans ce milieu pendant 24 heures. Après incubation, 200 μ L du réactif BlueAlamar (ThermoFisher Scientific, France) ont été ajoutés à chaque puits et incubés pendant 2 heures à 37°C. Par la suite, 150 μ L de chaque puits ont été prélevés pour l'analyse de la fluorescence. L'intensité de la fluorescence a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre (CLARIOstar®, BMG Labtech, Ortenberg, Germany) avec une longueur d'onde d'excitation de 530 nm et une longueur d'onde d'émission de 590 nm. La viabilité cellulaire a été déterminée en exprimant l'intensité de la fluorescence en pourcentage par rapport au groupe témo

Partie 3 : Résultats et Discussions

Chapitre 1 : Caractérisation rhéologique des hydrogels de CHT et CHT:HA

Dans ce chapitre, nous allons nous intéresser à l'analyse rhéologique des hydrogels à base de CHT, qu'ils soient physiques ou chimiques. Nous commencerons par une étude du comportement rhéologique du CHT seul, afin d'appréhender ses propriétés intrinsèques, puis de l'hydrogel CHT:HA et ensuite sa réticulation chimique avec la MDo sera étudiée. En outre, le mécanisme de réticulation du CHT avec l'HMTA, qui requiert une activation thermique a posteriori de la lyophilisation, sera étudié dans le chapitre consacré aux éponges. Cette partie vise à caractériser les propriétés viscoélastiques des hydrogels physiques et chimiques pour la conception d'éponges aux propriétés mécaniques modulables.

1. Etude rhéologique des hydrogels physiques de CHT:HA

1.1. Etude rhéologique des solutions de CHT

1.1.1. Courbes de viscosité

La figure 16 présente les courbes d'écoulement (viscosité en fonction du gradient de cisaillement) des solutions de CHT de concentrations comprises entre 1 et 5% pour un taux de cisaillement croissant (0,01 à 1000 s⁻¹), ainsi que la modélisation des données expérimentales au modèle théorique de Cross.

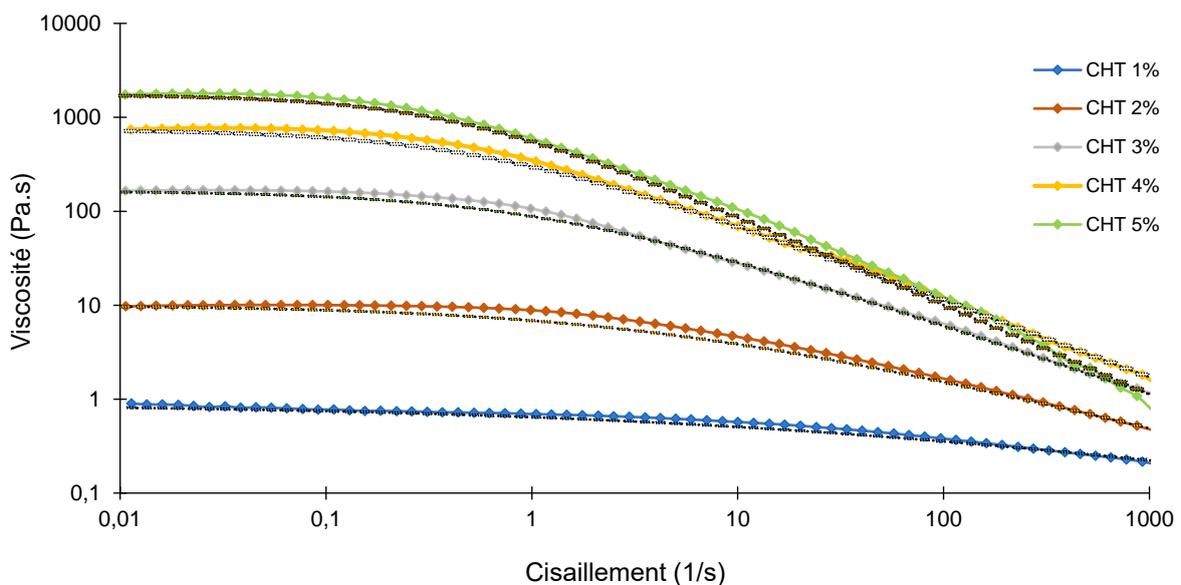


Figure 16 : Courbes expérimentales de viscosité (Pa.s) des solutions de CHT (1 - 5% w/v), en fonction du cisaillement (1/s) comparées au modèle théorique de Cross (pointillés), solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

Nous notons la présence d'un plateau aux faibles taux de cisaillement qui correspond à un comportement Newtonien. Au-delà de ce plateau, les courbes montrent un comportement rhéofluidifiant des solutions de CHT quel que soit leur concentration.

La viscosité extrapolée à cisaillement nul (« *Zero-shear viscosity* ») (η_0) dépend de la concentration du CHT. En effet, nous avons observé que la viscosité augmente de 0,9 Pa.s à 1743 Pa.s lorsque la concentration de CHT augmente de 1% à 5% (figure 16). Ceci est attribué à l'augmentation de l'enchevêtrement des chaînes de CHT lorsque que la concentration du CHT augmente, selon l'étude de C.A. Kienzle-Sterzer *et al.*¹⁴¹ Une étude similaire a été rapportée par Fatimi *et al.* qui ont mis en évidence l'existence d'une loi de puissance entre la viscosité à cisaillement nul et la concentration, ainsi que le comportement rhéofluidifiant de solutions d'HPMC (hydroxypropylméthylcellulose) et HPMC-si (hydroxypropylméthylcellulose silanée) . Ils ont aussi comparé leurs résultats expérimentaux au modèle de Cross. Nous avons adopté une démarche similaire pour notre étude ¹⁴².

A partir de l'intersection des deux portions linéaires des courbes de viscosité de la figure 16, nous avons déterminé graphiquement les taux de cisaillement critiques (γ_c) des différentes solutions. γ_c correspond à la transition entre le comportement Newtonien et non Newtonien et permet de calculer le temps de relaxation ($\lambda = 1/\gamma_c^\circ$). Ce temps correspond au temps nécessaire aux chaînes macromoléculaires pour revenir à leur état d'équilibre initial après une sollicitation ¹⁴².

L'équation est donnée ci-dessous :

$$\eta = \frac{\eta_0}{1 + (\lambda \dot{\gamma})^n}$$

η_0 : Viscosité newtonienne limite à faible cisaillement (Pa.s)

$\dot{\gamma}$ Taux de cisaillement (s^{-1})

λ : Temps de relaxation (s), correspond à l'inverse du taux de cisaillement critique γ_c°

n : Exposant de la loi de puissance

Le tableau 8 montre les différents paramètres mesurés et calculés pour le tracé des courbes théorique de Cross.

Tableau 8 : Paramètres de la loi de Cross déterminés à partir des courbes expérimentales de viscosité des solutions de CHT 1% à 5%. η_0 (Pa.s): viscosité newtonienne limite à faible cisaillement. γ_c° : taux de cisaillement critique (s^{-1}) déterminé graphiquement par la méthode des tangentes. λ (s): temps de relaxation, (inverse du taux de cisaillement critique). n : exposant de la loi de puissance.

CHT (%)	η_0 (Pa.s)	γ_c° (s^{-1})	λ (s)	n
1%	$0,9 \pm 0,3$	25	0,04	0,3
2%	$9,7 \pm 1,2$	4	0,25	0,54
3%	$164,7 \pm 21$	1,2	0,83	0,74
4%	$738,6 \pm 132,7$	0,62	1,61	0,82
5%	$1742,8 \pm 187$	0,44	2,27	0,95

On peut observer une correspondance entre les courbes de viscosité expérimentales et les courbes théoriques décrites par le modèle de Cross. Par ailleurs, le tracé de $\eta_0 = f(C_{\text{CHT}})$ suit une loi de puissance avec une équation de type $\eta_0 = A \cdot C^n$ (figure 17A). De même qu'il existe une loi de puissance qui relie le temps de relaxation et la concentration $\lambda = C^n$ (figure 17B).

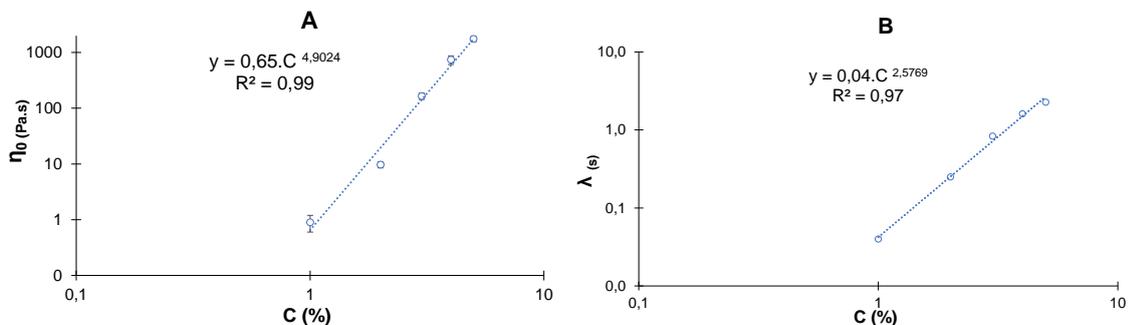


Figure 17 : (A) Représentation graphique de la relation de dépendance de la concentration de CHT (1 - 5%_{w/v}) à la viscosité initiale (η_0 , Pa.s) et au temps de relaxation du polymère (λ , s). (B) La température a été fixée à 25°C, solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

Les résultats montrent que l'exposant (n) est égal à 4,9. Selon M. Rubinstein *et al.* pour une viscosité à faible cisaillement, la valeur de n est comprise entre 3,75 et 8,52. De telles valeurs sont attendues pour les solutions de polymères enchevêtrés dans un bon solvant¹⁴²⁻¹⁴⁴. Par ailleurs, on observe que le temps de relaxation augmente lorsque que la concentration du CHT augmente. La relation entre les 2 paramètres est représentée par une loi de puissance dont l'exposant (n) est égal à 2,57, le temps de relaxation est long pour des solutions de polymères très enchevêtrés.

1.1.2. Propriétés viscoélastiques des solutions de CHT

1.1.2.1. Balayage en amplitude

La figure 18 montre les courbes G' et G'' des solutions de CHT de 1% à 5% en fonction de l'amplitude de cisaillement (0,1% à 100%). L'étude a été réalisée à une fréquence de 6,28 rad/s et à une température de 25°C.

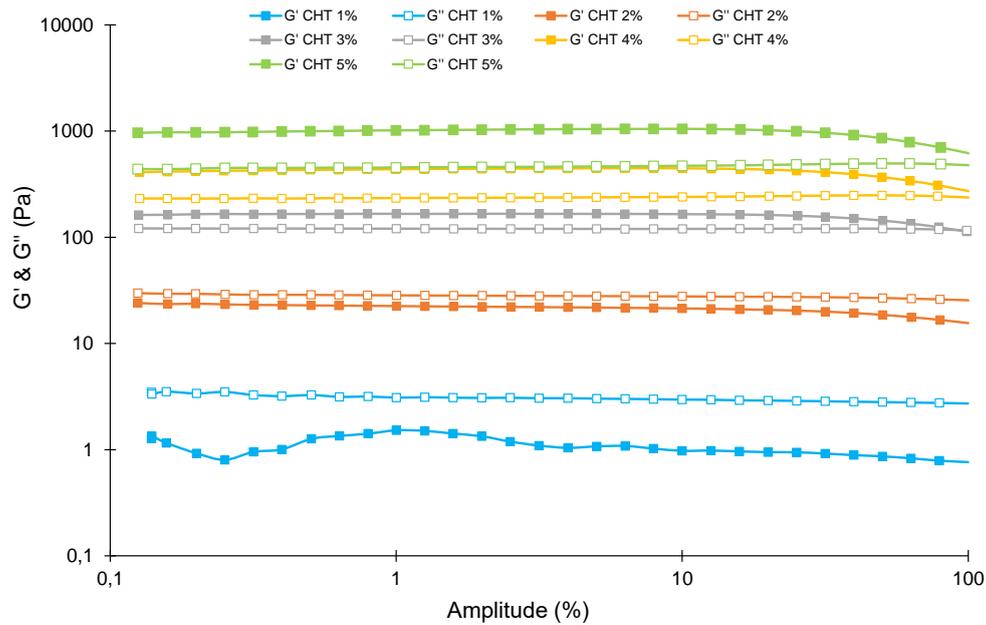


Figure 18 : Module de stockage (G') et module de perte (G'') en fonction de l'amplitude de cisaillement (0,1 - 100%), à différentes solutions de CHT (1 - 5%_{w/v}), $\omega = 6,28 \text{ rad/s}$, $T = 25^\circ\text{C}$ solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

Les résultats montrent G'' supérieur au G' pour les solutions de CHT à 1% et 2% révélant un comportement de liquide visqueux, contrairement aux solutions de CHT à 3%, 4% et 5%, pour lesquelles un comportement viscoélastique est observé (G' supérieur à G''). Les résultats indiquent également que la région viscoélastique linéaire (RVL) des solutions de CHT s'étend sur une plage de déformation oscillatoire comprise entre 0,1 % et 10 %. Le choix d'une déformation de 1% pour la suite des tests de rhéologie permet d'obtenir un comportement stable et reproductible dans la RVL. Les propriétés viscoélastiques des différentes solutions de CHT (1% à 5%) ont été ensuite mesurées à une amplitude de $\omega = 1\%$ et à une fréquence angulaire $\omega = 6,28 \text{ rad/s}$, à $t=0$ et à 25°C .

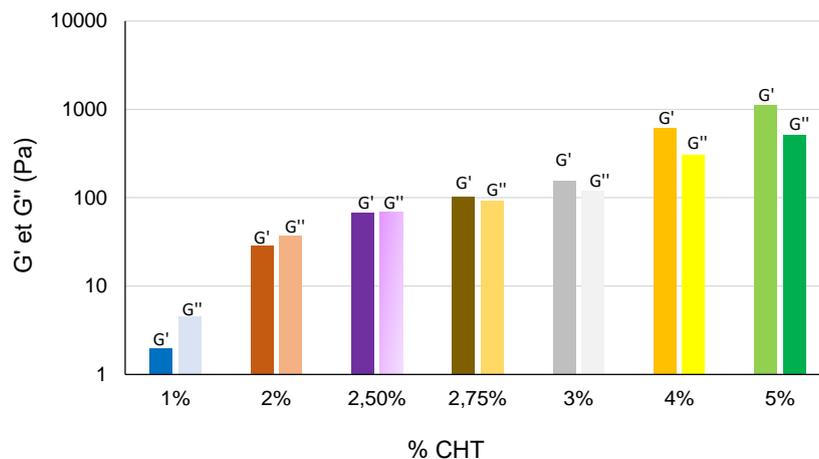


Figure 19 : Module de stockage (G') et module de perte (G'') des solutions de CHT (1 - 5%_{w/v}) à $t=0$, $\omega = 6,28 \text{ rad/s}$, $\epsilon = 1\%$, $T = 25^\circ\text{C}$, solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

La figure 19 montre que pour les formulations de CHT 1% et 2%, G'' est supérieur à G' , cela signifie un comportement de solution viscoélastique. Tout comme lors des tests précédents, la formulation avec CHT 3% a montré un G' supérieur à G'' dès le début de l'essai ; c'est un comportement de solide viscoélastique. Les concentrations de la solution de CHT ont été affinées à 2,5% et 2,75% pour déterminer la concentration seuil à laquelle le CHT passe d'une solution à un solide viscoélastique. A partir de la concentration de CHT 2,75%, on observe que G' devient supérieur à G'' à mesure que la concentration de CHT augmente. Ces résultats montrent bien une dépendance des propriétés viscoélastiques à la concentration de CHT utilisée (%). En complément des résultats précédents, la figure 20 montre l'évolution de $\tan \delta$ en fonction de la concentration du CHT (1% à 5%).

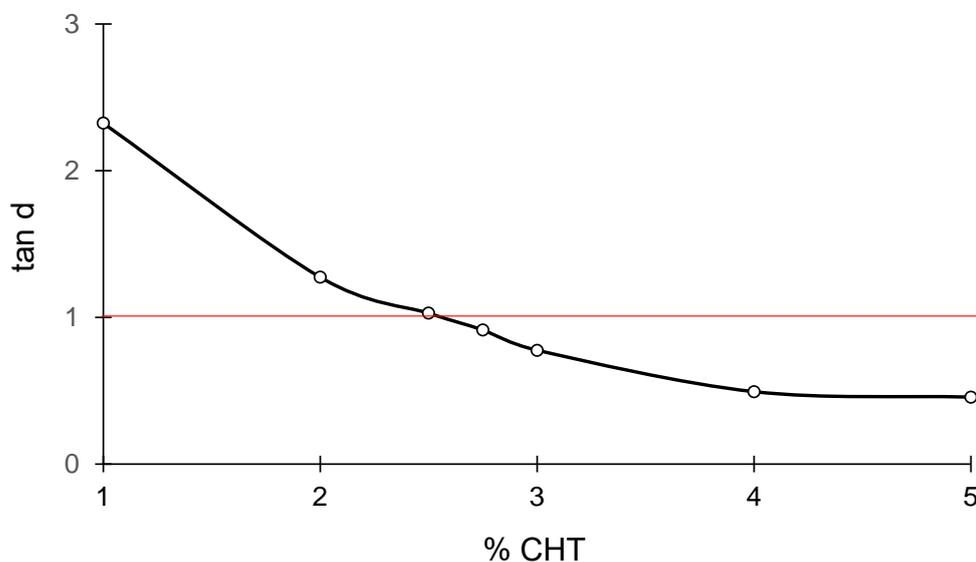


Figure 20 : $\tan \delta$ des solutions de CHT (1 - 5%_{w/v}), solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}

Les résultats montrent une diminution progressive de $\tan \delta$ avec l'augmentation de la concentration de CHT. En effet, $\tan \delta$ passe d'environ 2,3 pour CHT 1 % à environ 0,4 pour CHT 5 %. La ligne rouge horizontale à $\tan \delta = 1$ constitue un seuil de référence distinguant un comportement visqueux ($\tan \delta > 1$) d'un comportement élastique ($\tan \delta < 1$). Ainsi, les formulations faiblement concentrées en CHT (1% à 2%) présentent un caractère essentiellement visqueux. Dans notre cas, la concentration de 2,75 % marque un seuil à partir duquel les solutions passent d'un comportement visqueux à un comportement élastique, avec un comportement élastique qui s'installe progressivement rendant les solutions de plus en plus élastiques à mesure que la concentration en CHT augmente.

1.1.2.2. Balayage en fréquence

La figure 21 montre l'évolution de G' et G'' en fonction de la fréquence angulaire (0,628 à 628 rad/s, (0,1-100 Hz)), pour les solutions de CHT allant de 1% à 5%. Les tests ont été réalisés à une amplitude de 1% et à température de 25°C.

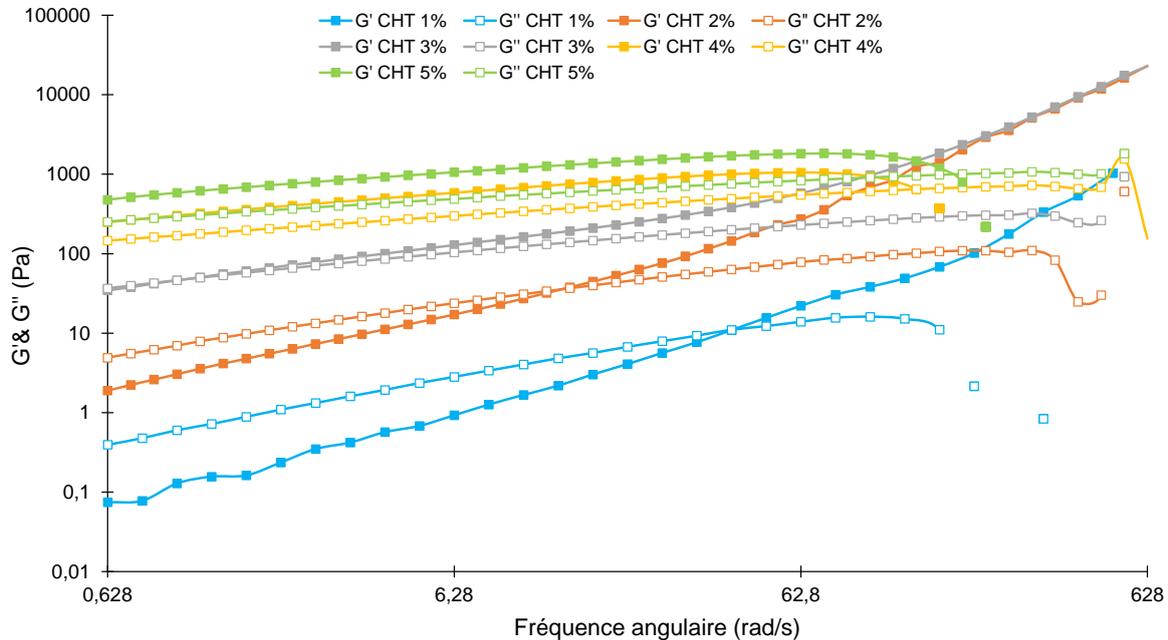


Figure 21 : Module de stockage (G') et module de perte (G'') des solutions de CHT (1 - 5%_{w/v}) en fonction de la fréquence angulaire $\omega = 0,628$ à 628 rad/s, $\varepsilon = 1\%$, $T = 25^\circ\text{C}$, solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}

Les résultats montrent que dans la gamme de fréquence étudiée, G'' est supérieur à G' pour les formulations de CHT 1% et 2% aux faibles fréquences. Ceci correspond à un comportement de liquide viscoélastique ¹⁴⁵. Cependant, suite à l'augmentation de la fréquence oscillatoire, nous observons un croisement entre G' et G'' appelé « cross-over point ». Ainsi un croisement des courbes intervient à des fréquences de 39,6 rad/s (6,3 Hz), 13,5 rad/s (2,15 Hz) et à 0,85 rad/s (0,14 Hz) pour les solutions de CHT 1%, 2% et 3% respectivement. Un comportement similaire a été observé dans l'étude de S. Peng Rwei *et al.* où le croisement entre G' et G'' intervient à des fréquences plus faibles (4,5 à 0,33 Hz) lorsque la concentration du CHT augmente de 1% à 3% ¹⁴⁶. Concernant les solutions de CHT 4% et 5%, nous observons un comportement de solide viscoélastique avec $G' > G''$ sur toute la gamme de fréquence étudiée, comme observé dans l'étude précédente.

La figure 22 montre l'évolution du facteur de perte ($\tan \delta = G''/G'$) correspondant aux différentes solutions de CHT 1% à 5% en fonction de la fréquence angulaire.

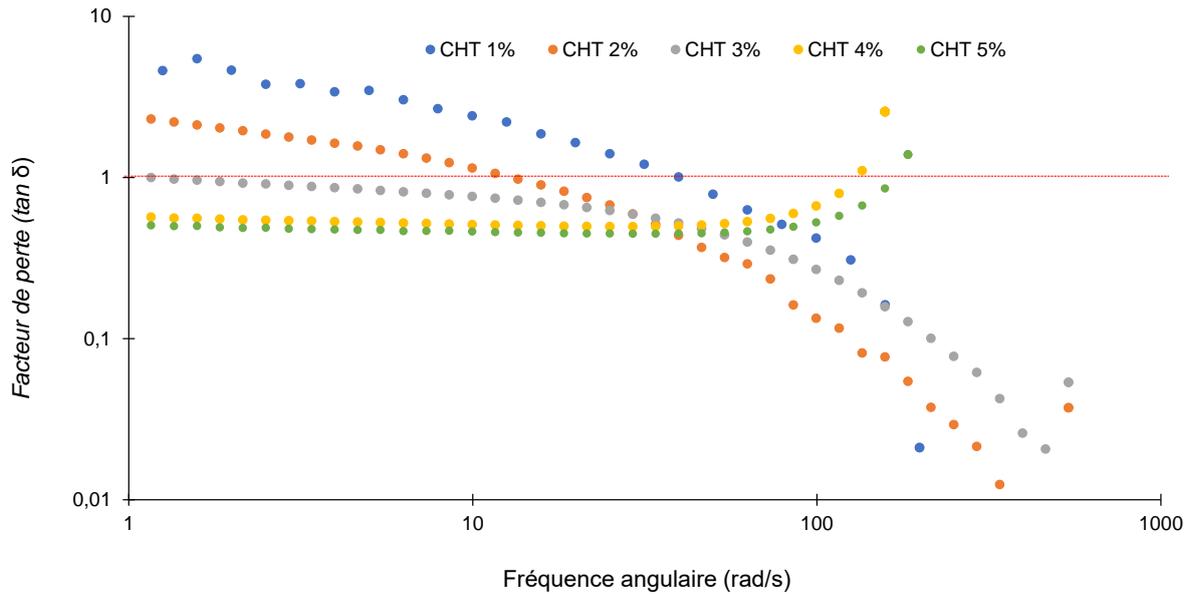


Figure 22 : Courbes de $\tan \delta$ en fonction de la fréquence angulaire (rad/s) des solutions de CHT (1 - 5%_{w/v}), $T= 25^{\circ}\text{C}$, solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}

Pour les formulations contenant 1% et 2% de CHT, le facteur de perte $\tan \delta$ diminue avec la fréquence. Un comportement de liquide visqueux ($\tan \delta > 1$) est observé lorsque la fréquence est inférieure à 40 rad/s pour CHT 1%, 13,5 rad/s pour CHT 2% et 0,85 rad/s pour CHT 3%. Au-delà de ces fréquences, les solutions montrent un comportement de solide viscoélastique avec $\tan \delta < 1$. Les solutions de CHT 4% et 5% en présentent un comportement différent de celui des précédentes avec un $\tan \delta$ stable (plateau) et inférieur à 1 jusque 50 rad/s environ, montrant un comportement de solide viscoélastique (ou de gel « faible » vu le faible écart entre G' et G''), puis augmente avant de devenir supérieur à 1. La mesure devient ensuite instable et ces systèmes perdent de leur élasticité entraînant leur destruction.

Selon J.F Steff *et al.* les solutions diluées (concentrations correspondant au régime semi-dilué non enchevêtré) présentent un comportement de liquide visqueux aux basses fréquences, alors qu'aux hautes fréquences, le comportement est plutôt celui d'un solide viscoélastique ¹⁴⁷. Cela peut s'expliquer par le fait que, à de basses fréquences, les chaînes polymères sont faiblement liées (pas ou peu d'enchevêtrements) et donc peuvent avoir des mouvements aléatoires libres les unes par rapport aux autres. Cependant, lors que la fréquence augmente, les chaînes polymères interpénétrées n'ont pas le temps de se désenchevêtrer, ce qui induit l'augmentation du module élastique ¹⁴⁸. Pour les solutions polymères concentrées au-delà de la concentration d'enchevêtrement, les pelotes présentent de nombreux d'enchevêtrements, et le réseau est élastique déjà aux faibles fréquences et correspond à un solide viscoélastique.

Aux fortes fréquences, le point d'écoulement (« flowing point ») est atteint puis dépassé et le réseau formant l'hydrogel est détruit.

En conclusion, la concentration en CHT a une influence significative sur la viscosité et les propriétés viscoélastiques des solutions. À partir d'un seuil de 2,75 %, les solutions présentent une transition vers un comportement de plus en plus élastique.

1.2. Etude des propriétés rhéologiques du système CHT:HA

Dans cette section, nous étudions la formation d'un hydrogel composé de CHT et d'HA. L'objectif est de créer un hydrogel physique par formation d'un complexe de polyélectrolytes.

1.2.1. Propriétés viscoélastiques du CHT:HA

Une étude préliminaire a été réalisée pour valider les paramètres d'amplitude et de fréquence à utiliser pour être dans la RVL. Les propriétés rhéologiques des hydrogels de CHT:HA avec la formulation (5:1) ont été évaluées en fonction de la fréquence et de l'amplitude. Une concentration de 5 % CHT a été retenue en raison de ses propriétés viscoélastiques, comme en témoigne un module G' plus élevé que celui des autres concentrations testées. De plus, cette formulation présente une meilleure solubilité dans l'acide lactique, contrairement aux concentrations supérieures.

1.2.1.1. Balayage en amplitude

Les propriétés viscoélastiques du système CHT:HA (5:1) ont été étudiées en fonction de l'amplitude de cisaillement, en comparaison à la formulation sans HA (CHT 5%). L'objectif étant d'évaluer l'influence du HA sur les propriétés viscoélastiques du système CHT:HA. La figure 23 montre l'évolution des modules G' et G'' des hydrogels de CHT et CHT:HA en fonction de l'amplitude de cisaillement ($\varepsilon = 10^{-1} - 10^3 \%$) à une fréquence ($\omega = 6,28$ rad/s) à 25°C.

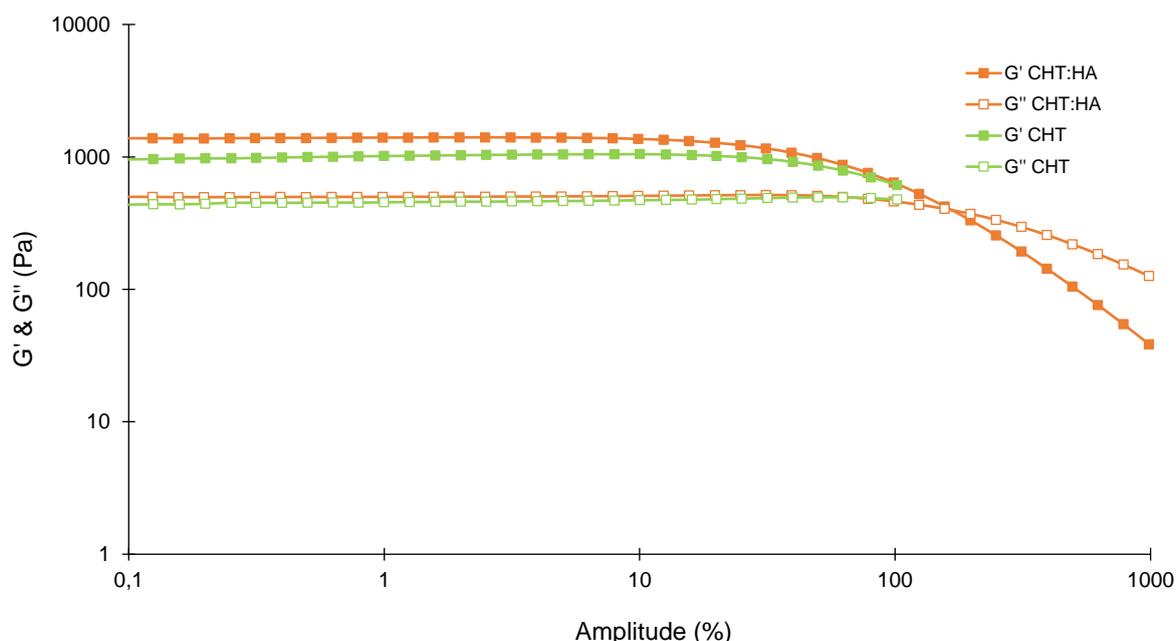


Figure 23 : Module de stockage (G') et module de perte (G'') en fonction de l'amplitude de cisaillement ($\epsilon = 10^{-1} - 10^3 \%$). $\omega = 6,28 \text{ rad/s}$, $T = 25^\circ\text{C}$ pour les hydrogels de CHT:HA (5:1) et CHT 5% ($n=3$), solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}

Les valeurs de G' et G'' sont constantes (domaine linéaire viscoélastique) jusqu'à une amplitude de 10%, G' fléchit ensuite au seuil d'écoulement (156%). G' est supérieur à G'' au niveau du plateau témoignant de la formation d'un hydrogel au comportement de solide élastique, ce comportement s'étend sur une gamme de déformation allant jusqu'à 10%.

L'incorporation du HA modifie les propriétés viscoélastiques du système tout en maintenant un comportement global similaire à celui de la formulation contenant le CHT seul. La présence de HA se traduit néanmoins par une élévation du module élastique G' , indiquant une réponse davantage élastique. À une déformation de 1%, le module G' atteint 1396 Pa pour la formulation CHT:HA, contre 1015 Pa pour CHT, tandis que le module visqueux G'' s'élève respectivement à 498 Pa et 454 Pa. A la suite de ces résultats, une amplitude de déformation de 1% a été retenue pour la suite de l'analyse rhéologique, afin de rester dans le domaine viscoélastique linéaire.

1.2.1.2. Balayage en fréquence

La figure 24 illustre le comportement viscoélastique des hydrogels CHT:HA et CHT en fonction de la fréquence angulaire (0,6 à 600 rad/s), avec une amplitude de 1% et à une température de 25 °C.

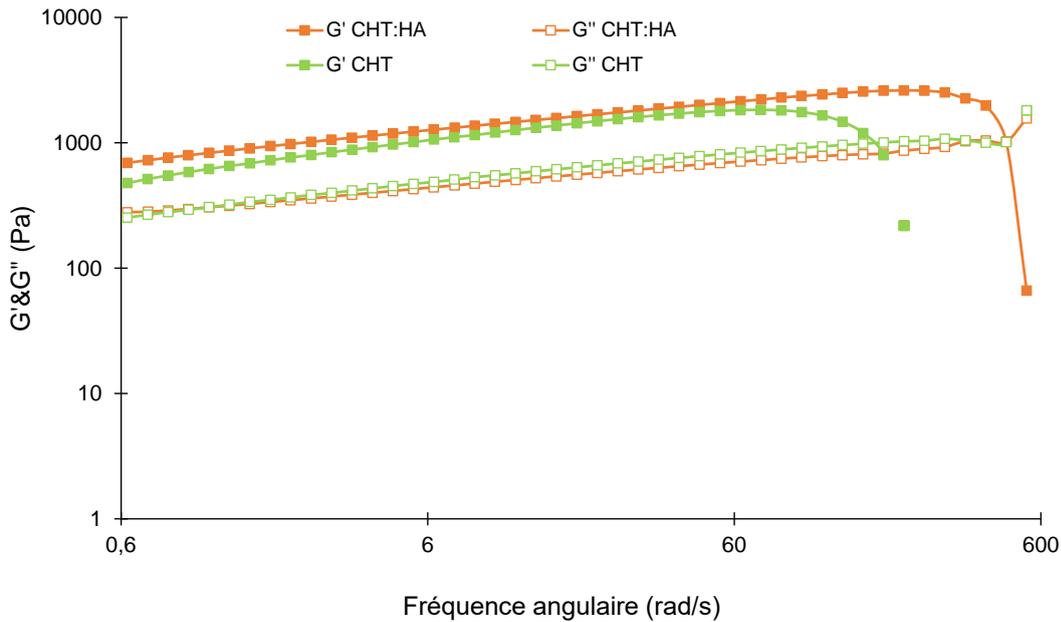


Figure 24 : Module de stockage (G') et module de perte (G'') en fonction de la fréquence angulaire ($\omega = 0,6- 600 \text{ rad/s}$), $\varepsilon = 1\%$, $T = 25^\circ\text{C}$ pour les hydrogels CHT:HA (5:1) et CHT 5% ($n=3$), le solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

Les résultats montrent que pour l'hydrogel de CHT:HA, G' est supérieur à G'' . Au-delà de 180 rad/s pour CHT, et de 462 rad/s pour CHT:HA, les deux modules se croisent (point d'écoulement), provoquant la déstructuration du réseau polymère enchevêtré. Le point d'écoulement pour CHT:HA se produit à 462 rad/s, et pour CHT, il se produit à 180 rad/s. Cela signifie également que le gel de CHT:HA est mécaniquement plus résistant que le gel de CHT seul. Ceci provient de la formation d'un complexe de polyélectrolytes résultant des interactions ioniques entre les ammoniums du CHT et les carboxylates de l'HA conduisant à un hydrogel physique plus élastique résistant mieux aux fréquences élevées de cisaillement.

En conclusion, l'ajout d'HA dans l'hydrogel renforce son comportement élastique par rapport au CHT seul grâce à la formation d'un complexe de polyélectrolytes formant un réseau réticulé physiquement.

1.3. Etude de la cohésion des hydrogels de CHT et CHT:HA en milieu aqueux

Les solutions de CHT:HA et CHT ont été injectées au moyen d'une seringue dans le PBS (pH=7,4) formant un cordon plus ou moins cohésif, ou stable sous agitation. La cohésion et la stabilité de ces cordons d'hydrogels en milieu physiologique a été suivie pendant 7 jours (figure 25).

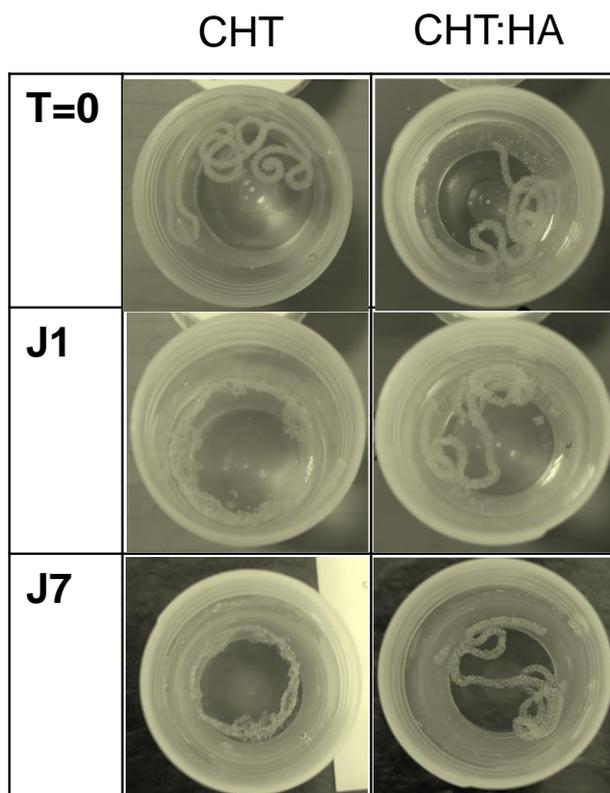


Figure 25 : Etude de la stabilité des hydrogels de CHT:HA (5:1) et CHT 5%, dans le PBS (37°C, 80 rpm) pendant 7 jours.

Les résultats montrent la formation de cordons d'hydrogel de CHT et CHT:HA dès leur injection dans la solution de PBS à 25°C. On observe également que le cordon de l'hydrogel de CHT ne se dissout pas immédiatement dans le PBS. La formation spontanée du cordon est due à la déprotonation des groupes amines du CHT, (le CHT n'est pas soluble à pH neutre), et au phénomène de coacervation par formation d'interactions hydrophobes entre les chaînes du CHT. De même pour l'hydrogel de CHT:HA, on observe l'absence de dissolution dans le PBS suite à une coacervation complexe par formation de complexe de polyélectrolyte.

Par la suite, les pots contenant les hydrogels ont été placés dans un incubateur à 37°C, sous agitation orbitale (80 rpm), pendant 7 jours. Pour l'hydrogel de CHT, les résultats révèlent une perte de stabilité à long terme dans le PBS (37°C, 80 rpm), avec un rétrécissement de l'hydrogel, visible par une réduction de son diamètre, conduisant à une perte de sa structure. Ceci montre la faible cohésion du cordon extrudé. Toutefois, l'hydrogel de CHT:HA, a montré une meilleure stabilité, même si ce dernier a présenté un gonflement sans pour autant impacter sa cohésion, s'expliquant par un renforcement des interactions ionique entre les deux polymères.

En conclusion, l'incorporation du HA confère une meilleure stabilité à l'hydrogel de CHT, en raison d'une interaction physique entre les deux polymères, favorisant la formation d'un réseau d'hydrogel insoluble dans le PBS et stable dans le temps

Pour ce système, nous allons étudier la formation d'un hydrogel comportant une double réticulation (physique et chimique) et l'impact sur les propriétés rhéologiques de ce système.

2. Synthèse des hydrogels chimiques

Dans cette partie, nous proposons d'étudier les propriétés rhéologiques du CHT seul puis du système CHT:HA réticulés par MDo.

2.1. Réticulation des hydrogels de CHT par la MDo

La formulation de CHT 2% a été choisie au regard de son comportement de solution visqueuse immédiatement après la préparation du mélange CHT:MDo ($G'' > G'$) (voire les études en fonction de la fréquence et l'histogramme de la figure 19). Ainsi la transition sol-gel sera observable. En revanche, dans le cas de la solution de CHT 5%, celle-ci est déjà un gel élastique, la transition sol-gel ne sera pas observable. Le test a été réalisé en utilisant 0,4% de MDo. La composition des formulations étudiées est résumée dans le tableau 9.

Tableau 9 : Composition des formulations de CHT:MDo. Le volume total = 1,5 mL.

Formulation	CHT (%)	AL (%)	MDo (%)
2:0,4	2%	1%	0,4%
5:0,4	5%	1%	0,4%

Les modules G' et G'' ont été suivis en fonction du temps à une amplitude ($\varepsilon = 1\%$) et à une fréquence de $\omega = 6,28$ rad/s. Un croisement entre G' et G'' signifie la présence d'un point de gel

149.

La figure 26 (A, B) montre l'évolution des modules viscoélastiques (G' , G'') en fonction du temps pour le formulation de CHT:MDo (2:0,4) en comparaison avec CHT 2% , puis la formulation de CHT:MDo (5:0,4) en comparaison avec CHT 5%.

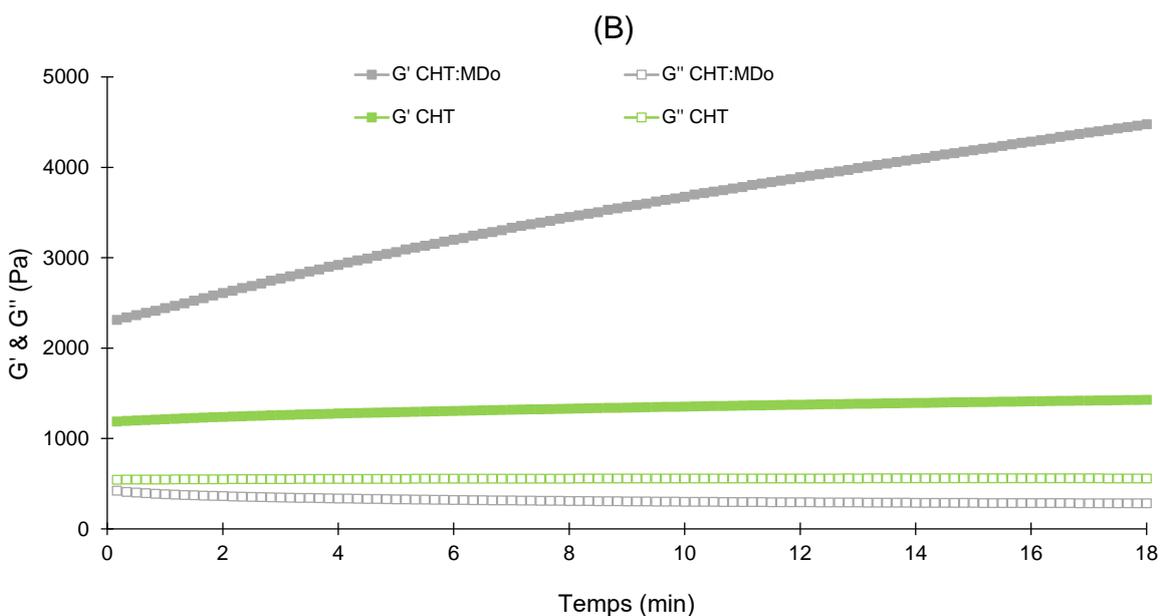
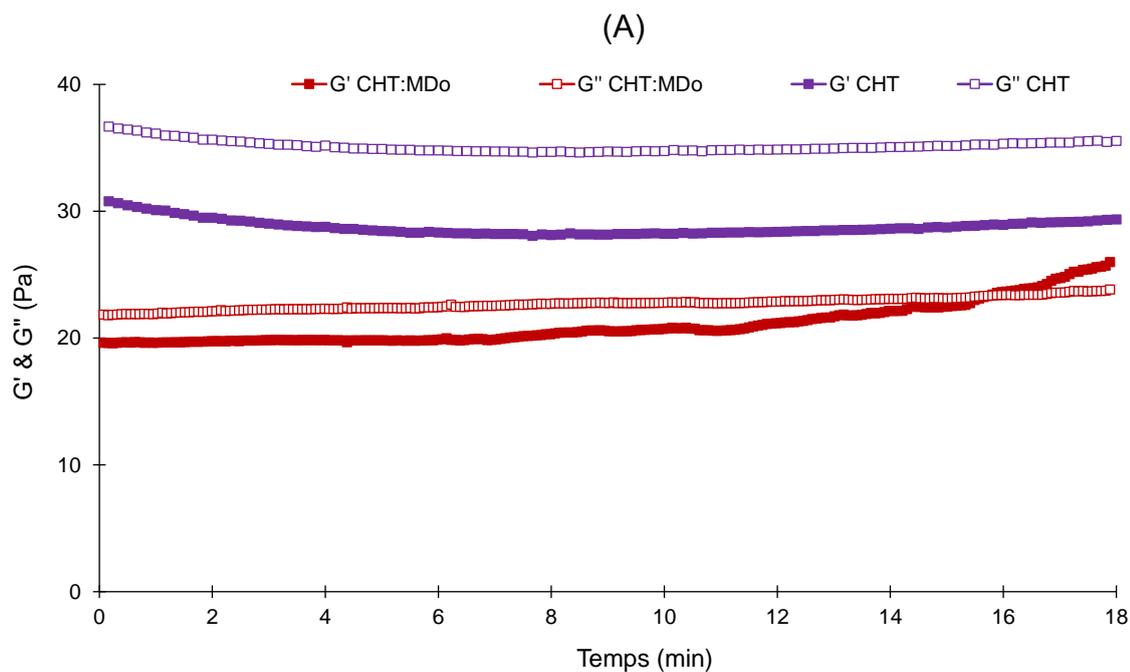


Figure 26 : (A) Module de stockage (G') et module de perte (G'') en fonction du temps pour la formulation de CHT:MDo (2:0,4) et CHT 2%, (B) Courbes G' et G'' (Pa) en fonction du temps (min) pour les formulations de CHT:MDo (5:0,4) et CHT 5%. $\omega = 6,28$ rad/s, $\varepsilon = 1\%$, $T = 25^\circ\text{C}$, le solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

L'évolution de G' et G'' en fonction du temps permet de déterminer la cinétique de gélification de la solution de CHT 2% contenant 0,4% de la MDo est représentée par la figure 26A. Nous observons qu'à $t=0$ que la formulation de CHT:MDo (2:0,4) présente un comportement de solution visqueuse ($G'' > G'$), puis le module élastique (G') augmente, entraînant un croisement

de G' et G'' à 16 min. Cela montre la présence d'un point de gel, alors que pour la formulation sans MDo (CHT 2%), comme attendu, nous n'observons pas de point de croisement (figure 26A).

L'hydrogel CHT:MDo avec la formulation (5:0,4) présente un comportement de solide élastique ($G' > G''$) dès la préparation du gel ($t = 0$), comme cela a été observé pour la solution de CHT 5%. Cependant, on observe des valeurs de G' pour l'hydrogel de CHT:MDo (5:0,4) ($2312 \text{ Pa} \pm 379 \text{ Pa}$) bien supérieures au G' de la solution de CHT 5% ($1188 \text{ Pa} \pm 53 \text{ Pa}$) (figure 26B) soit une augmentation de plus de 94%. De même, le module G'' est plus bas pour l'hydrogel CHT:MDo (5:0,4) ($422 \text{ Pa} \pm 35 \text{ Pa}$) en comparaison avec l'hydrogel CHT ($544 \text{ Pa} \pm 44 \text{ Pa}$), montrant que la composante visqueuse de l'hydrogel réticulé avec le MDo est réduite de près de 22%. Au bout de 18 minutes, le module G' de la formulation CHT:MDo (5:0,4) atteint $4475 \pm 598 \text{ Pa}$, alors que celui de la solution de CHT 5% est de $1426 \pm 75 \text{ Pa}$. Cette augmentation d'environ 214 % témoigne d'un renforcement du comportement élastique de l'hydrogel CHT:MDo.

La figure 27 donne les valeurs de $\tan \delta$ (G''/G') des formulations de CHT avec ou sans MDo.

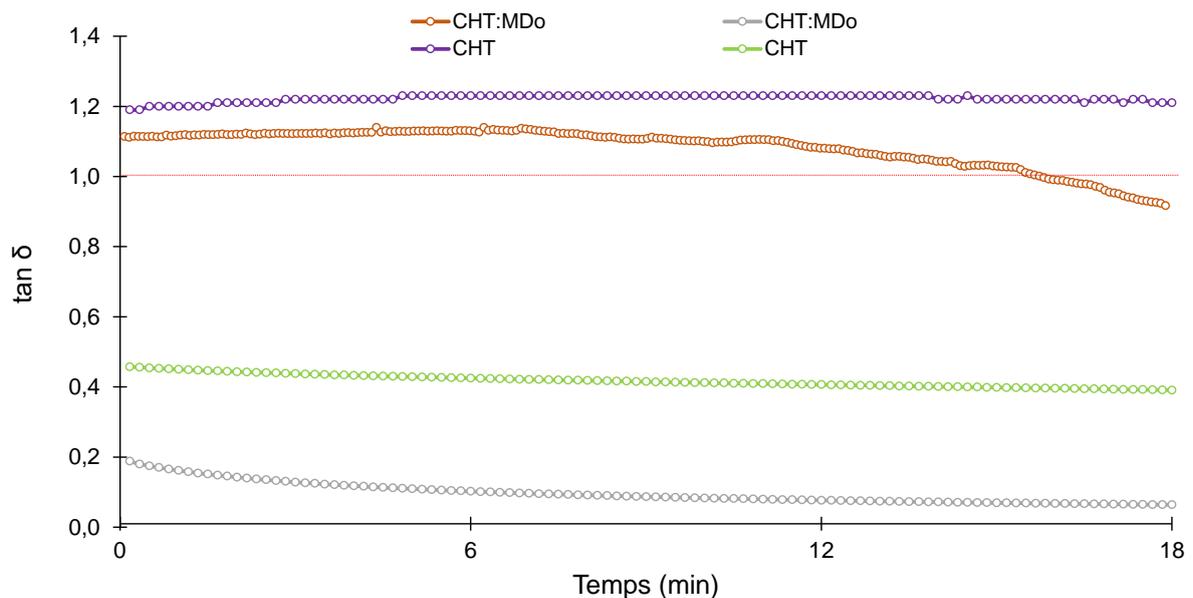


Figure 27 : Facteur de perte ($\tan \delta$) pour les formulations CHT:MDo (2:0,4) et (5:0,4) ainsi que pour les témoins CHT 2% et 5%. $\omega = 6,28 \text{ rad/s}$, $\varepsilon = 1\%$, $T = 25^\circ\text{C}$, ($n=3$), le solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

Les résultats montrent des valeurs de $\tan \delta$ ($t=0$) de 0,19 et 0,46 pour les hydrogels CHT:MDo (5:0,4) et CHT 5% respectivement, alors que les formulations CHT:MDo (2:0,4) et CHT 2% affichent des valeurs de $\tan \delta$ de 1,11 et 1,19 respectivement. On note également que l'évolution de $\tan \delta$ en fonction du temps a permis d'enregistrer des valeurs de $\tan \delta$ basse

(0,06) pour la formulation CHT:MDo (5:0,4) qui inférieure à 0,1. Ces résultats montrent que la formulation avec MDo présente un comportement plus élastique en comparaison à la formulation sans MDo et donc la formation d'un hydrogel fort. En effet, la réticulation avec la MDo augmente le comportement élastique des hydrogels de CHT 5%, suite à la mise en place d'un réseau covalent entre les chaînes polymères du CHT, renforçant le réseau tridimensionnel de l'hydrogel et apporte plus de stabilité et d'élasticité à un hydrogel déjà formé initialement par des liaisons non covalentes.

2.2. Etude rhéologique de l'hydrogel CHT:HA:MDo

Une étude rhéologique des hydrogels de CHT:HA:MDo avec la formulation (5:1:0,4) a été réalisée. Les paramètres constants de fréquence 6,28 rad/s et d'amplitude 1% ont été fixés comme précédemment. Les formulations testées sont décrites dans le tableau 10 (ci-dessous) :

Tableau 10 : Formulation des hydrogels de CHT:HA, CHT:HA:MDo. Volume total = 1,5 mL.

Formulations	CHT (%)	HA (%)	MDo (%)	AL (%)
5:1	5%	1%		1%
5:1:0,4	5%	1%	0,4%	1%

La figure 28 montre les courbes G' et G'' en fonction du temps pour les hydrogels de CHT:HA:MDo (5:1:0,4) et CHT:HA (5:1).

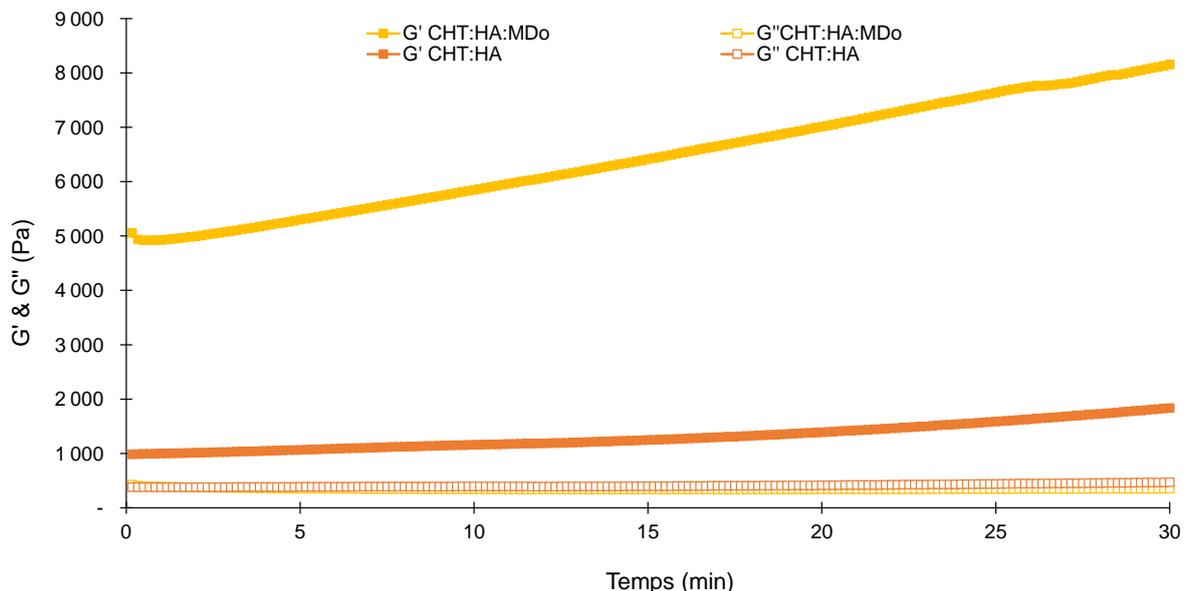


Figure 28 : Module de stockage (G') et module de perte (G'') (Pa) en fonction du temps (min), des hydrogels de CHT:HA (5:1) et CHT:HA:MDo (5:1:0,4) , $\omega = 6,28 \text{ rad/s}$, $\varepsilon = 1\%$, $T = 25^\circ\text{C}$, ($n=3$), le solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

On observe l'augmentation de G' en fonction du temps pour les 2 formulations, G'' restant stable. La formulation CHT:HA:MDo a montré un G' supérieur (5058 ± 189) à celui de la formulation sans MDo (1349 ± 212 Pa), soit une augmentation de plus de 275%. Cependant, le module de perte de la formulation CHT:HA:MDo diminue avec le temps ($339,2 \pm 20$ Pa) et reste inférieur à celui de la formulation CHT:HA ($404,5 \pm 27,3$ Pa). Nous notons également que le $\tan \delta$ est plus bas pour la formulation contenant le MDo, en effet, $\tan \delta$ varie entre 0,05 et 0,08 pour la formulation CHT:HA:MDo, alors que pour la formulation CHT:HA, $\tan \delta$ varie entre 0,25 et 0,35. Cela montre que le MDo augmente significativement la composante élastique du système CHT:HA.

La figure 29 présente un récapitulatif des valeurs des modules de stockage (G') et de perte (G'') pour les différentes formulations : CHT, CHT:HA, CHT:MDo et CHT:HA:MDo.

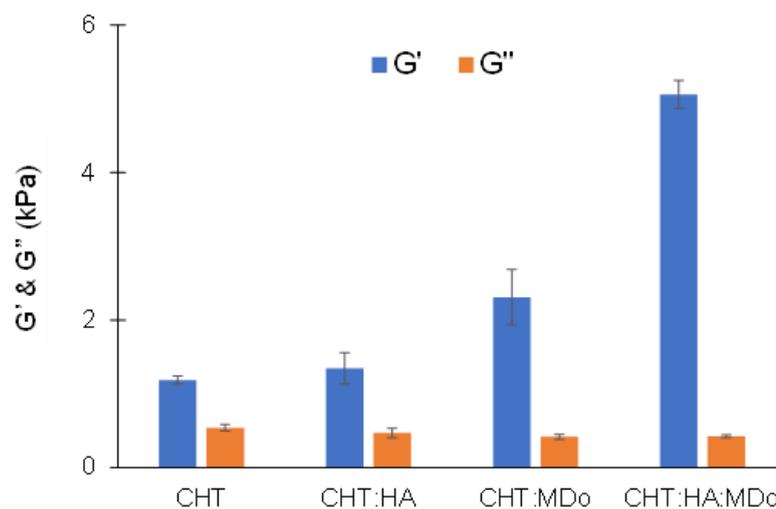


Figure 29 : Module de stockage (G') et module de perte (G'') (kPa) à $t=0$, pour les hydrogels CHT 5%, CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA (5:1) et CHT:HA:MDo (5:1:0,4). $\omega = 6,28$ rad/s, $\varepsilon = 1\%$, $T = 25^\circ\text{C}$, ($n=3$), le solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

L'ajout de la MDo améliore significativement les propriétés élastiques des systèmes à base de CHT ainsi que du mélange CHT:HA. Par ailleurs, l'incorporation d'HA contribue à l'augmentation de la composante élastique du système CHT:MDo. En effet, G' augmente de 119 % pour le système CHT:HA:MDo par rapport à CHT:MDo.

En conclusion, le MDo et l'HA renforce le comportement élastique des hydrogels de CHT grâce à la formation d'un complexe de polyélectrolytes dans le cas de l'ajout de d'HA et d'une réticulation chimique dans le cas d'ajout de MDo. D'autre part, cette étude met en évidence la réticulation chimique du CHT par le MDo, conduisant à des hydrogels « forts », par formation d'un réseau covalent. P. Sánchez-Cid *et al.* a montré que les hydrogels chimiques de CHT réticulés par la génipine avaient un $\tan \delta$ autour de 0,075, et cela considéré comme un gel fort

puisque $\tan \delta$ est inférieur à 0,1¹⁵⁰, Ce comportement est également observé pour nos formulations à base de MDo (CHT:HA:MDo), dont la valeur de $\tan \delta$ est de $0,08 \pm 0,004$, confirmant leur nature fortement réticulée. Les hydrogels physiques de CHT:HA ont présenté une valeur de $\tan \delta$ de $0,19 \pm 0,03$, traduisant un comportement élastique, en comparaison avec les hydrogels CHT:pectine qui présentent des valeurs autour de 0,5, également inférieures à 1, mais suggérant une élasticité moins marquée. Dans les deux cas, ces valeurs indiquent un comportement typique des gels faibles, capables de se déformer sans rupture, tout en conservant une certaine cohésion mécanique¹⁵¹.

L'enregistrement de G' et G'' pour les solutions d'HA, avec ou sans MDo (figure 30) a montré que l'ajout de la MDo (0,4%) aux solutions d'HA (1%) ne modifie pas son comportement viscoélastique et maintien un état de fluide viscoélastique pour les 2 formulations. Ce résultat signifie l'absence de réaction chimique entre l'HA et le MDo.

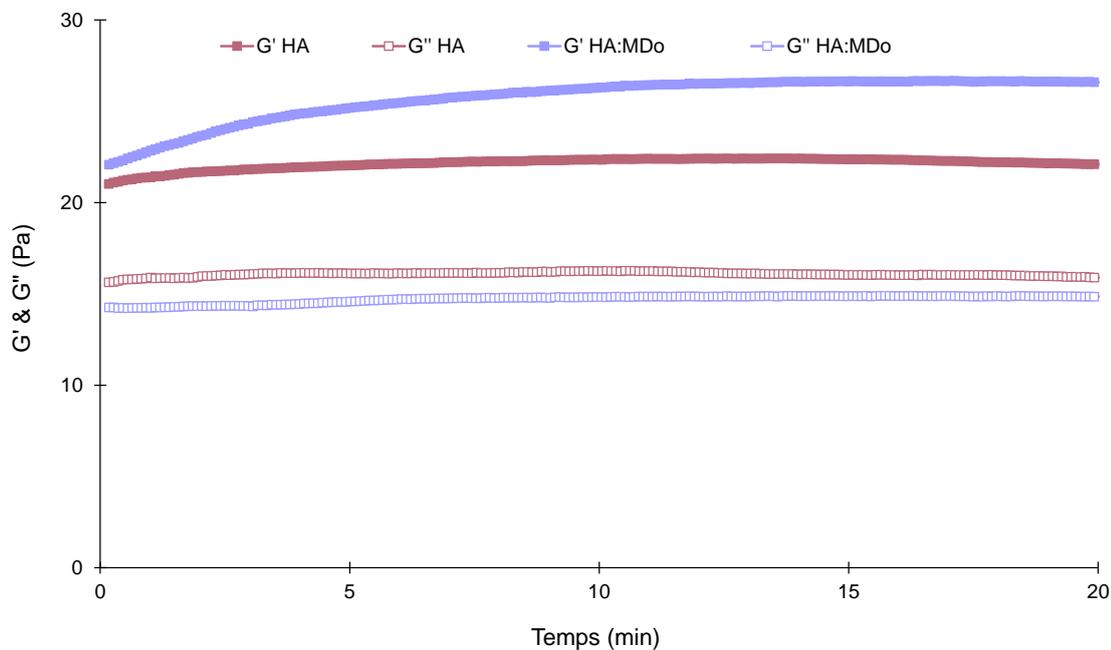


Figure 30 : Module de stockage (G') et module de perte (G'') en fonction du temps (min) pour les formulations de HA 1% et HA:MDo (1:0,4), $\omega = 6,28 \text{ rad/s}$, $\varepsilon = 1\%$, $T = 25^\circ\text{C}$, ($n=3$). le solvant acide lactique dans l'eau 1%_{v/v}.

Le tableau 11 présente un récapitulatif des valeurs des modules de stockage (G'), de perte (G'') et du facteur de perte ($\tan \delta$) pour l'ensemble des formulations analysées.

Tableau 11 : récapitulatif des valeurs de G' et G'' (kPa), $\tan \delta$ pour les différentes formulations à $t=0$.

Formulations	Module G' (kPa)	Module G'' (kPa)	Facteur de perte
CHT 2%	0,0308	0,0367	1,19
CHT:MDo (2:0,4)	0,0196	0,0218	1,11
CHT 5%	$1,18 \pm 0,05$	$0,54 \pm 0,04$	$0,46 \pm 0,02$
CHT:MDo (5:0,4)	$2,3 \pm 0,37$	$0,42 \pm 0,03$	$0,19 \pm 0,03$
CHT:HA (5:1)	$1,35 \pm 0,2$	$0,47 \pm 0,027$	$0,35 \pm 0,02$
CHT:HA:MDo (5:1:0,4)	$5 \pm 0,189$	$0,43 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,004$

L'interprétation des données fournies dans le tableau 11 met en évidence deux catégories d'hydrogels, différenciées par leur profil rhéologique. 1) CHT 2 % et CHT:MDo (2:0,4), affichent des valeurs de $\tan \delta$ supérieures à 1 (à $t=0$), soit 1,19 et 1,11 respectivement, révélant un comportement principalement visqueux. En comparaison, la formulation CHT 5 % présente un $\tan \delta$ modéré, bien supérieur à 0,1 ($0,46 \pm 0,02$), traduisant une structure non réticulée. Quant au système CHT:HA, bien qu'un peu plus élastique, il reste dans la catégorie des gels dits « faibles » en raison du $\tan \delta$ supérieur à 0,1 ($0,35 \pm 0,02$). En revanche, l'ajout combiné d'HA et de la MDo dans la formulation CHT:HA:MDo provoque une nette diminution de $\tan \delta$ et reste bien inférieur à 0,1, atteignant une valeur aussi basse que $0,08 \pm 0,004$. Cette réduction, associée à un écart important entre G' et G'' ($G' = 5$ kPa contre $G'' = 0,43$ kPa), souligne une forte prédominance du caractère élastique de cette formulation. Ces propriétés traduisent un réseau polymère bien structuré et mécaniquement stable, qualifiant cette formulation d'« hydrogel fort »¹⁵²

Conclusion

La formulation de CHT 5% a été choisie au regard de ses propriétés viscoélastiques supérieures résultant des interactions physiques (liaisons hydrogènes, interaction hydrophobes, Forces de Van der Waals) au sein même du CHT¹¹.

Dans cette étude, l'association du CHT avec l'HA a conduit à la formation d'un hydrogel physique stable, caractérisé par des propriétés viscoélastiques renforcées. Une autre approche repose sur la réticulation chimique du CHT à l'aide de la MDo, un polymère modifié. La MDo, utilisée dans la formulation (2:0,4), a démontré sa capacité à réticuler la solution de CHT, comme en témoigne le croisement des modules G' et G'' , indiquant une transition sol-gel. A une concentration de 0,4 %, elle améliore les propriétés viscoélastiques du CHT 5 %, provoquant ainsi la formation d'un hydrogel chimique. Par ailleurs, la MDo permet également

d'augmenter les propriétés viscoélastiques du système CHT:HA, comme observé dans la formulation de CHT:HA:MDo (5:1:0,4). Cette combinaison conduit à la formation d'un réseau de polymères doublement réticulé, intégrant à la fois une réticulation physique et chimique.

Cette étude se poursuivra par la caractérisation des différentes formulations étudiées dans ce chapitre sous la forme d'éponges. Un autre agent réticulant, l'HMTA, sera ajouté. En effet, sa réticulation nécessite une décomposition thermique ou un milieu acide. Ainsi, une analyse physico-chimique des éponges contenant de l'HMTA sera réalisée après l'application d'un traitement thermique.

Chapitre 2 : Conception et évaluation des éponges à base de CHT

Dans le chapitre précédent, nous avons observé que l'utilisation de la MDo comme agent réticulant chimique améliorait les propriétés élastiques des hydrogels de CHT. Nous avons également constaté que l'ajout d'HA renforçait leurs propriétés viscoélastiques en augmentant le module G' de la formulation avec HA, et cela sans perturber le processus de réticulation induit par la MDo. Nous avons observé la formation d'un hydrogel réticulé de CHT:HA:MDo.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons à la caractérisation physicochimique des hydrogels lyophilisés pour la formation d'éponges poreuses. Nous allons étudier différentes éponges ; les éponges CHT et CHT:HA , puis les systèmes contenant l'agent réticulant MDo, à base de CHT et du mélange CHT:HA, et enfin, les éponges de CHT et CHT:HA réticulés par l'HMTA, cette petite molécule se décompose en formaldéhyde sous l'effet d'un traitement thermique. L'objectif est d'évaluer la réticulation du CHT par l'HMTA après traitement thermique des éponges de CHT:HMTA avec une concentration de 1% d'HMTA.

Parallèlement, des études seront menées pour comparer les éponges non réticulées chimiquement et les systèmes d'éponges réticulées par MDo et par l'HMTA.

1. Analyse infrarouge (ATR-IRTF) des éponges

Les éponges de CHT, HA, CHT:HA, CHT:MDo et CHT:HA:MDo ont été analysés par ATR-FTIR (figure 31).

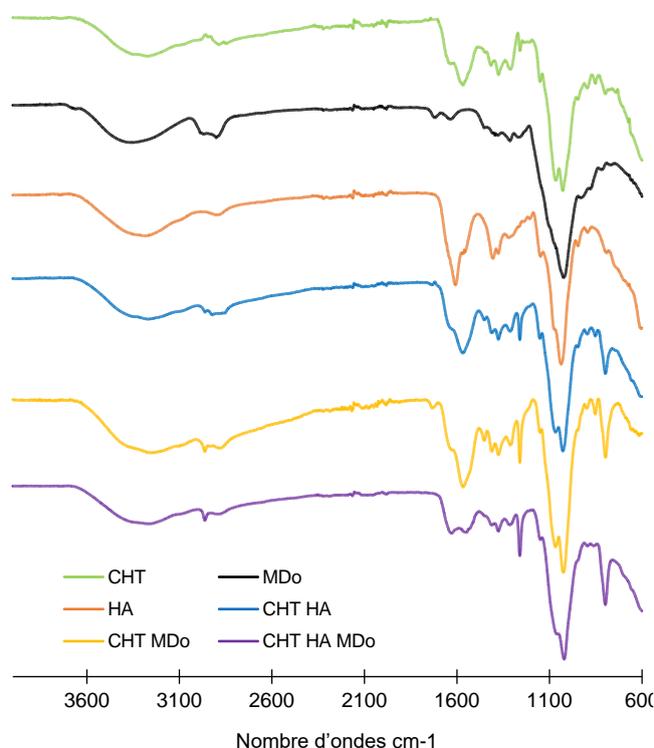


Figure 31 : Spectres ATR-IRTF des poudres de MDo et HA en poudre, et éponges de CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4).

Le spectre de l'éponge CHT présente de larges bandes au-dessus de 3000 cm^{-1} correspondant aux vibrations d'étirement des groupes OH et -NH_2 , tandis que la bande à 2885 cm^{-1} est associée à l'étirement des liaisons C-H. La bande à 1566 cm^{-1} correspond à la liaison N-H (amide II) et 1310 cm^{-1} à l'étirement du C-N (amide III). La bande à 1375 cm^{-1} correspond à la déformation du CH_3 et celle à 1027 cm^{-1} correspond à l'élongation de la liaison C-O. La bande à 1259 cm^{-1} correspond à la vibration de déformation de l'acide carboxylique, et le pic à 797 cm^{-1} à la vibration de déformation de la liaison C-H ¹⁵³.

Dans le spectre du MDo, la bande à 1716 cm^{-1} est associée à l'étirement de la liaison C=O du groupe aldéhyde. Cela prouve l'oxydation du MD en MDo ¹⁵⁴. Cette bande n'est pas présente dans les spectres des éponges de CHT et apparaît décalée à 1726 cm^{-1} dans le spectre de l'éponge CHT:MDo, ce qui suggère la conversion partielle des groupes aldéhydes en liaisons imines lors de la réaction du MDo avec le CHT ¹²⁴. Le spectre de l'HA présente des bandes d'absorption caractéristiques, y compris un pic large à 3327 cm^{-1} attribué à la vibration d'étirement -OH. Le pic à 2876 cm^{-1} correspond à la vibration d'étirement CH_2 . Les bandes à 1610 cm^{-1} et 1403 cm^{-1} sont associées aux vibrations d'étirement symétrique et asymétrique du groupe COO^- , respectivement. Une bande observée à 1034 cm^{-1} est également liée à la vibration d'étirement C-O-C dans les unités de répétitions de l'HA ¹⁵⁵. Dans les spectres CHT:HA et CHT:HA:MDo, l'absence des bandes à 1610 et 1403 cm^{-1} signifie la formation d'un complexe polyélectrolyte entre le CHT et l'HA¹⁰¹.

Certains auteurs ont rapporté des positions de pic de C=N dans la base de Schiff à proximité de 1636 cm^{-1} ¹⁵⁶, tandis que d'autres ont rapporté la détection de pics caractéristiques entre 1610 et 1665 cm^{-1} ^{157,158}, et R.Tang *et al.* ont rapporté la formation de la base de Schiff à 1653 cm^{-1} ¹⁵⁹. Dans notre étude, nous avons observé une bande autour de 1630 cm^{-1} dans le spectre CHT:HA:MDo qui pourrait être attribuée à la liaison imine. Cependant, nous n'avons pas observé cela dans le CHT:MDo mais plutôt dans l'éponge de CHT:HA:MDo, parce que la concentration de MDo était relativement plus faible par rapport au CHT 5%. A. Serrero *et al.* a rapporté que les groupements imine sont difficiles à caractériser en raison de la nature réversible de cette liaison. En outre, le signal IR pourrait être masqué par des pics multiples tels que le groupe amide et l'ammonium NH_3^+ du CHT ¹²⁴.

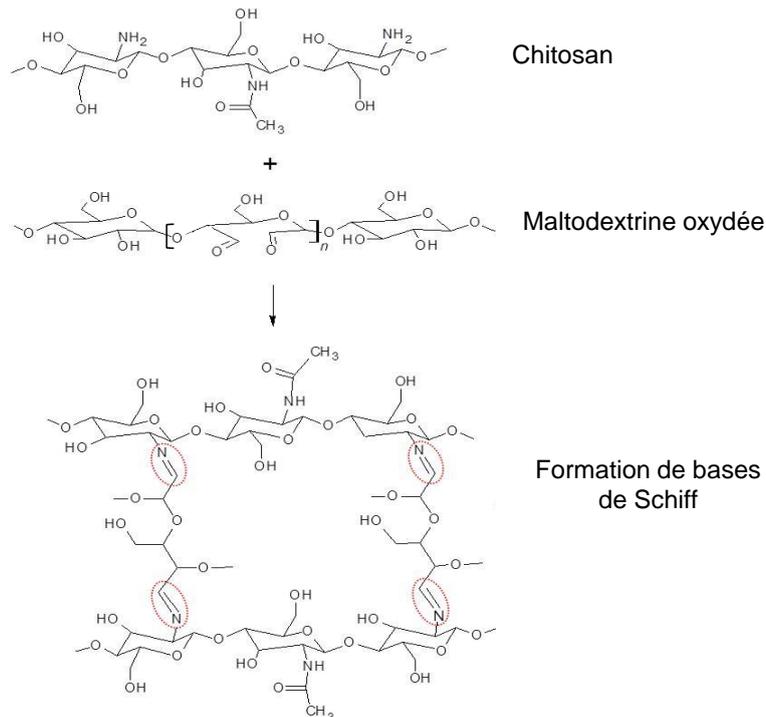


Figure 32 : Représentation de la réaction de réticulation du CHT par le polymère de maltodextrine oxydé (MDo), la base de Schiff étant formée à la fin de la réaction.

Dans le cas de la réticulation avec HMTA, les éponges de CHT:HMTA avec et sans traitement thermique (TT :130°C, 30 min) ont été analysés dans un premier temps. L'objectif de cette étude est de montrer la décomposition de l'HMTA en formaldéhyde suite au traitement thermique et démontrer la réticulation du CHT avec le formaldéhyde.

La figure 33 montre les spectres des éponges de CHT, CHT:HMTA avec ou sans traitement thermique (TT) et enfin l'HMTA (poudre).

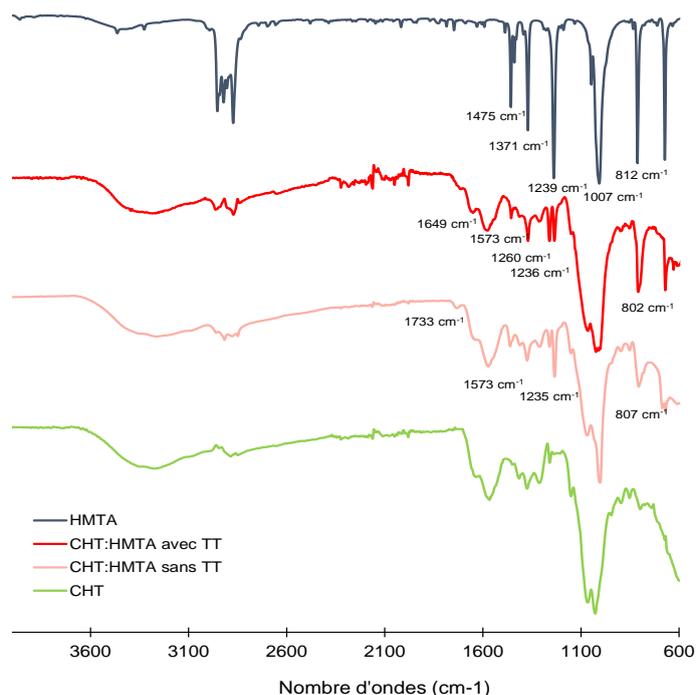


Figure 33 : spectres ATR-IRTF de la poudre d'HMTA, des éponges de CHT 5%, CHT:HMTA (5:1)+TT CHT:HMTA (5:1) sans TT. TT : traitement thermique.

Le spectre de l'HMTA montre la présence d'un pic d'absorption autour de 812 cm^{-1} correspond à l'élongation de la liaison C-N de l'HMTA ¹⁶⁰. Le pic à 1007 cm^{-1} est attribué aux vibrations d'étirement des liaisons C-H des amines tertiaires de l'HMTA ¹⁶¹. Le pic situé à 1239 cm^{-1} , correspondant à l'oscillation du CH_2 présent dans l'HMTA¹⁶⁰. Ce pic est présent à la position 1234 cm^{-1} au niveau des spectres correspondants aux éponges de CHT:HMTA avec ou sans traitement thermique, cependant, l'intensité de ce pic est moins importante pour le spectre CHT:HMTA avec traitement thermique, ce qui peut apporter une indication du processus de décomposition de l'HMTA. De plus, le pic à 1260 cm^{-1} présent au niveau du spectre de CHT:HMTA traité thermiquement correspond aux oscillations du CH_2 du formaldéhyde provenant de la décomposition de l'HMTA, en effet, ce pic n'est pas présent au niveau du spectre de l'HMTA ni celui de l'éponge CHT:HMTA sans TT ce qui pourrait apporter une indication supplémentaire du processus de décomposition de l'HMTA. Mais cela n'est pas suffisant pour déduire de la présence du formaldéhyde, puis ce que ce dernier est sensé réagir immédiatement avec les amines du CHT et formé des liaisons covalentes.

L'absence du pic autour de 1730 cm^{-1} dans le spectre du CHT:HMTA après traitement thermique (TT) indique la réaction des aldéhydes. En outre, l'analyse du spectre infrarouge de l'échantillon CHT:HMTA avec ou sans traitement thermique révèle la présence d'une bande autour de 1573 cm^{-1} , cette bande est caractéristique des vibrations de déformation des groupes amine primaire $-\text{NH}_2$ du CHT, l'intensité de cette bande est moins importante pour

l'éponge de CHT:HMTA traité thermique en comparaison avec l'éponge non traitée thermiquement, ceci indique la réaction de ces fonctions avec le formaldéhyde libéré par la décomposition thermique de l'HMTA, cependant, cette réaction est partielle. Parallèlement, l'apparition d'une bande à 1649 cm^{-1} dans le spectre de l'échantillon CHT:HMTA+TT, absente dans les autres spectres, appuie la formation de liaisons covalente notamment des ponts méthylène (CHT_2) entre 2 chaines de CHT (figure 34). Cette liaison résulte de la réaction entre le formaldéhyde et les groupes amines du CHT. Ces résultats indiquent ainsi une réticulation chimique partielle du CHT avec le formaldéhyde, résultant de la réaction thermique de l'HMTA.

D'autres techniques d'analyses peuvent être utilisés afin de d'appuyer ces observations, tel que la spectroscopie UV, RMN ou encore la GC- MS pour détecter et identifier les produits de décomposition de l'HMTA.

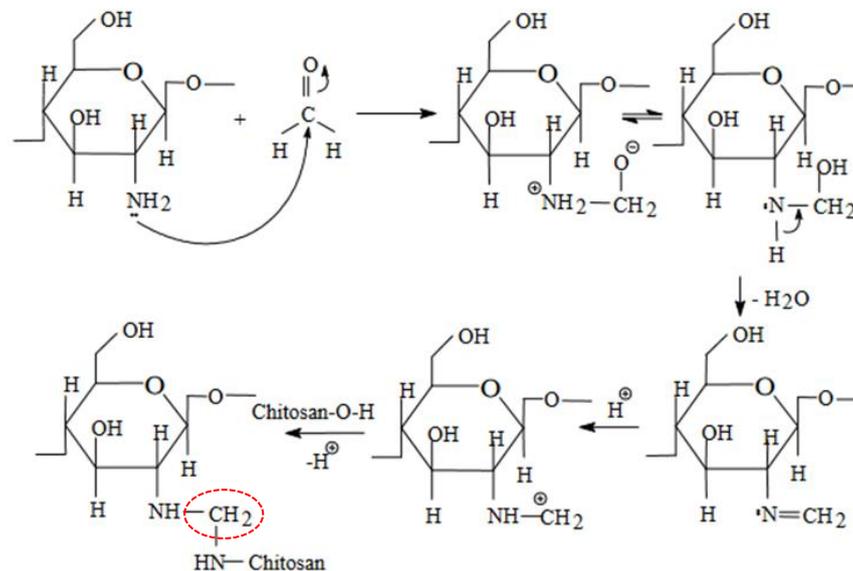


Figure 34 : Réaction de réticulation du CHT par le formaldéhyde, les 2 chaines de CHT sont reliées par un pont méthylène (entouré en rouge) ¹⁶².

En conclusion, l'étude IRTF a révélé la présence de pics caractéristiques dans les éponges réticulées, tant au niveau physique (CHT:HA) que chimique (CHT:HA:MDo), ce qui confirme l'existence d'interactions moléculaires spécifiques entre ces polymères, par la formation de liaisons physiques ou chimiques.

2. Aspect morphologique et structurel

Les éponges ont été obtenues par lyophilisation des hydrogels et présentent toutes une structure poreuse. Toutefois, des différences sont observées en termes de couleur et de structure. Les éponges de CHT et de CHT:HA présentent une structure homogène et compacte avec une teinte blanchâtre, tandis que celles de CHT:MDo et CHT:HA:MDo et

CHT:HMTA+TT présentent une couleur légèrement jaunâtre. Visuellement, les éponges réticulées présentent une texture non homogène en comparaison avec les éponges non réticulées qui ont une apparence homogène et régulière (figure 35).

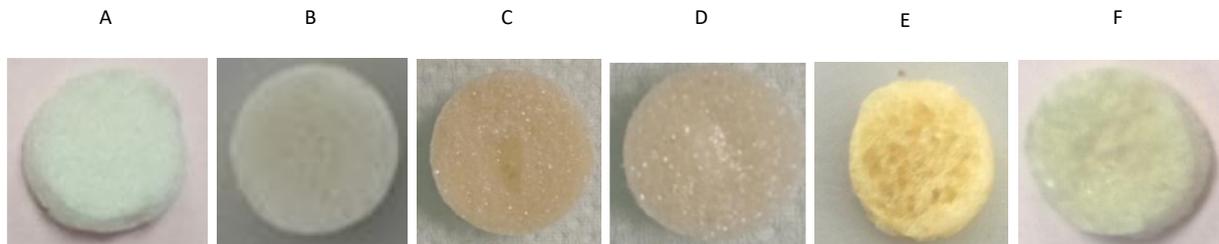


Figure 35 : Image des éponges de CHT 5% (A), CHT:HA (5:1) (B), CHT:MDo (5:0,4) (C) et CHT:HA:MDo (5:1:0,4) (D), CHT:HMTA (5:1)+TT (E). CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT (F).

3. Etude de gonflement des éponges

La capacité d'absorption d'eau par une éponge est un paramètre essentiel. En effet, cela permet aux éponges de favoriser l'interaction avec le sang pendant la procédure chirurgicale (micro-fracture). Selon S. Escalante *et al.* le mécanisme d'absorption doit être le plus rapide possible et permettre de maintenir le caillot sanguin, il sera ensuite chargé avec des facteurs de croissance et des cellules apportées par le caillot ¹⁰¹. Ceci favorisera l'adhésion et la prolifération des cellules ¹⁶³. De plus, la capacité d'absorption est importante pour pouvoir également imprégner l'éponge en principe actif. L'étude de gonflement a été menée dans le PBS (37°C, 80 rpm) pendant 24 heures, la masse de l'éponge gonflée est mesurée après élimination de l'excès de PBS à l'aide du papier absorbant, la formule utilisée pour calculer ces taux est donnée ci-dessous :

$$\text{Gonflement (\%)} = \left[\frac{m_g - m_0}{m_0} \right] \times 100$$

m_g : masse de l'éponge gonflée dans le PBS. m_0 : masse initiale de l'éponge.

A la fin de la manipulation, les éponges ont été séchées à 60°C afin de relever la masse sèche après gonflement et évaluer la perte de masse (dégradation), la formule utilisée pour calculer les taux des masses restantes est donnée ci-dessous :

$$\text{masse restante (\%)} = \left[1 - \frac{m_0 - m_f}{m_0} \right] \times 100$$

m_f : masse de l'éponge sèche suite à un traitement thermique de 60°C pendant 1 nuit. m_0 : masse initiale de l'éponge.

3.1. Gonflement des éponges réticulées par MDo

La figure 36 montre la cinétique de gonflement des éponges de CHT, CHT:HA, CHT:MDo et CHT:HA:MDo dans le PBS (pH= 7,4).

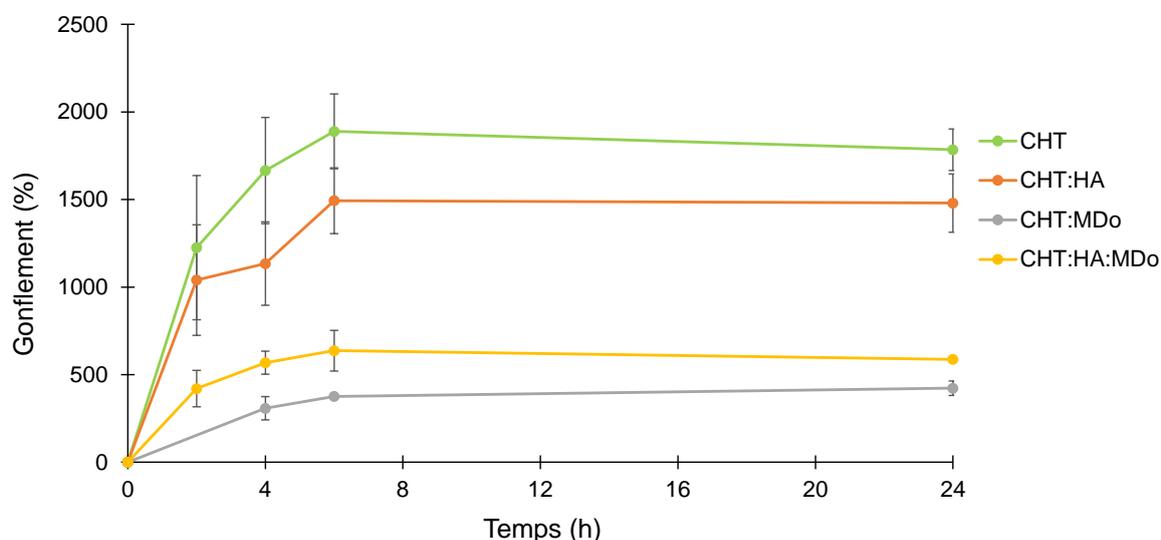


Figure 36 : Cinétique de gonflement des éponges de CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4) dans le PBS (37°C, 80rpm), n=3.

Les résultats montrent que la capacité d'absorption des éponges augmente rapidement pendant les premières heures d'incubation dans le PBS. L'équilibre est atteint après 6 heures de gonflement quel que soit les éponges et ceci est en accord avec l'étude de Y. Deng *et al.*¹⁶⁴ Globalement, nous avons observé un gonflement plus important des éponges de CHT et CHT:HA par rapport aux groupes réticulés chimiquement avec le MDo. En effet, après 24 heures d'incubation, le taux de gonflement était de 1785% ± 119% pour le CHT et 1480% ± 166% pour CHT:HA comparativement aux groupes réticulés, qui présentaient 423% ± 46,8% pour CHT:MDo et 587% ± 10,9% pour CHT:HA:MDo (figure 36). Ceci s'explique par la réticulation chimique du CHT par le MDo et la formation d'un réseau covalent qui limite la mobilité des chaînes de polymères, réduisant la capacité d'absorption d'eau du CHT. Une observation similaire a été rapportée par S.D. Nath *et al.* où la réticulation du système CHT:HA par différentes concentrations de génipine (1 à 4 mg) a montré une diminution du taux de gonflement après 24 heures dans PBS¹⁶³. Un comportement similaire a été observé pour le système CHT:HA, bien que l'HA soit connu pour être un polymère très hygroscopique, l'interaction électrostatique avec le CHT diminue la capacité d'expansion du réseau et par conséquent sa capacité d'absorption d'eau. Par ailleurs, la présence de l'HA dans le système CHT:HA:MDo a permis d'augmenter la capacité d'absorption d'eau du CHT:MDo (+ 39%). Ceci montre que l'HA n'impacte pas la réticulation du CHT par le MDo et qu'il permet grâce à ses groupes hydrophiles d'absorber plus d'eau dans le système et d'entraîner l'expansion du

réseau polymère. Le comportement de gonflement des éponges réticulées physiquement est attribué à la présence de groupes hydrophiles tels que les groupes carboxyle, amine et hydroxyle dans la structure des polymères (CHT et HA). Ainsi, le comportement initial de rapide et forte absorption d'eau est dû à la structure poreuse des éponges CHT et CHT:HA et à son caractère hydrophile. La diminution de l'absorption d'eau par les éponges réticulées chimiquement s'explique par la réduction du nombre de groupes hydrophiles impliqués dans le processus de réticulation chimique du CHT et la formation de liaisons covalentes, réduisant ainsi l'interaction avec l'eau et donc l'expansion du réseau polymère ¹⁶⁵.

Afin de garantir que ces résultats ne soient pas affectés par une dégradation des éponges après 24 heures, la masse sèche des éponges après gonflement a été mesurée. Aucune différence significative n'a été observée entre les différents groupes d'éponges. La masse sèche des éponges après 24 heures de gonflement était : 91,1% ± 3,4% pour CHT, 86,7% ± 1,7% pour CHT:HA, 88,7% ± 0,3% pour CHT:MDo et 89,7% ± 0,54% pour CHT:HA:MDo. La perte de masse moyenne après gonflement était de 11 ± 1,6%, ce qui suggère que la perte de masse n'a pas affecté les résultats du gonflement (tableau 12).

Tableau 12 : Perte de masse des éponges CHT, CHT:HA, CHT:MDo, CHT:HA:MDo après 24h de gonflement dans le PBS, séchage en étuve à 60°C.

Eponges	% Masse sèche après 24h de gonflement (n=3)
CHT	91,1 % ± 3,4 %
CHT:HA	86,7 % ± 1,7%
CHT:MDo	88,7 % ± 0,3%
CHT:HA:MDo	89,7 % ± 0,54 %

3.2. Gonflement des éponges réticulées par l'HMTA

La figure 37 montre la cinétique de gonflement des éponges réticulées avec l'HMTA dans le PBS (pH=7,4) sous agitation à 80 rpm et à une température de 37°C.

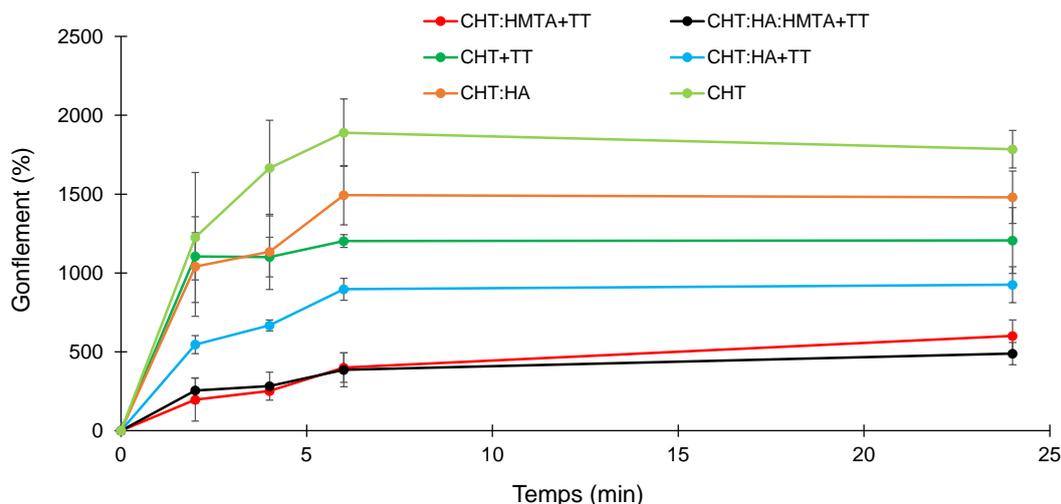


Figure 37 : Cinétique de gonflement (%) des éponges de CHT 5%, CHT 5%+TT, CHT:HA (5:1), CHT:HA (5:1)+TT, CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT dans le PBS (pH=7,4, 80 rpm), T=37°C. TT : traitement thermique. (n=3)

Comme précédemment, les résultats montrent que la capacité d'absorption des éponges augmente rapidement pendant les premières heures d'incubation avec un équilibre après 6 heures de gonflement. Les éponges non réticulées avec l'HMTA présentent des taux de gonflement significativement plus élevés. Après 24 heures, le taux de gonflement du CHT et du CHT:HA sont respectivement de $1785\% \pm 119\%$ et $1480\% \pm 166\%$. Après traitement thermique, les taux de gonflement diminuent pour ces deux groupes à $1205\% \pm 208\%$ pour le groupe CHT+TT et $925,7\% \pm 70\%$ pour le groupe CHT:HA+TT. Selon C. Ji *et al.* ce comportement serait la conséquence d'une réticulation intermoléculaire qui limite le caractère hydrophile du CHT ¹⁶⁶.

Après 24 heures de gonflement, les éponges réticulées avec l'HMTA présentent des taux de gonflement de $600 \pm 101\%$ pour le groupe CHT:HMTA+TT et de $488 \pm 114\%$ pour le groupe CHT:HA:HMTA+TT, ceci en comparaison avec les éponges sans HMTA ; CHT+TT ($1205 \pm 208\%$) et CHT:HA+TT ($925 \pm 70\%$) (figure 37). Les résultats indiquent que la présence d'HMTA modifie le comportement d'absorption des éponges de CHT et de CHT:HA. En effet, ces éponges ont présenté des taux de gonflement bien inférieurs à celui des éponges sans HMTA. Cela s'explique par la réticulation chimique des éponges, où l'HMTA diminue la présence des fonctions hydrophiles responsables du comportement d'absorption des éponges de CHT et de CHT:HA. De plus, le mécanisme de réticulation via le formaldéhyde, issu de la décomposition de l'HMTA, limite la mobilité des chaînes polymères du CHT grâce à la formation d'un réseau covalent, réduisant ainsi sa capacité à gonfler.

A la fin de la période de 24 heures, les éponges humides ont été séchées à l'étuve (60°C) pendant une nuit afin d'estimer le taux de perte de masse sèche après gonflement des éponges (Tableau 13).

Tableau 13 : Perte de masse des éponges après 24h de gonflement dans le PBS, séchage en étuve à 60°C.

Eponges	% Masse sèche après 24h de gonflement (n=3)
CHT+TT	87 % ± 6 %
CHT:HA+TT	88,6 ± 0,6 %
CHT:HMTA+TT	88 % ± 1,8 %
CHT:HA:HMTA+TT	79% ± 3,3%

On note que les masses sèches des éponges après 24 heures d'immersion dans le PBS ne varient que très peu entre les différents groupes. En effet, la perte de masse sèche des éponges est comprise entre 9% et 13% sans toutefois montrer à ce stade de différence significative entre les groupes à l'exception du groupe d'éponge CHT:HA:HMTA+TT qui a montré un taux de dégradation de 21%.

La figure 38 résume les taux de gonflement des différentes éponges après une immersion de 24h dans le PBS (pH=7,4, 37°C, 80 rpm).

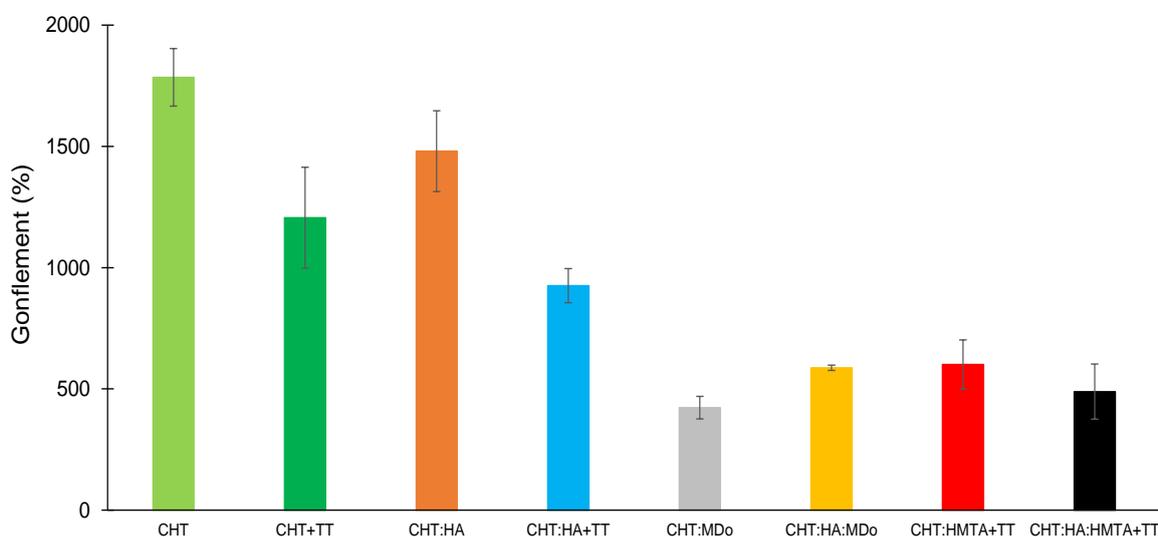


Figure 38 : Comparaison des taux de gonflement des éponges de CHT 5%, CHT:HA (5:1) CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4), CHT 5%+TT, CHT:HA (5:1)+TT, CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT après 24h d'immersion dans le PBS (pH=7,4, 37°C, 80 rpm). TT : traitement thermique.

La réticulation des éponges avec MDo, diminue le taux de gonflement des éponges CHT:MDo de 30% par rapport aux éponges de CHT:HMTA+TT. Cependant, il n'y a pas de différences

significatives entre les systèmes CHT:HA:MDo et CHT:HA:HMTA, en effet, on constate une faible différence entre les 2 éponges en terme de capacité de gonflement.

L'ajout d'HA formant des liaisons électrostatiques avec le CHT contribue à une réduction du taux de gonflement de 17% pour l'éponge CHT:HA comparativement au CHT s'expliquant par la réduction de la mobilité des chaînes macromoléculaires. L'application d'un traitement thermique à 130°C pendant 30 minutes entraîne une réduction du taux de gonflement des éponges de CHT de 32%, et de 37% des éponges de CHT:HA, s'expliquant par une réticulation physique, qui se traduit par l'association des chaînes entre elles par des liaisons hydrogène stables.

4. Etude de la sorption dynamique en vapeur

L'étude de la sorption dynamique de vapeur (DVS) permet d'analyser la capacité des éponges à adsorber et désorber l'eau à l'état gazeux en fonction de l'humidité relative, fournissant des informations sur le comportement hydrophile des éponges à l'échelle de la microstructure. Les phénomènes physiques mesurés par la DVS et par l'étude de gonflement sont relativement différents. Le comportement d'adsorption et d'absorption sont 2 phénomènes physiques différents. Selon S. Rastogi *et al.* le processus d'adsorption implique le contact des molécules d'eau avec la paroi des pores, tandis que pour l'absorption comme observé dans l'étude de gonflement, l'eau liquide remplit les pores du matériau (figure 39).

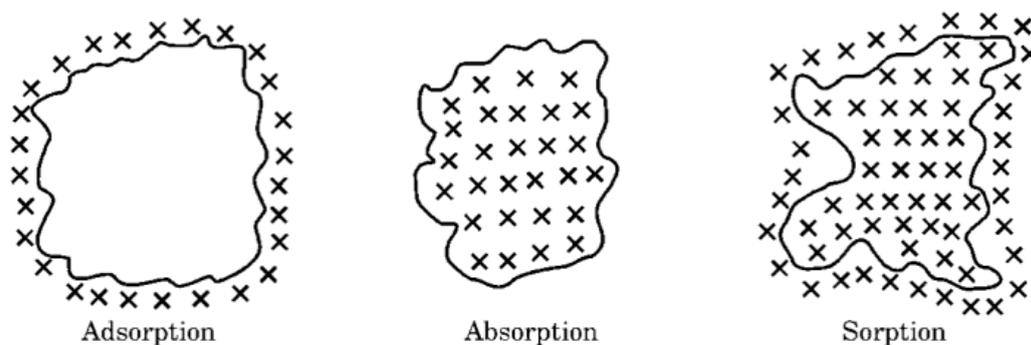


Figure 39 : illustration des différents comportements physiques adsorption, absorption et de sorption selon S. Rastogi *et al.* ¹⁶⁷

La figure 40 (A,B) montre les isothermes d'adsorption et de désorption de vapeur d'eau des différentes éponges à base de CHT et CHT:HA réticulés ou non par le MDo.

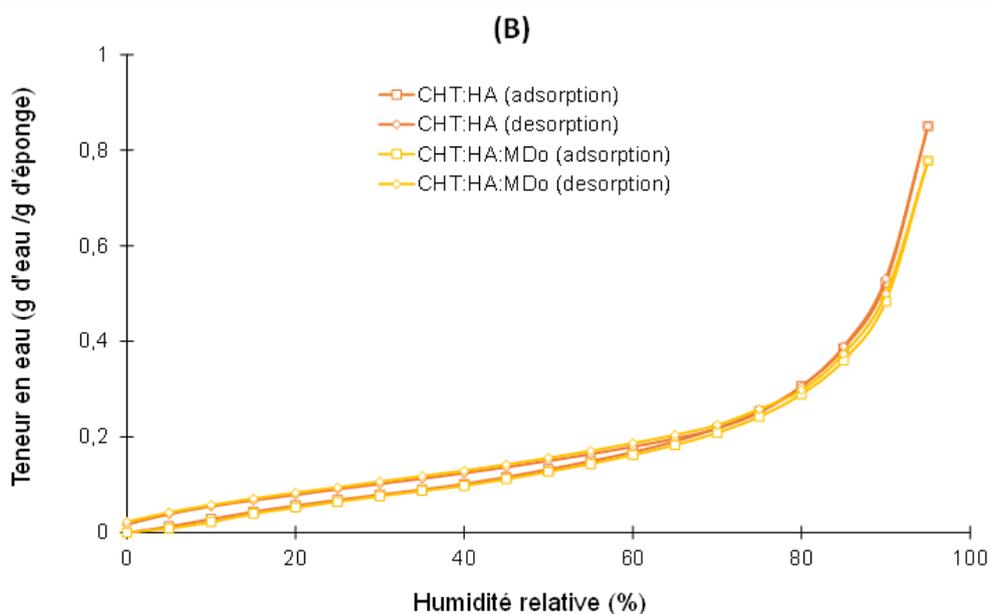
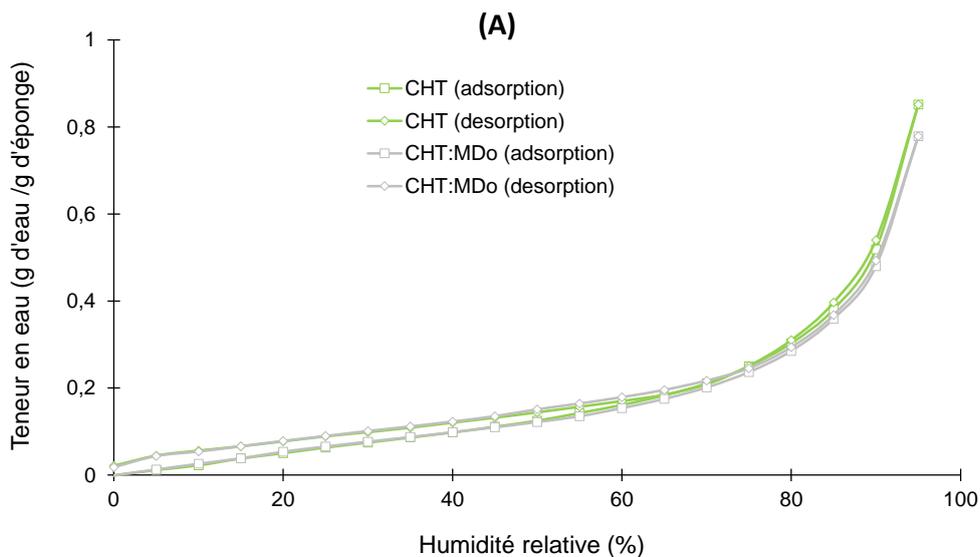


Figure 40 : Courbes d'adsorption- désorption des éponges de CHT 5%, CHT:MDo (5:0,4) (A). Courbes sorption- désorption correspondant aux éponges CHT:HA (5:1) et CHT:HA:MDo (5:1:0,4) (B).

Les figures 40A et 40B montrent une augmentation de l'adsorption de vapeur d'eau par les éponges à base de CHT jusqu'à 95% d'HR. Les profils d'adsorption et de désorption sont similaires pour les éponges de CHT, CHT:MDo et également pour les éponges de CHT:HA et CHT:HA:MDo. Cependant, à 95 % HR, une diminution de l'adsorption a été observée pour les groupes réticulés CHT:MDo (0,78 g/g) et CHT:HA:MDo (0,77 g/g), et ce en comparaison avec les groupes témoins CHT (0,85 g/g) et CHT:HA (0,85 g/g) (tableau 14). Ceci montre que la réticulation avec le MDo entraîne une légère diminution du comportement d'adsorption des éponges de CHT et CHT:HA lié au processus de réticulation.

Les résultats ont montré une différence entre le test de gonflement et l'analyse DVS, liée à la nature distincte des phénomènes physiques évalués. En effet, l'analyse DVS mesure l'adsorption de vapeur d'eau, correspondant à la fixation des molécules d'eau à la surface de l'éponge. Alors que le test de gonflement mesure l'absorption d'eau au sein de la structure de l'éponge. La figure 41(A,B) montre les isothermes d'adsorption et de désorption de vapeur d'eau des éponges à base de CHT et CHT:HA réticulés ou non par l'HMTA.

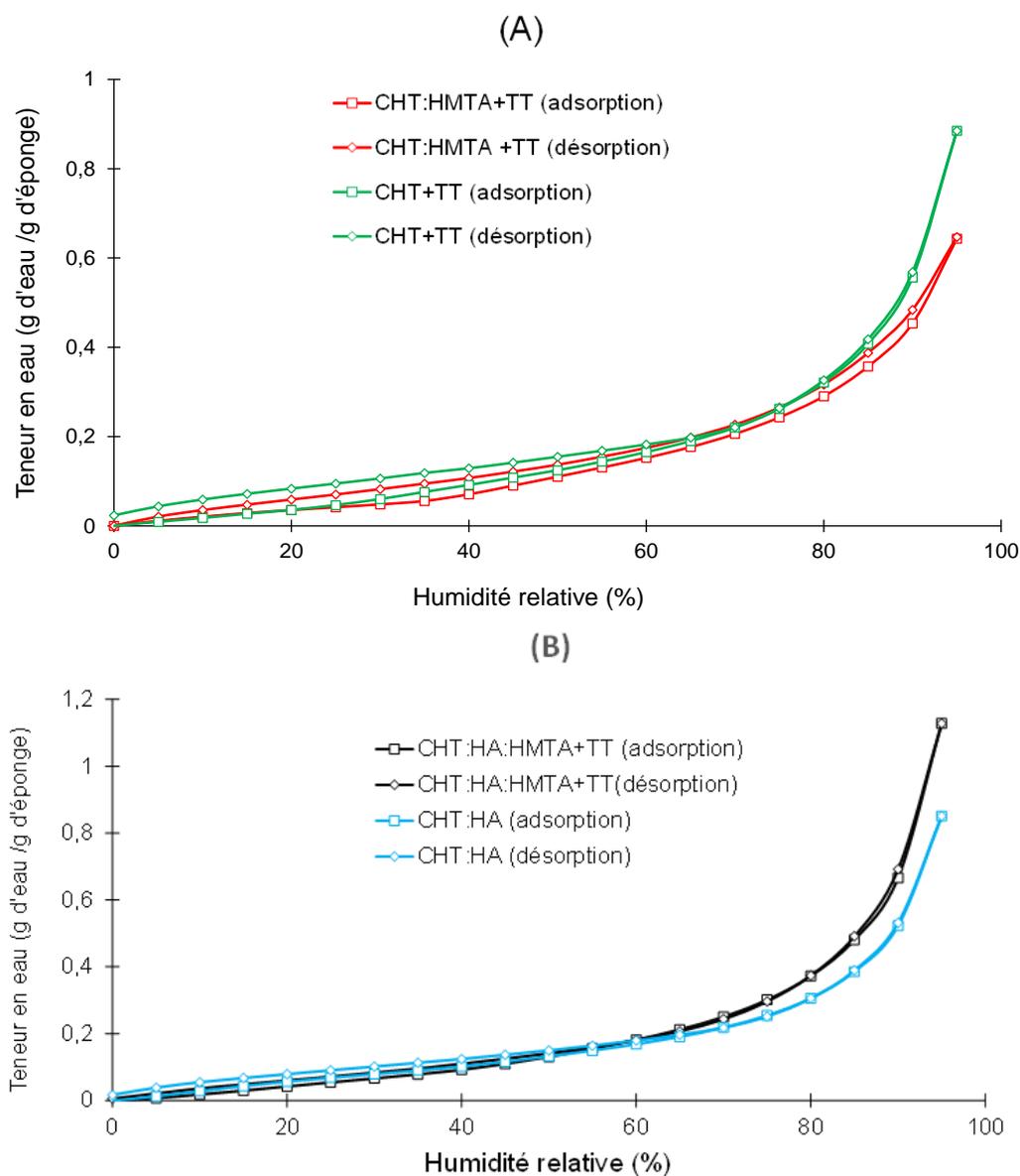


Figure 41 : courbes d'adsorption- désorption des éponges de CHT 5%+TT et CHT:HMTA (5:1)+TT (A). Courbes d'adsorption-désorption correspondant aux éponges de CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT et CHT:HA (5:1) (B). TT : traitement thermique.

Pour les éponges de CHT:HMTA+TT, on peut noter que les courbes d'adsorption et de désorption ne sont pas complètement superposables, ce qui montre une hystérésis. A 95%

HR, l'éponge de CHT réticulée avec l'HMTA a montré une diminution d'adsorption d'eau de près de 26% par rapport à l'éponge de CHT+TT (figure 41A).

Au niveau de la figure 41B, on constate la superposition des courbes d'adsorption et de désorption, indiquant qu'il n'y a pas de différence de comportement. Cependant, à 95 % d'humidité relative, une forte adsorption d'eau est observé pour l'éponge CHT:HA:HMTA+TT (1,13 g/g) en comparaison avec l'éponge CHT:HA (0,85 g/g). La différence observée peut être liée à l'effet de l'HMTA sur la structure des éponges. Dans le cas du CHT, le formaldéhyde libéré lors de la décomposition de l'HMTA réagit avec les groupes amines du CHT, ce qui réduit le nombre de sites actifs disponibles pour l'adsorption. En revanche, dans le système CHT:HA, les fonctions hydrophiles libres du HA non lié seraient à l'origine de l'augmentation du comportement d'adsorption des éponges de CHT:HA:HMTA.

Tableau 14 : Teneur en eau (g d'eau / g d'échantillon) à 95% d'humidité relative (HR)

Eponges	Teneur en eau (g/g) à 95% HR
CHT	0,85
CHT:HA	0,85
CHT:MDo	0,78
CHT:HA:MDo	0,77
CHT+TT	0,88
CHT:HMTA+TT	0,65
CHT:HA:HMTA+TT	1,13

En conclusion, la réticulation du CHT par les formaldéhydes issus de l'HMTA entraîne une diminution de la capacité d'adsorption de vapeur d'eau en réduisant la disponibilité des groupes hydrophiles. En revanche, l'ajout de l'HA dans le système CHT:HMTA augmente sensiblement l'adsorption des éponges de CHT:HA:HMTA+TT et ce grâce à la présence du HA libre dans le système. Par ailleurs, la réticulation avec la MDo semble légèrement diminuer l'adsorption des systèmes CHT et CHT:HA sans effet significatif.

5. Etude de la dégradation des éponges

L'étude du profil de dégradation des éponges est un paramètre important dans le domaine de l'ingénierie tissulaire. En effet, ces dernières doivent pouvoir se dégrader lentement *in vivo* pour permettre de supporter la formation du nouveau tissu. Pour ce faire, une étude de dégradation a été réalisée dans le PBS (dégradation hydrolytique), puis avec du lysozyme (0,5 mg/mL, dégradation enzymatique). L'étude a été réalisé à 37°C et sous agitation (80 rpm).

5.1. Dégradation hydrolytique dans le PBS à pH = 7.4

La figure 42 (A, B) présente les profils de dégradation des éponges réticulées et non réticulées par MDo, et réticulées et non réticulées par HMTA dans le milieu PBS (pH 7,4, 37 °C, 80 rpm).

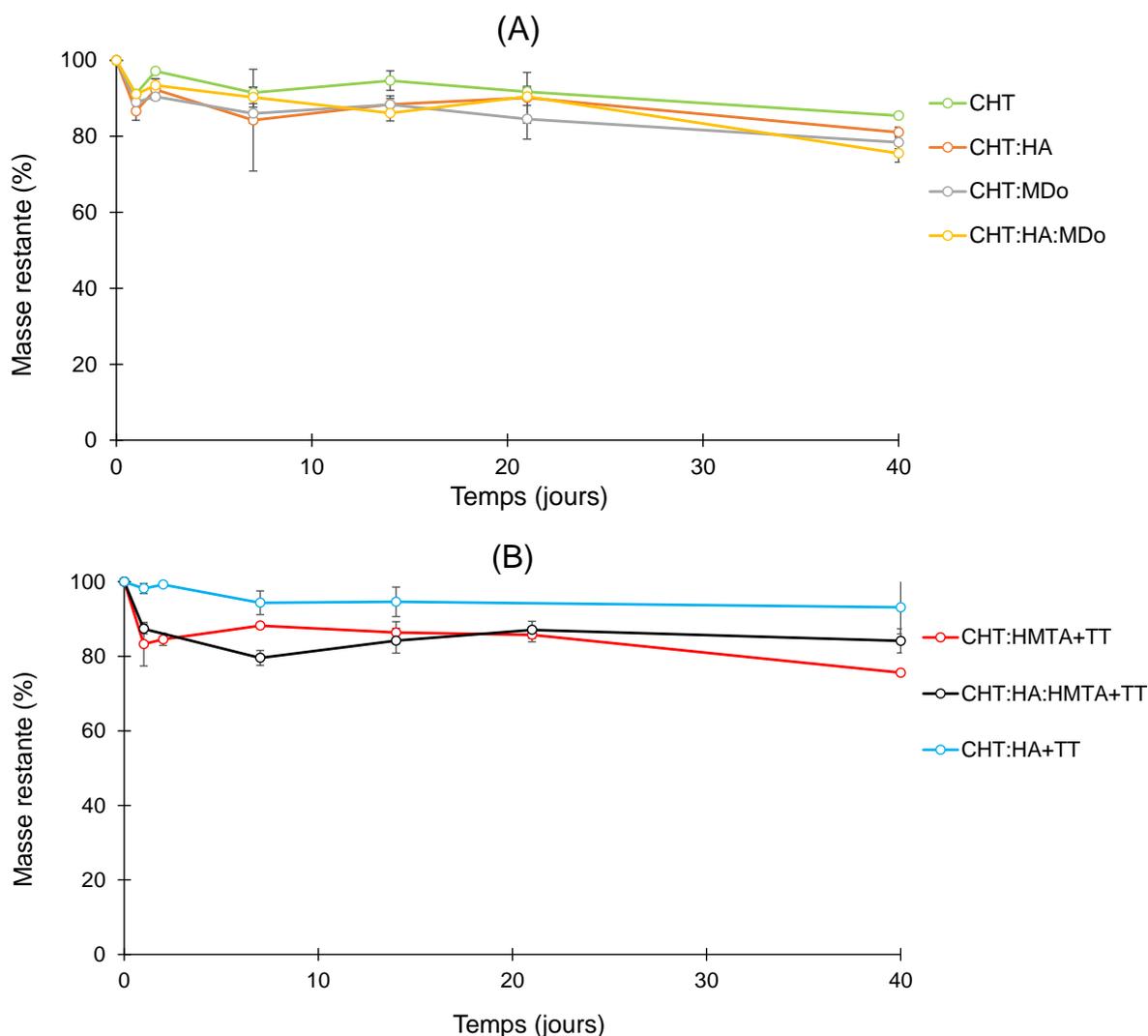


Figure 42 : **(A)** Évolution de la masse résiduelle (%) des éponges de CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4) après immersion dans le PBS (pH = 7.4, 37 °C, 80 rpm) pendant 1, 2, 7, 14 et 40 jours. **(B)** Masse résiduelle (%) des éponges de CHT:HA (5:1)+TT, CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT. TT : traitement thermique (n=3).

Au terme de 40 jours, une perte de masse relativement limitée, comprise entre 15 % et 25 %, a été observée pour l'ensemble des formulations, sans observer de différences significatives entre elles. Une tendance similaire a été observée pour les éponges avec HMTA, ou la perte de masse était de 24% à 6% (figure 42B).

Ce type de comportement a déjà été rapporté dans la littérature ⁸⁶. Cette faible dégradation s'explique en grande partie par les caractéristiques intrinsèques des matériaux, en particulier leur degré de cristallinité, lui-même étroitement lié au taux de désacétylation du CHT ⁹⁰.

5.2. Dégradation enzymatique

La figure 43 (A, B) montre les profils de dégradation des éponges réticulées et non réticulées par MDo, et réticulées et non réticulées par l'HMTA dans le milieu PBS (pH = 7,4, 37°C, 80 rpm) enrichi en lysozyme (0,5 mg/mL).

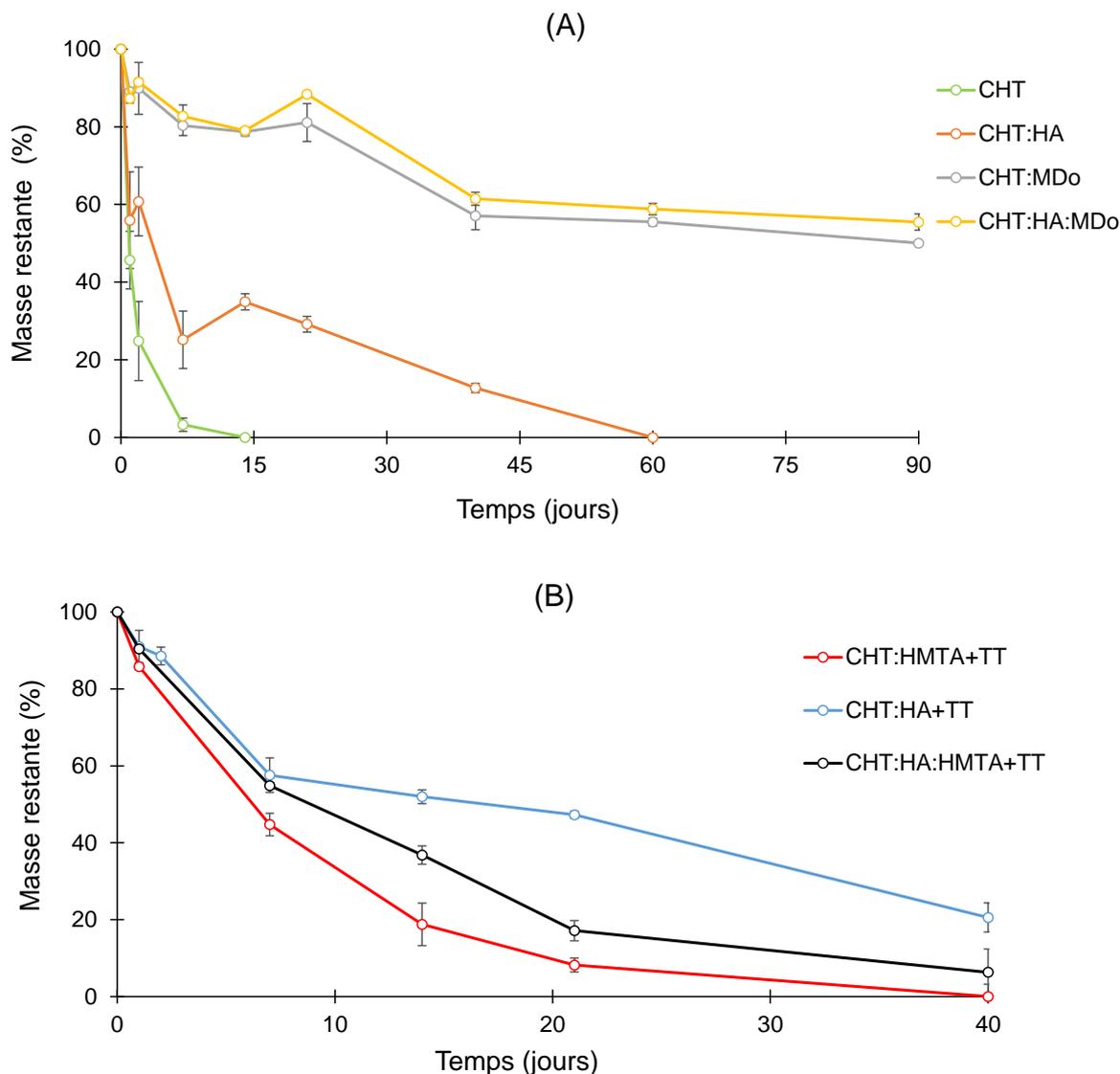


Figure 43 : **(A)** Masse résiduelle (%) des éponges après dégradation dans la solution de lysozyme 0,5 mg/mL (37°C,80 rpm) pendant : 1,2,7,14, 90 jours. (a) les éponges : CHT 5%, CHT:HA (5:1) , CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4). **(B)** Masse résiduelle (%) des éponges après dégradation dans la solution de lysozyme 0,5 mg/mL (37°C,80 rpm) pendant : 1,2,7,14, 40 jours. CHT:HA (5:1)+TT , CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT. TT : traitement thermique (n=3).

Cette cinétique met en évidence une perte de masse dès les premiers jours d'incubation, particulièrement marquée pour les éponges CHT et CHT:HA, avec des diminutions respectives de $54\% \pm 7\%$ et $44\% \pm 12\%$. La dégradation des éponges CHT se poursuit de manière plus

rapide jusqu'à être complète après 14 jours. En revanche, les éponges CHT:HA présentent une cinétique plus lente, avec une dégradation de $65\% \pm 2\%$ après 14 jours, atteignant finalement une dégradation totale au 60^e jour. Les éponges réticulées avec le MDo présentent une dégradation plus progressive. En effet, les éponges CHT:MDo et CHT:HA:MDo montrent des taux de dégradation compris entre $19\% \pm 5\%$ et $12\% \pm 1\%$ durant les 21 premiers jours en milieu enzymatique. La perte de masse s'accélère ensuite, atteignant $50\% \pm 1\%$ et $44,5\% \pm 2\%$ au bout de 90 jours, sans toutefois aboutir à une dégradation complète (figure 43A). Ces résultats indiquent que la réticulation des éponges CHT et CHT:HA par le MDo ralentit leur dégradation car elles montrent une meilleure résistance face à la dégradation enzymatique. Par ailleurs, la dégradation des éponges contenant de l'HMTA s'est révélée plus lente que les éponges non réticulées mais plus rapide comparativement à celles réticulées avec le MDo. Après 21 jours d'incubation, les éponges CHT:HMTA+TT et CHT:HA:HMTA+TT ont respectivement atteint des taux de dégradation de $91,8\% \pm 3\%$ et $83\% \pm 6\%$, tandis que les éponges CHT:HA+TT ont montré une dégradation plus modérée ($52,7\% \pm 1\%$). Ce processus de dégradation s'est poursuivi pour l'ensemble des échantillons, entraînant une dégradation complète des éponges CHT:HMTA+TT après 40 jours. En revanche, les autres groupes ne se sont pas dégradés complètement, avec des taux de $93,7\% \pm 1,1\%$ pour les éponges CHT:HA:HMTA+TT et $79,4\% \pm 1,1\%$ pour celles de CHT:HA+TT (figure 43B). Dans cette étude, nous avons observé que les éponges réticulées avec l'HMTA présentent une dégradation plus rapide que celles réticulées avec le MDo. Cela suggère que le réseau covalent formé par les molécules de formaldéhyde issues de la dégradation de l'HMTA est moins résistant en milieu enzymatique.

Selon J.A.Jennings *et al.* la dégradation enzymatique est le principal mécanisme de dégradation du CHT. En effet, des enzymes comme le lysozyme agit sur le CHT en clivant les liaisons glycosidiques β (1-4) entre les unités polysaccharidiques (figure 44). L'étude du taux de dégradation des éponges à base de CHT est un paramètre important dans le domaine de l'ingénierie tissulaire, un scaffold idéal doit répondre à l'exigence d'une propriété de dégradation lente pour maintenir des propriétés mécaniques satisfaisantes et permettre de soutenir la régénération tissulaire⁸⁶. Dans notre étude, le CHT et le CHT:HA réticulé avec le MDo ont montré une dégradation plus lente dans les milieux enzymatiques par rapport aux groupes contrôle (CHT et CHT:HA) où aux éponges réticulées avec HMTA. Ces résultats indiquent que le réseau covalent formé après la réticulation par MDo améliore la stabilité des éponges à base de CHT et de CHT:HA, ceci en ralentissant leur dégradation dans un milieu enzymatique. Ces résultats indiquent que la réticulation du CHT à l'aide d'un polysaccharide entraîne une structure plus dense et compacte, limitant fortement l'accessibilité des enzymes

aux sites de dégradation. En comparaison, l'utilisation de petites molécules réticulantes, comme le formaldéhyde, ne confère pas au matériau une résistance suffisante pour ralentir efficacement l'action enzymatique. Il faut noter que dans notre étude, nous avons utilisé une concentration de lysozyme bien supérieure à la normale *in vivo* estimée entre 1 à 14 µg/mL⁸⁶. Cela permet de tester la capacité de ces éponges dans des conditions hostiles voire dans un environnement pathologique où le lysozyme est sécrété en abondance par les macrophages ou les neutrophiles.

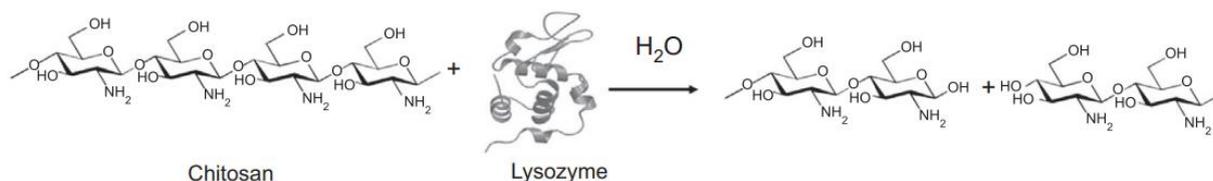


Figure 44 : Scission des liaisons β (1 \rightarrow 4) du CHT par le lysozyme selon J.A.Jennings et al.⁸⁶

5.3. Dégradation en milieu acide

Le CHT est connu pour être soluble en milieu acide. Il perd sa solubilité une fois réticulé. Ce test de dégradation en milieu acide a donc été réalisé afin de mettre en évidence la réticulation chimique du CHT dans nos éponges. Ce test a consisté à exposer les différentes éponges à une solution d'acide lactique (pH = 2,3) à 37°C, sous agitation, pendant 7 jours. Ainsi, nous avons étudié le comportement de nos éponges en milieu aqueux acide en suivant l'évolution de leur masse au cours du temps, Ce test permet de confirmer la réticulation chimique du CHT par les deux voies de réticulation, et dans ces conditions agressives pour le CHT, de démontrer que les deux stratégies de réticulation mises en œuvre permettent bien de stabiliser et de prolonger la durée de vie des éponges.

La figure 45 met en évidence la résistance des éponges réticulées en milieu acide pour les système contenant MDo et l'HMTA.

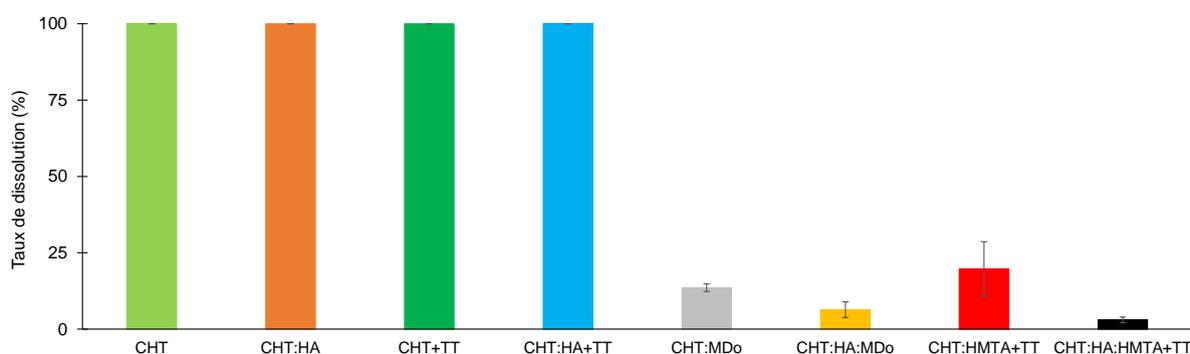


Figure 45 : Taux de dissolution des éponges de CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT 5%+TT, CHT:HA (5:1)+TT, CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:1:0,4), CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT, après 7 jours d'incubation dans un milieu acide (Acide lactique à 1%_{v/v}, pH=2,3), à 80 rpm, 37°C.

Les éponges CHT:MDo et CHT:HA:MDo ont montré des taux de dissolution limités, atteignant respectivement $13,5\% \pm 1,3\%$ et $6,4\% \pm 2,6\%$. De même, les échantillons réticulés avec l'HMTA, notamment CHT:HMTA+TT et CHT:HA:HMTA+TT, ont présenté des taux de dissolution respectifs de $19,6\% \pm 9\%$ et $3\% \pm 1\%$, indiquant une meilleure stabilité des éponges réticulées en milieu acide. En revanche, les éponges CHT:HA, CHT+TT, et CHT:HA+TT ont subi une dissolution complète après 7 jours d'incubation. Ces résultats montrent que les liaisons physiques et non covalentes ne suffisent pas à assurer une stabilité des éponges de CHT en conditions acide. Cette étude du comportement de nos éponges en milieu acide montre clairement que les deux stratégies de réticulation appliquées au CHT sont efficaces. Elles permettent de stabiliser les structures, même dans un environnement plus agressif que celui rencontré *in vivo*.

6. Caractérisation des éponges par MEB

L'étude de la structure des éponges est importante pour caractériser la morphologie globale de la structure ainsi que celle des pores qui la compose. En effet, les éponges formées ici doivent favoriser une bonne prolifération cellulaire ainsi que l'échange de nutriments et de gaz (comme le CO_2) grâce à leur porosité. La taille des pores doit être compatible avec celle des cellules, de plus, les pores doivent être suffisamment interconnectés pour permettre la circulation efficace des substances et la colonisation cellulaire.

La figure 46 présente les images MEB de la section transversale des éponges avant et après gonflement dans le PBS (puis lyophilisation) : CHT (A,A'), CHT:HA (B,B'), CHT:MDo (C,C') et CHT:HA:MDo (D,D').

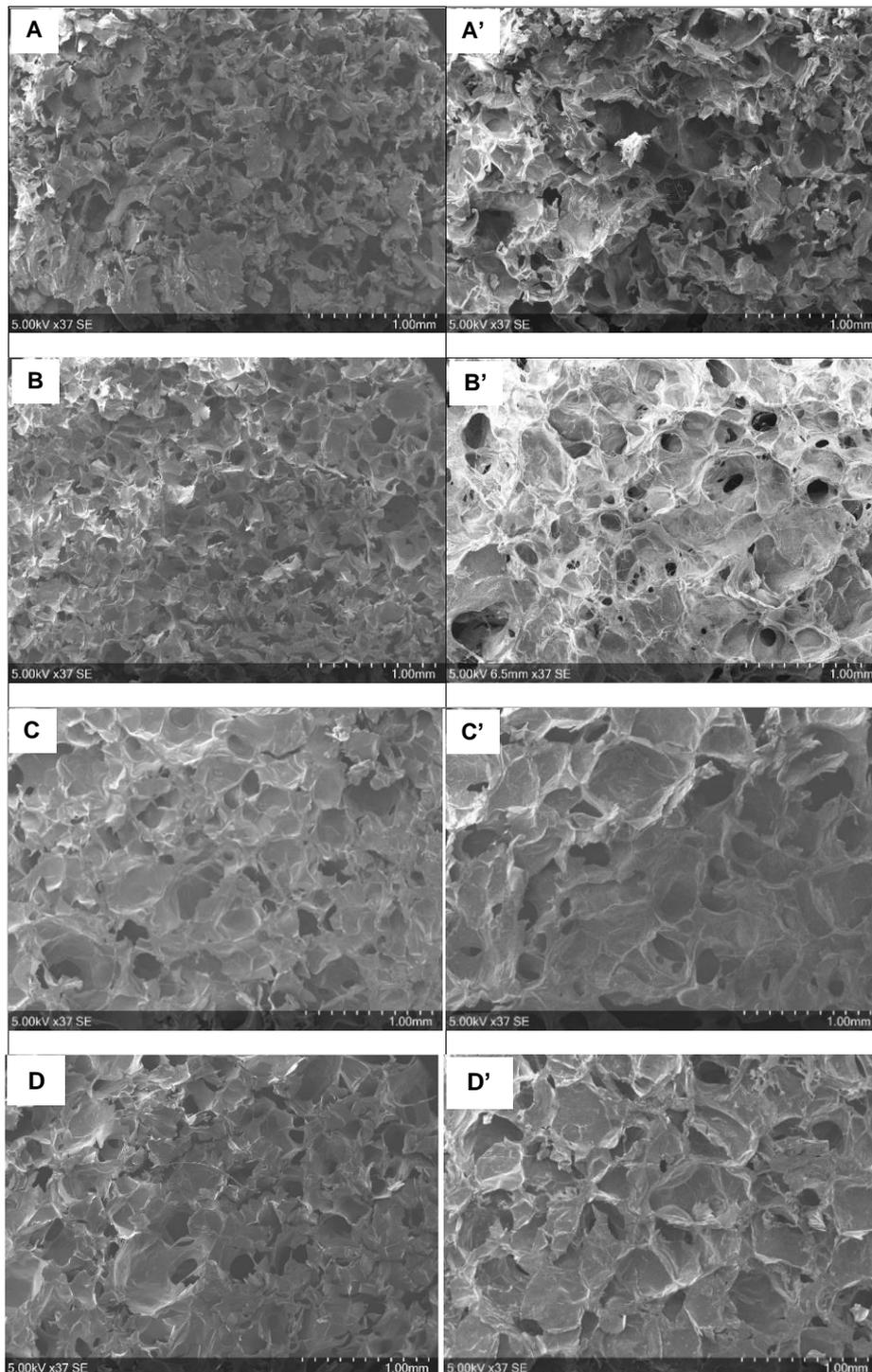


Figure 46 : images MEB de la structure des éponges avant et après gonflement dans le PBS : CHT 5% (A,A') CHT:HA (5:1) (B,B'), CHT:MDo (5:0,4) (C,C'), CHT:HA:MDo (5:1:0,4) (D,D'). Les images marquées A, B, C et D correspondent aux éponges observées avant gonflement, tandis que A', B', C' et D' montrent les mêmes échantillons après gonflement puis lyophilisation. Le grossissement : x37.

Tableau 15 : Diamètres moyens des pores (en μm) des éponges à base de CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4). L'acquisition des images a été obtenue avant et après 24h de gonflement dans du PBS et lyophilisation. Les mesures ont été effectuées avec le logiciel SEM flex 1000, 20 mesures ont été enregistrées pour chaque échantillon.

Eponges	Taille des pores (μm) avant gonflement (SEM)	Taille des pores (μm) après gonflement (SEM)
CHT	182,7 \pm 44,1	298,4 \pm 123
CHT:HA	190,5 \pm 71	243,5 \pm 143
CHT:MDo	215,0 \pm 93,5	220,6 \pm 53,4
CHT:HA:MDo	204,0 \pm 67	213 \pm 111

On observe des structures poreuses interconnectées avec une hétérogénéité en termes de distribution et de taille des pores. Cette variation dépend de la composition de l'éponge, comme le montre le tableau 15. Les éponges de CHT et CHT:HA non réticulés (images A, B) présentaient des pores plus petits que leurs homologues MDo réticulés (images C, D).

Après une première analyse MEB, les éponges ont été immergées dans une solution de PBS pendant 24 heures, lyophilisées et analysées à nouveau par MEB. L'expansion de la taille des pores après gonflement a été observée en comparant les images A, B, C, D avec les images A', B', C', D'. Pour les éponges de CHT, la taille moyenne des pores passe de 182,7 \pm 44,1 μm avant gonflement (image A) à 298,4 \pm 123 μm après gonflement (image A'), ce qui correspond à une augmentation de 63,3 %. De même, dans le cas du système CHT:HA, la taille des pores augmente de 190,5 \pm 71 μm (image B) à 243,5 \pm 143 μm (image B'), soit une augmentation de 27,8 %. En revanche, pour les éponges réticulées avec MDo, l'extension des pores est nettement plus limitée. Pour CHT:MDo, les pores passent de 215,0 \pm 93,5 μm à 220,6 \pm 53,4 μm (images C et C'), soit une hausse modérée de seulement 2,6 %. Enfin, dans le cas du système CHT:HA:MDo, les dimensions passent de 204,0 \pm 67 μm à 213 \pm 111 μm (images D et D'), traduisant une faible augmentation de 4,4 %. Ces résultats, confirment que le réticulant MDo contribue à limiter l'expansion des pores, en renforçant la cohésion de la structure et en réduisant la mobilité des chaînes polymères lors du gonflement.

La taille des pores de nos éponges (200-300 μm) diffère des données de la littérature, c'est-à-dire 10-100 μm (Tan *et al.*¹⁶⁸), 50-90 μm (Nath *et al.*¹⁶⁹), 77-97 μm (Correia *et al.*¹⁷⁰). Ces différences peuvent être attribuées aux différents protocoles de préparation des éponges, tels que la concentration de polymères dans l'hydrogel, la température de congélation avant la lyophilisation. La structure poreuse ouverte de nos éponges sont susceptibles favoriser la circulation des métabolites et des nutriments essentiels à la survie et à la prolifération cellulaire et de permettre une largement une prolifération des chondrocytes dont la taille varie entre 10 et 40 μm .

La figure 47 présente les images MEB de la section transversale des éponges avant et après gonflement dans le PBS (puis lyophilisation) : CHT:HMTA+TT (A,A'), CHT:HA:HMTA+TT (B,B'), CHT:HA+TT (C,C').

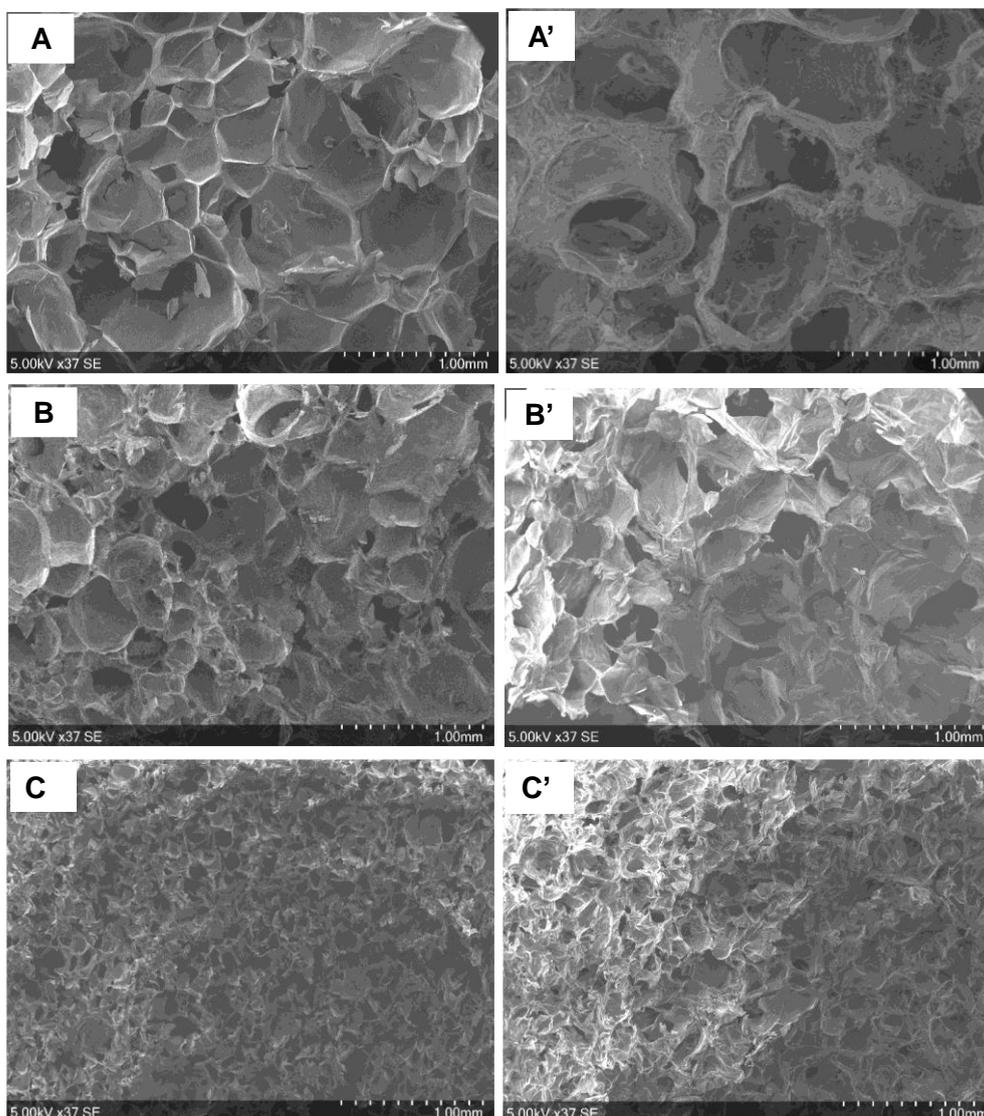


Figure 47: images MEB des éponges de CHT:HMTA (5:1)+TT (A- A'), CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT(B- B'), CHT:HA (5:1)+TT (C- C'). TT : traitement thermique. Les images marquées A, B et C correspondent aux éponges observées avant gonflement, tandis que A', B' et C' montrent les mêmes échantillons après gonflement puis lyophilisation. Le grossissement : x37.

Tableau 16 : Diamètres moyens des pores (en μm) des éponges à base de CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT, CHT:HA (5:1)+TT. L'acquisition des images a été obtenue avant et après 24h de gonflement dans du PBS et lyophilisation. Les mesures ont été effectuées avec le logiciel SEM flex 1000, 20 mesures ont été enregistrées pour chaque échantillon.

Eponges	Taille des pores (μm) avant gonflement (SEM)	Taille des pores (μm) après gonflement (SEM)
CHT:HMTA+TT	290 ± 142	685 ± 206
CHT:HA:HMTA+TT	194 ± 31	287 ± 85
CHT:HA+TT	132 ± 35	183 ± 74

Avant le gonflement, les éponges de CHT:HMTA+TT présentent une taille des pores de $290 \pm 142 \mu\text{m}$ (image A), ce qui est supérieur à la taille des pores des éponges de CHT, ($182,7 \pm 44,1 \mu\text{m}$). Par ailleurs, l'ajout du HA dans la formulation CHT:HA:HMTA+TT entraîne une diminution notable de la taille des pores, qui se stabilise autour de $194 \pm 31 \mu\text{m}$ (image B). Cette tendance est encore plus marquée dans la formulation CHT:HA+TT (sans HMTA), où les pores sont plus fins, avec une taille de $132 \pm 35 \mu\text{m}$ (image C).

Après gonflement, toutes les formulations présentent une augmentation de la taille des pores (tableau 16). L'éponge CHT:HMTA+TT montre une expansion particulièrement marquée, passant de $290 \pm 142 \mu\text{m}$ (image A) à $685 \pm 206 \mu\text{m}$ (image A'), soit une augmentation de 136,2 %. Dans le cas de la formulation CHT:HA:HMTA+TT, l'augmentation est plus modérée la taille moyenne des pores passe de $194 \pm 31 \mu\text{m}$ (image B) à $287 \pm 85 \mu\text{m}$ (image B'), représentant une augmentation de 48 %. Enfin, bien que la taille des pores augmente également pour l'éponge CHT:HA+TT, celle-ci reste la plus faible parmi les éponges testées, évoluant de $132 \pm 35 \mu\text{m}$ (image C) à $183 \pm 74 \mu\text{m}$ (image C'), soit une augmentation de 38,6 %. En résumé, l'introduction de l'agent réticulant HMTA entraîne une expansion significative des pores après gonflement, tandis que l'ajout de l'HA tend à limiter cette expansion.

En conclusion, ces observations indiquent que l'ajout d'HMTA dans la formulation induit la formation de pores de plus grande taille, surtout après gonflement, par rapport aux échantillons non réticulés. De manière surprenante, la réticulation avec HMTA, qui est généralement associée à une diminution du taux de gonflement en raison de la densification du réseau polymère, ne semble pas ici limiter la dilatation des pores. Ces résultats surprenants suggèrent que l'augmentation de la taille des pores après gonflement provient d'une réticulation hétérogène, créant des zones de densité variable au sein du réseau. Ces zones moins denses sont davantage susceptibles de se dilater lors du gonflement.

La comparaison entre les éponges réticulées avec MDo et celles contenant l'HMTA révèle qu'après 24 heures dans le PBS, la taille moyenne des pores diminue de 68 % dans les éponges de formulation CHT:MDo par rapport à celles de formulation CHT:HMTA+TT. De manière analogue, pour les formulations avec HA, les éponges CHT:HA:MDo présentent une réduction de près de 26 % de la taille des pores en comparaison avec les éponges CHT:HA:HMTA+TT. Ces résultats montrent que la réticulation par MDo maintient la taille des pores stable avant et après gonflement, contrairement au système CHT:HMTA+TT qui présente une augmentation importante de la taille des pores après gonflement.

En conclusion, la réticulation des éponges de CHT et de CHT:HA à l'aide du MDo a démontré son efficacité en termes de réduction du taux de gonflement dans le PBS. En effet, la réticulation permet de renforcer la structure des éponges, limitant ainsi l'absorption d'eau, ce qui contribue à maintenir leur intégrité et leur stabilité au cours du temps. De plus, les éponges réticulées avec le MDo ont montré une amélioration de leur résistance à la dégradation enzymatique comparativement à celle réticulées avec le HMTA. Cela peut être attribué à la formation d'un réseau réticulé plus stable qui limite la capacité des enzymes à pénétrer et à dégrader la structure des éponges. Ceci contribuera à conserver ses propriétés mécaniques et sa fonctionnalité sur une période suffisamment longue pour soutenir la régénération tissulaire.

**Chapitre 3 : Analyse des propriétés
mécaniques, biologiques et de la libération de
la CFX des éponges**

Dans le chapitre précédent, nous avons évalué l'impact de la réticulation chimique du CHT par le MDo et l'HMTA sur les propriétés d'adsorption et d'absorption des éponges en milieu physiologique (PBS). Cette modification a permis de réduire le taux de gonflement de leur macrostructure tout en améliorant la résistance à la dégradation enzymatique des éponges réticulées par MDo et HMTA.

Dans ce chapitre, nous nous intéressons aux propriétés mécaniques des éponges en utilisant l'analyse mécanique dynamique (DMA). Cette technique permettra d'évaluer leur comportement en fonction de la fréquence, afin de simuler les mouvements lents et rapides observés au niveau des articulations. L'objectif est de mesurer la capacité des différentes éponges à résister aux contraintes mécaniques. Par ailleurs, nous étudierons le profil de libération de la CFX à partir de formulations d'éponges préalablement chargée par imprégnation dans la solution d'antibiotique. Cette analyse visera à déterminer le pourcentage de CFX libéré dans le milieu au fil du temps, ainsi que la quantité libérée par gramme d'éponge (mg/g). En parallèle, les milieux prélevés à différents temps seront soumis à un test de diffusion antibactérien afin d'évaluer l'activité antimicrobienne des solutions obtenues. Enfin, une étude de la cytotoxicité indirecte sera réalisée conformément à la norme ISO 10993-5. Cette analyse permettra d'évaluer l'innocuité biologique des extraits issus des différentes éponges et d'examiner l'impact de la réticulation sur la réponse cellulaire.

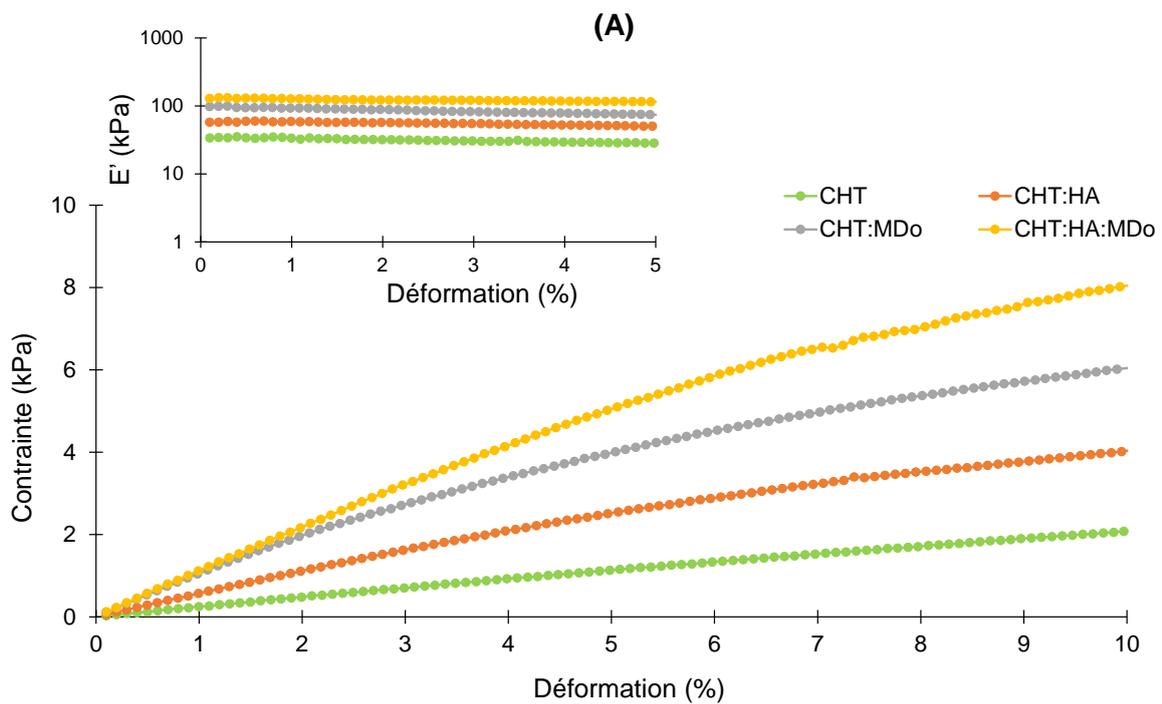
1. Analyse mécanique dynamique (DMA)

Dans notre étude, nous avons cherché à renforcer la rigidité élastique de nos éponges par réticulation. Pour ce faire, nous avons effectué des tests en analyse mécanique dynamique (DMA) afin de mesurer le module de stockage (E'), qui nous indique la capacité du matériau à stocker et à restituer de l'énergie lorsqu'il est soumis à une déformation, autrement dit, un module E' plus élevé témoigne d'une meilleure performance mécanique. Le module de perte (E'') représente l'énergie dissipée et décrit la composante visqueuse du matériau. Ces 2 paramètres sont donc importants pour comprendre le comportement mécanique global du matériau.

Le cartilage articulaire présente un module d'Young compris entre 0,1 et 6,2 MPa ^{10,34}, cependant le scaffold destinée à l'ingénierie du cartilage peut présenter des valeurs inférieures à celle-ci, avec un module compris entre 0,2 et 2 MPa serait particulièrement intéressant dans le cadre d'une application à l'ingénierie du tissu cartilagineux, car elle peut favoriser la prolifération des chondrocytes, sensibles aux propriétés mécaniques de leur

microenvironnement, et également la production d'un scaffold qui assure la stabilité du phénotype cellulaire à long terme.

La Figure 48A montre l'évolution de la contrainte en fonction de la déformation. L'étude a été réalisée à une fréquence de 1 Hz et à 37°C, sur des éponges de CHT, CHT:HA, CHT:MDo et CHT:HA:MDo qui ont été immergées pendant 24 heures dans une solution de PBS. Nous avons également enregistré les modules E' et E'' des éponges en fonction de la fréquence (figure 48B). L'objectif de cette expérience est de comparer directement le comportement mécanique entre les différentes formulations d'éponges.



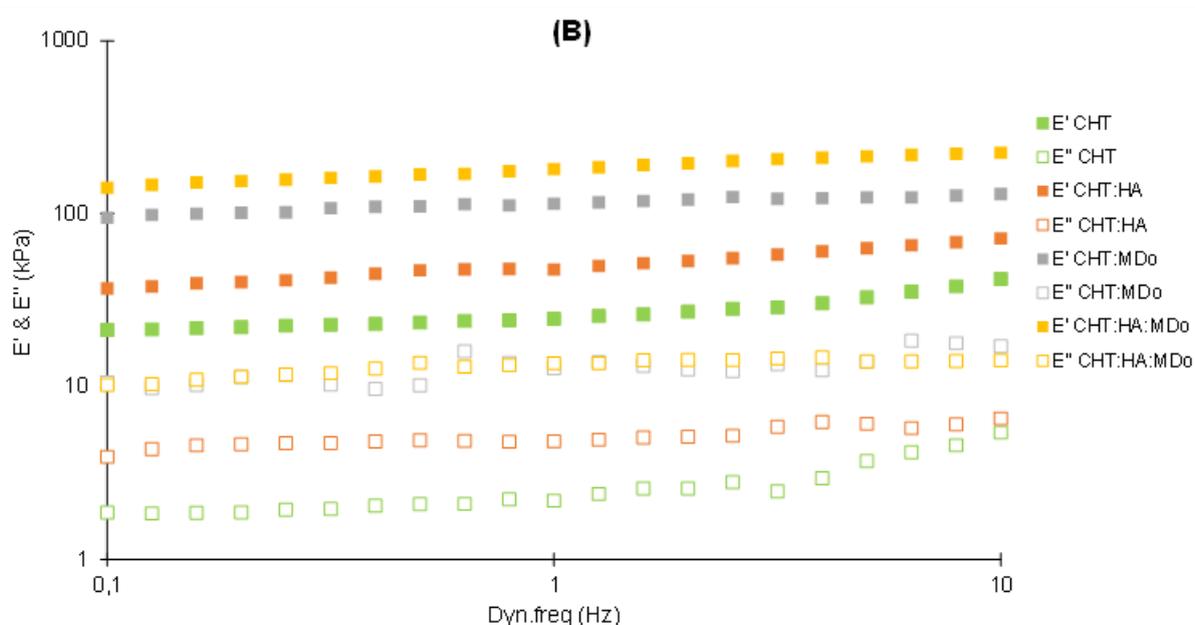


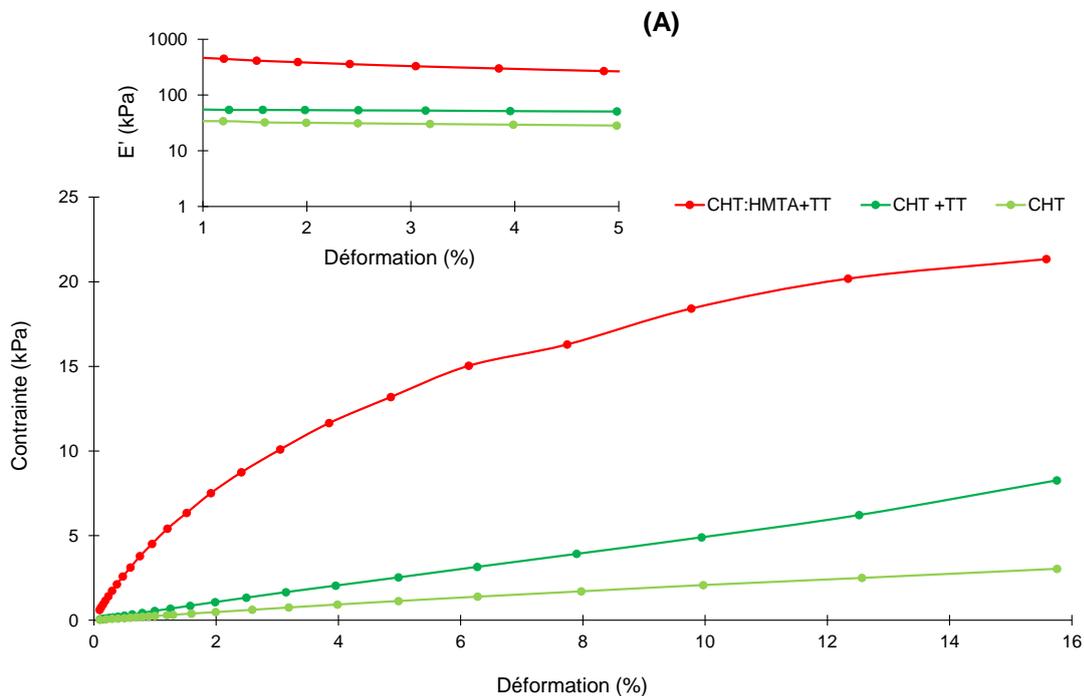
Figure 48 : **(A)** Evaluation de la contrainte en fonction de la déformation (jusqu'à 10 % de déformation) des éponges de CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:MDo (5:0,4) et CHT:HA:MDo (5:1:0,4) à une fréquence d'oscillation de 1 Hz. **(B)** Evaluation des modules E' et E'' en fonction de la fréquence (0,1-10 Hz) à une déformation de 1 %. Tous les tests ont été effectués sur des éponges humides immergées dans une solution de PBS pendant 24 heures à 37°C. Les tests ont été réalisés en triplicat ($n=3$).

Les résultats montrent que toutes les éponges présentent un comportement mécanique élastique dans la gamme de déformation inférieure à 5 %, caractérisé par une relation linéaire entre la contrainte et la déformation. Par ailleurs, le module E' révèle que les éponges CHT:MDo et CHT:HA:MDo présentent des valeurs nettement supérieures à celles des éponges témoins sans MDo (CHT et CHT:HA), traduisant une rigidité plus élevée induite par la réticulation. Puisque tous les matériaux présentent un comportement viscoélastique linéaire jusqu'à 5 % de déformation (figure 48A), l'évolution de leur réponse viscoélastique a été analysée en fonction de la fréquence dynamique dans cette plage linéaire, avec une amplitude de déformation limitée 1 % (figure 48B). Une gamme de fréquences allant de 0,1 à 10 Hz a été appliquée afin de simuler les conditions mécaniques du cartilage articulaire en fonctionnement normal. Cette approche permet ainsi une évaluation plus représentative du comportement mécanique des éponges sous charge dynamique.

Pour tous les groupes d'éponges, E' est plus élevé que le module E'' , indiquant que la réponse élastique (comportement solide) des éponges domine sur leur comportement visqueux sur l'ensemble de la plage de fréquences étudiée. Les valeurs de E' mesurées à 1 Hz pour les 4 groupes d'éponges sont 29 ± 4 kPa (CHT), 54 ± 16 kPa (CHT:HA), 145 ± 34 kPa (CHT:MDo) et 197 ± 18 kPa (CHT:HA:MDo). Ainsi, on enregistre une augmentation significative de E' suite à la réticulation du CHT et du CHT:HA par la MDo, en effet, une augmentation de près de 400

% est observée pour CHT:MDo et de 260 % pour CHT:HA:MDo par rapport à leurs équivalents sans MDo. L'ajout du HA au CHT entraîne également une augmentation du module E' , avec une augmentation de 86 % par rapport aux éponges de CHT 5%. En prenant les éponges CHT comme référence, l'augmentation des valeurs de E' observée indique un renforcement de la rigidité des éponges. Ce renforcement peut être attribué, d'une part, aux interactions ioniques entre le CHT et l'HA, formant un complexe polyelectrolyte, et d'autre part, de manière plus significative, aux liaisons covalentes formées par MDo. Ainsi, MDo et HA jouent des rôles complémentaires dans l'amélioration des propriétés mécaniques des éponges, MDo étant principalement responsable de la formation d'un réseau réticulé covalent, tandis que HA contribue à un renforcement physique supplémentaire à travers des interactions polymère-polymère non covalentes.

La figure 49A montre les courbes contraintes déformation enregistrées à une fréquence de 1Hz pour les éponges de CHT:HMTA+TT et CHT+TT. La figure 49B montre l'étude du comportement viscoélastique des éponges de CHT:HMTA+TT et CHT+TT, l'enregistrement de E' et E'' en fonction de la fréquence (0,1 - 10 Hz) est réalisé dans les conditions citées précédemment.



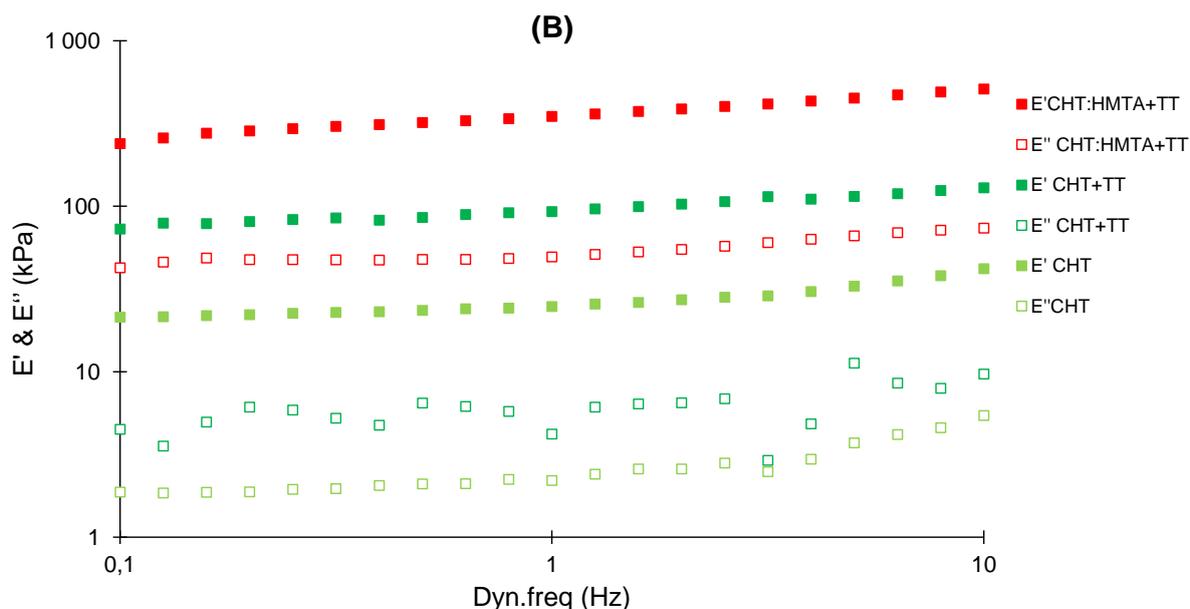


Figure 49 : **(A)** Evaluation de la contrainte en fonction de la déformation (jusqu'à 10 % de déformation) pour les éponges de CHT 5%, CHT 5%+TT et CHT: HMTA (5:1)+TT. TT : traitement thermique. Le test est réalisé à une fréquence de 1 Hz. **(B)** Test de balayage de fréquence (0,1-10 Hz) à une déformation contrôlée de 1 % a permis d'enregistrer E' et E'' . Tous les tests ont été effectués sur des éponges humides mises en équilibre dans une solution de PBS pendant 24 heures à 37°C. Les tests ont été réalisés en triplicat ($n=3$).

On observe que les éponges CHT:HMTA+TT présentent une réponse mécanique (contrainte) supérieure aux éponges de CHT+TT, ce qui indique un comportement plus rigide et une résistance à la déformation plus élevée provoquée par la réticulation. Les valeurs de E' sont de 446 ± 134 kPa et $54,9 \pm 11$ kPa pour CHT:HMTA+TT et CHT+TT respectivement. On peut remarquer aussi que la réponse mécanique est linéaire dans tout le domaine 0-10% pour l'éponge non réticulée, contrairement à l'éponge réticulée. Par conséquent, E' de l'éponge non réticulée reste constant dans tout le domaine de déformation, alors qu'il diminue pour l'éponge réticulée.

Les résultats montrent une augmentation de E' et E'' à mesure que la fréquence augmente et avec E' supérieur à E'' , ce qui caractérise un comportement élastique (solide) des éponges. On observe également une élévation significative des modules élastiques (E' et E'') pour les éponges de CHT:HMTA+TT par rapport aux éponges de CHT+TT. A une fréquence de 1 Hz, E' atteint $349 \pm 68,9$ kPa pour les éponges de CHT:HMTA+TT, contre $92,8 \pm 5,7$ kPa pour celles de CHT+TT, tandis que E'' est de 49 ± 15 kPa et $4,2 \pm 2,6$ kPa, respectivement. L'augmentation du E' est de 276%, ce qui reflète directement l'impact de la réticulation avec HMTA sur la rigidité et l'élasticité des éponges. Cette amélioration est attribuée à la structure réticulée des éponges de CHT:HMTA+TT, qui génère un matériau à la fois plus rigide et élastique.

La figure 50 montre un récapitulatif de modules E' et E'' des différentes éponges à une fréquence de 1 Hz et une déformation de 1 %.

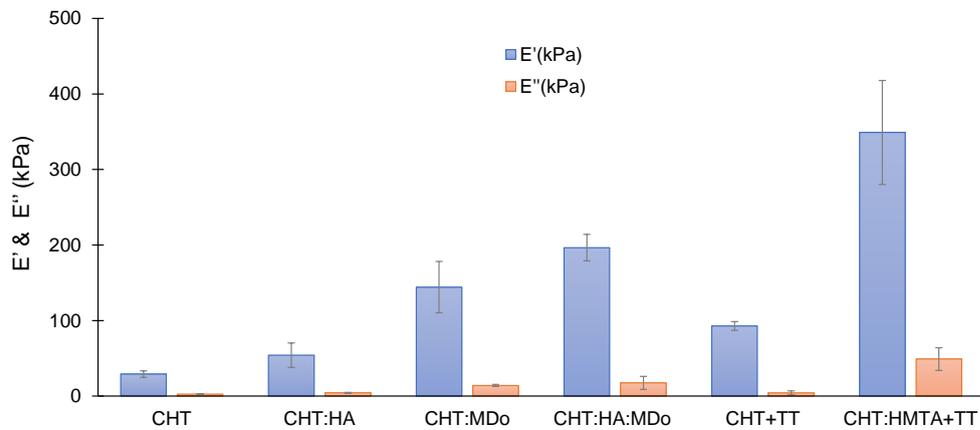


Figure 50 : Comparaison des modules élastique (E') et module de perte (E'') des différentes éponges CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4), CHT:HMTA (5:1)+TT. TT : traitement thermique. la fréquence de 1Hz et une déformation de 1%, $T^{\circ}\text{C}=37^{\circ}\text{C}$.

L'analyse permet de faire plusieurs observations, tout d'abord, le traitement thermique du CHT entraîne une augmentation de 68,6 % de E' et de 25,6 % de E'' par rapport aux éponges de CHT non traitées thermiquement. Cette évolution suppose une augmentation de la cristallinité du CHT, due au renforcement des interactions intermoléculaires par la formation de liaisons hydrogènes. Par ailleurs, les résultats illustrent la supériorité du système contenant HMTA par rapport à celui avec MDo en termes de propriétés mécaniques. En effet, les éponges de CHT:HMTA+TT présentent une augmentation de E' d'environ 142 % par rapport aux éponges de CHT:MDo, tandis que E'' augmente de 250 %. Ces résultats mettent en avant l'intérêt de la réticulation du CHT par l'HMTA et les bénéfices qu'elle apporte en termes de rigidité et de propriétés viscoélastiques.

Des études sur les biopolymères réticulés ont exploré leurs applications dans l'ingénierie des tissus du cartilage articulaire. Subramanian *et al.* ont rapporté que les chondrocytes sont capables de percevoir leur environnement mécanique, la rigidité du support agissant comme un stimulus externe influençant la prolifération cellulaire et la préservation de la morphologie des chondrocytes. Dans cette étude, des films de CHT ont été soumis à une réticulation à l'aide du 1,4-butanediol diglycidyl éther selon divers rapports molaires. Il a été observé que le film présentant la concentration la plus élevée en agent réticulant, correspondant à un ratio molaire où la quantité de diépoxyde est cinq fois supérieure à celle des amines du CHT, affichait E' de 19,9 kPa. Cette configuration a ainsi favorisé une prolifération des chondrocytes ainsi qu'une meilleure activité biosynthétique¹⁷¹. Il est noté que ces valeurs sont relativement

basses par rapport à nos résultats (valeurs de E' pour CHT:HA 54 ± 16 kPa, CHT:MDo $:145 \pm 34$ kPa, CHT:HA:MDo $: 197 \pm 18$ kPa, CHT:HMTA+TT $: 446 \pm 134$ kPa et CHT+TT $: 54,9 \pm 11$ kPa) attribuable probablement à la différence en terme de réticulant utilisé et des conditions expérimentales. Le-Ping Yan *et al.* ont réalisé une analyse DMA sur des supports constitués de collagène et de CHT réticulés avec différentes concentrations de génipine (0,1 %, 0,3 % et 0,5 %). Pour les supports contenant 50 % de CHT(Coll/CHT-50), les résultats ont révélé que E' augmentait proportionnellement avec la concentration de génipine. À une fréquence de 1 Hz, E' variait entre 300 kPa et 700 kPa lorsque la concentration de génipine passait de 0,1 % à 0,5 %_{w/v}, ce qui indique une rigidité plus élevée du matériau. En comparaison, les scaffolds réticulés avec MDo et HMTA+TT ont montré des valeurs de E' respectives de 145 ± 34 kPa et 446 ± 134 kPa, valeurs qui sont inférieures à celles observées dans l'étude de Le-Ping Yan *et al.* Cette divergence peut être expliquée par l'utilisation de génipine, qui crée un réseau polymère plus dense et plus rigide en réticulant à la fois le CHT et le collagène. En outre, l'utilisation de ce support en collagène/CHT réticulé améliore non seulement la rigidité du matériau, mais aussi l'adhésion et la viabilité des chondrocytes ¹⁷². R. Kocen *et al.* ont étudié les propriétés viscoélastiques de supports poreux à base de gomme gellane combinée à différentes concentrations de verre bioactif (de 2 % à 8 %) en utilisant l'analyse mécanique dynamique (DMA). Les résultats ont montré que E' variait entre 500 à 800 kPa ¹⁷³. D'autres études ont examiné l'impact de la réticulation et de la rigidité des supports à base de biopolymères sur la prolifération cellulaire. S. Silva *et al.* a testé une éponge de CHT/ fibroïne de soie réticulée par la génipine comme support pour l'ingénierie du cartilage et a rapporté une valeur de E' de 32,6 kPa, ce qui s'est avéré suffisant pour induire et supporter la prolifération cellulaire et à la synthèse des GAGs par les chondrocytes ¹⁷⁴. D'autre part, E. Schuh *et al.* a étudié l'influence de l'élasticité de la matrice sur le maintien de l'activité chondrogénique des chondrocytes cultivées sur des monocouches de gels de polyacrylamide avec différents modules de Young (4, 10, 40 et 100 kPa). Les résultats ont montré une bonne prolifération cellulaire et une organisation structurée de l'actine sur les supports avec des modules supérieurs à 4 kPa. Cependant, des niveaux plus élevés de collagène de type II et d'agrécan ont été observés sur le support à 4 kPa, suggérant que la croissance des chondrocytes était plus stable dans ces conditions (figure 51) ¹⁷⁵.

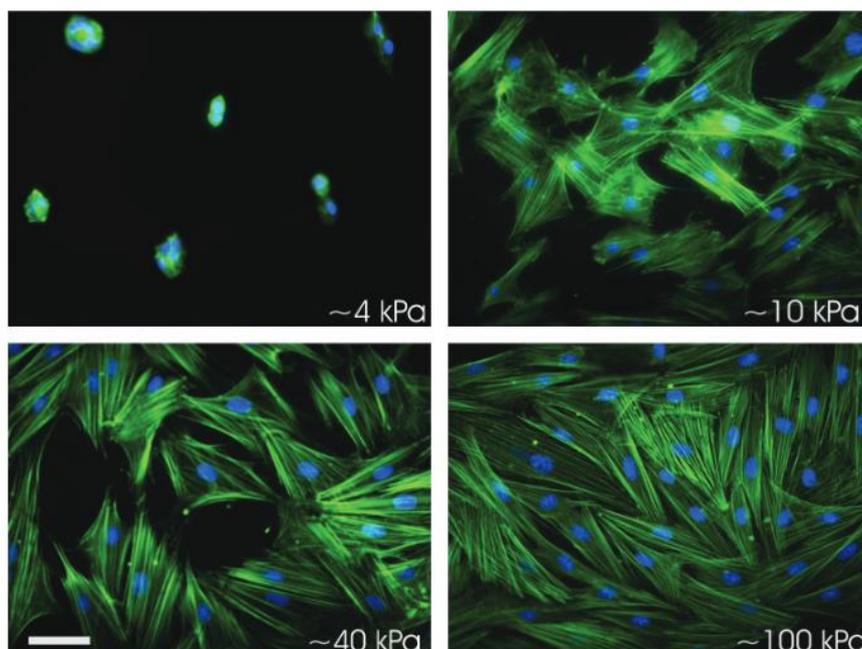


Figure 51 : Coloration des filaments d'actine des chondrocytes après 7 jours de culture sur des matrices à différents module d'Young (kPa) montrant le rôle de la rigidité des supports sur l'organisation de l'actine des cellules. La coloration a été réalisé avec l'isothiocyanate de fluorescéine (FITC) et la coloration du noyau (bleu) avec le colorant DAPI ¹⁷⁵.

De plus, Y. Zhou *et al.* a démontré que la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses (CSM) pouvait être améliorée sur des hydrogels de polyacrylamide souples avec une rigidité de 0,5 kPa ¹⁷⁶. M. Murphy *et al.* a étudié les propriétés des éponges de collagène combinées aux GAGs (chondroïtine sulfate où l'HA), ces éponges ont été réticulées avec le 1-éthyl-3-(3-diméthylaminopropyl) carbodiimide, permettant d'obtenir 3 niveaux de rigidités (0,5 , 1 et 1,5 kPa). Les résultats ont révélé une expression du facteur de transcription SOX 9 dans le support présentant la plus faible rigidité (0,5 kPa), indiquant une différenciation chondrogénique des CSM. En revanche, les supports plus rigides (1,5 kPa) étaient associés à une différenciation ostéogénique avec la production du marqueur RUN X 2 ¹⁷⁷. Ces résultats montrent que la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuse est plus favorable sur des supports plus souple et moins rigide.

S. Escalante *et al.* a proposé un hydrogel innovant composé de CHT et d'HA, intégrant du chondroïtine sulfate, pour induire une réparation du cartilage. Un réseau polymère interpénétré (IPN) a été formé avec succès par réticulation au diisocyanate. Le support CHT/HA obtenu a montré une capacité à favoriser la différenciation chondrogénique des cellules souches mésenchymateuses et à faciliter la formation d'un tissu de type cartilagineux *in vitro*. De plus, il a été rapporté que ce support pourrait soutenir la technique de microfracture en stabilisant le caillot sanguin et en exploitant les propriétés mucoadhésives du CHT ¹⁰¹.

Outre l'utilisation de deux polymères particulièrement intéressants pour la régénération cartilagineuse, à savoir le CHT et l'HA, la réticulation joue un rôle essentiel dans l'augmentation de la rigidité des scaffolds à base de CHT. L'ajout de MDo et, plus particulièrement, de HMTA, a permis de renforcer cette rigidité en formant un réseau covalent. De nombreuses études ont démontré que la rigidité des supports a un impact majeur sur l'activité des cellules, en particulier les chondrocytes et les cellules souches mésenchymateuses. En effet, une rigidité adaptée favorise la prolifération et la différenciation des cellules, tout en stimulant la synthèse des composants de la MEC *in vitro*, éléments essentiels à la régénération du cartilage. Un scaffold à faible rigidité serait donc plus favorable aux cellules souches mésenchymateuses, tandis qu'un scaffold plus rigide favoriserait la prolifération des chondrocytes, qui nécessitent un environnement plus rigide pour optimiser leur croissance et leur activité biosynthétique.

Dans ce contexte, notre scaffold pourrait constituer une structure prometteuse pour stimuler la prolifération des chondrocytes et favoriser l'ingénierie des tissus cartilagineux. Toutefois, afin d'optimiser davantage ce dispositif, il serait pertinent d'explorer l'effet de l'augmentation de la concentration de réticulant chimique sur le système CHT:HA, et d'étudier l'association de ce système avec d'autres polymères, comme le collagène, afin de créer un réseau polymère combinant à la fois réseautage chimique et physique. Cette approche de double réticulation pourrait offrir des propriétés mécaniques et biologiques supérieures, favorisant ainsi la création d'un scaffold optimal capable de répondre aux besoins spécifiques des chondrocytes et des cellules souches, tout en soutenant efficacement la régénération cartilagineuse. Dans notre cas, Il serait également pertinent d'évaluer l'impact de différentes rigidités des scaffolds sur la biosynthèse et la prolifération des chondrocytes.

La figure 52 illustre l'influence de la rigidité du substrat (en kPa) sur l'expression de divers marqueurs biologiques dans plusieurs études. La rigidité varie de "soft" (mou) à "stiff" (rigide), et chaque étude mentionnée (Murphy *et al.*, Bian *et al.*, Schuh *et al.*,) montre comment certains gènes et protéines sont régulés en fonction de cette rigidité. On observe que des marqueurs comme SOX 9, COL II et GAG/DNA, associés à la chondrogenèse, sont généralement favorisés par des substrats de rigidité intermédiaire à élevée. En revanche, des marqueurs comme RUNX 2, liés à l'ostéogenèse et à la contractilité, sont plus exprimés sur des substrats plus rigides. L'encadré en bas à gauche présente une autre étude (Sanz-Ramos *et al.*), qui explore la relation entre la rigidité et l'expression de ACAN et COL II à des valeurs plus faibles

de rigidité. Globalement, ce graphique met en évidence l'importance de la rigidité mécanique dans l'orientation des processus de différenciation cellulaire et de production de la MEC.

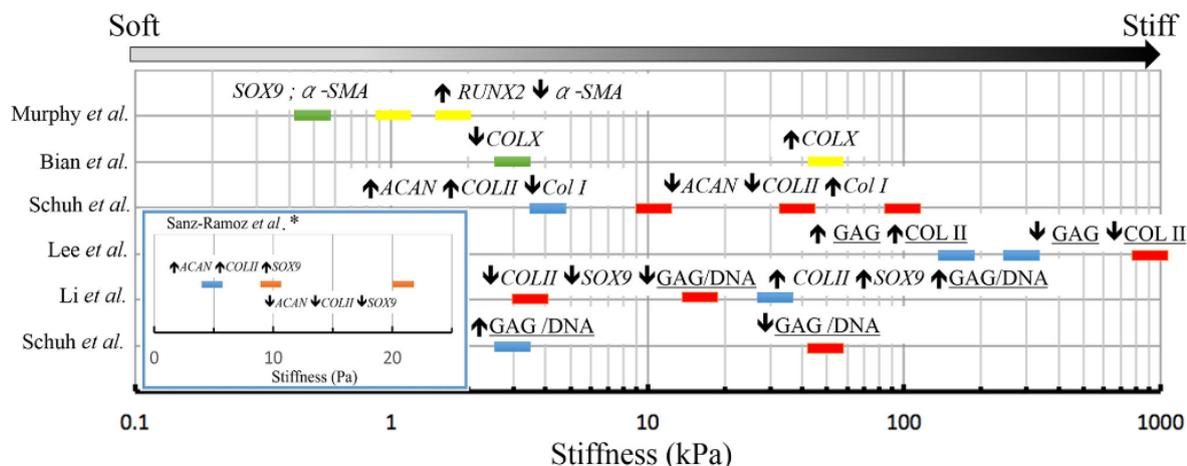


Figure 52 : impact de la rigidité du substrat sur la transcription des gènes (*SOX 9*, *COL II*, *COL I*, *COL X*, *ACAN*) et la synthèse de protéines (*GAG / ADN*, *COL II*) par les chondrocytes (couleurs bleu et rouge), et par les CSMs (couleur grise et jaune)¹⁷⁸.

2. Etude de la libération de la ciprofloxacine par les éponges

La figure 53 (A, B) illustre le profil de libération de la CFX à partir de différentes éponges, montrant à la fois la quantité cumulée de CFX exprimée en mg/g d'éponge et en pourcentage en fonction du temps. Le pourcentage de la CFX libéré a été calculé à partir de la libération cumulée de CFX mesurée en mg/g après 240 heures. Il convient de souligner que la CFX a été utilisée dans cette étude principalement pour évaluer les capacités de captation et de libération des différentes formulations d'éponges. Bien qu'elle puisse présenter un intérêt clinique dans la prévention des infections, cet aspect ne constitue pas la problématique majeure.

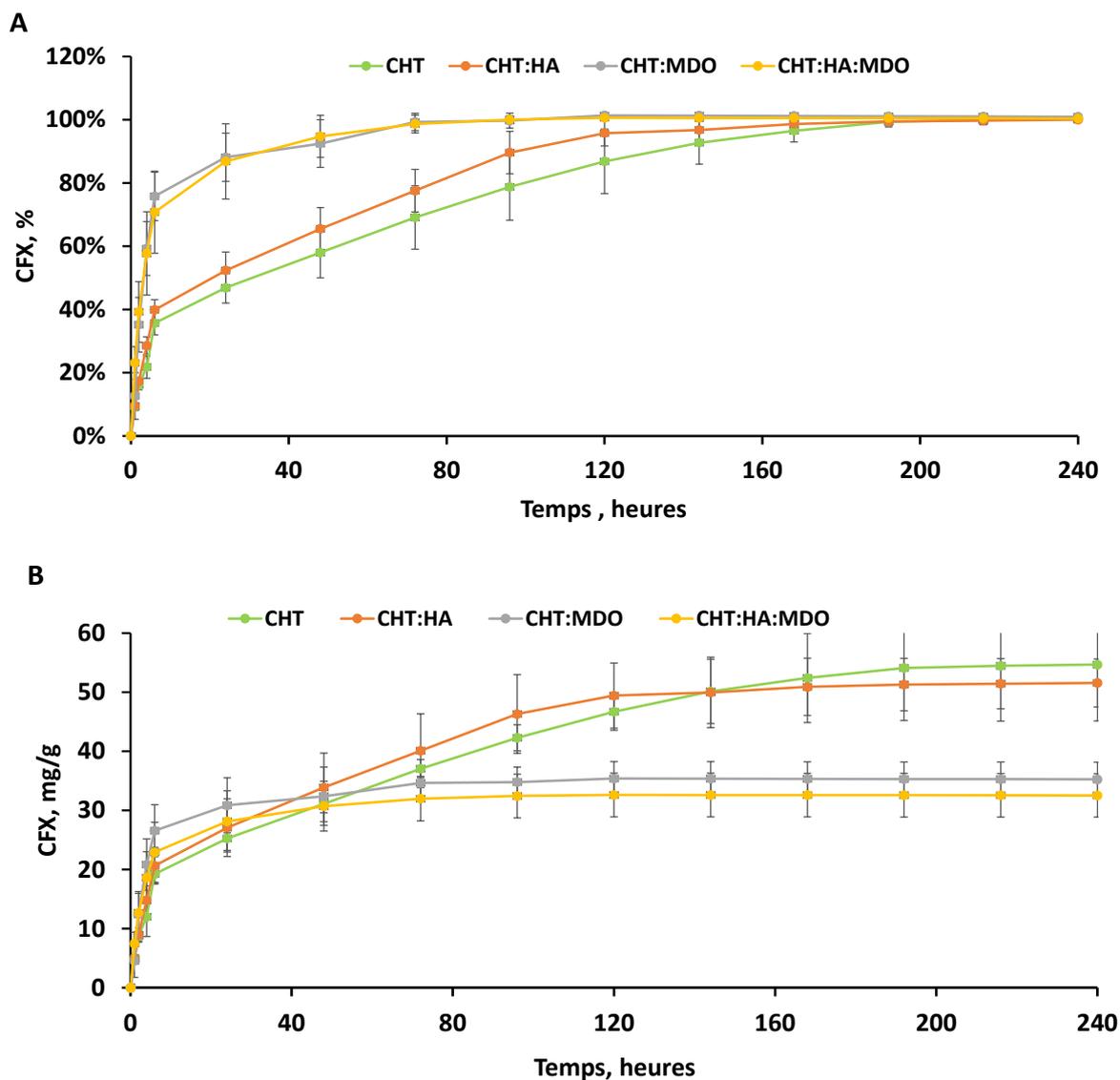


Figure 53 : **(A)** Profils de libération de la CFX exprimés en pourcentage (%), et en quantité (mg/g) **(B)**. Pour les éponges de CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:MDo (5:0,4) et CHT:HA:MDo (5:1:0,4) Le test a été réalisé dans des conditions stériles sous agitation (80 rpm) à 37°C en trois exemplaires (n=3).

Tous les groupes d'éponges ont montré une libération prononcée (effet *burst*) au cours des 6 premières heures. Parmi eux, le CHT:MDo et le CHT:HA:MDo ont montré la plus forte libération pendant cette période avec $76\% \pm 8\%$ et $71\% \pm 13\%$ de CFX libérée, respectivement, suivis par le CHT:HA ($40\% \pm 3\%$) et le CHT ($36\% \pm 4\%$).

Les profils de libération des éponges CHT:MDo et CHT:HA:MDo ont atteint un plateau précocement avec une libération complète de la CFX après 96 heures, correspondant à $34,6 \pm 2,5$ mg/g et $32 \pm 3,7$ mg/g, respectivement. D'autre part, les éponges CHT:HA et CHT ont montré des profils de libération soutenus, puisque le plateau avec une libération complète de

CFX a été atteint après 168 heures pour CHT:HA et après 192 heures pour CHT, correspondant à $49,4 \pm 5,5$ mg/g et $54,5 \pm 9,3$ mg/g de CFX libéré, respectivement.

Ainsi, les éponges non réticulées (CHT et CHT:HA) ont montré un effet *burst* moins important et une libération de CFX prolongée par rapport aux mêmes éponges réticulées avec la MDo. Il est intéressant de noter que la présence d'HA dans les éponges réticulées et non réticulées n'a pas modifié de manière significative les profils de libération par rapport aux éponges composées uniquement de CHT, cela signifie que le profil de libération est principalement contrôlé par l'interaction CHT-CFX et que la réticulation chimique avec MDo modifie le profil de libération.

Les différences observées dans la cinétique de libération du CFX sont liées aux interactions chimiques entre les éponges et la CFX. En effet, les groupes fonctionnels du CHT sont capables de former des interactions électrostatiques avec la CFX. Selon A. Semwal *et al.* des interactions électrostatiques entre les groupes amine du CHT et les groupes carboxylate de la CFX sont possibles, ce qui favorise l'affinité entre le CHT et le CFX ¹⁷⁹. Après la réticulation des éponges avec le MDo, certains groupes amine du CHT ont été impliqués dans la réaction chimique et ne sont pas disponibles pour interagir avec la CFX, ce qui explique la plus faible quantité de CFX libérée par les éponges CHT:MDo et CHT:HA:MDo mais aussi la libération plus rapide. En outre, nos résultats ont montré que l'HA n'a pas eu d'effet significatif d'inhibition ou d'amélioration sur le mécanisme de liaison et de libération de la CFX.

En conclusion, la diminution de la libération de la CFX observée dans les éponges réticulées au MDo est principalement liée à des interactions physicochimiques spécifiques entre la molécule de CFX et le réseau polymère réticulé.

La figure 54 (A, B) présente le profil de libération de la CFX à partir des éponges contenant de l'HMTA.

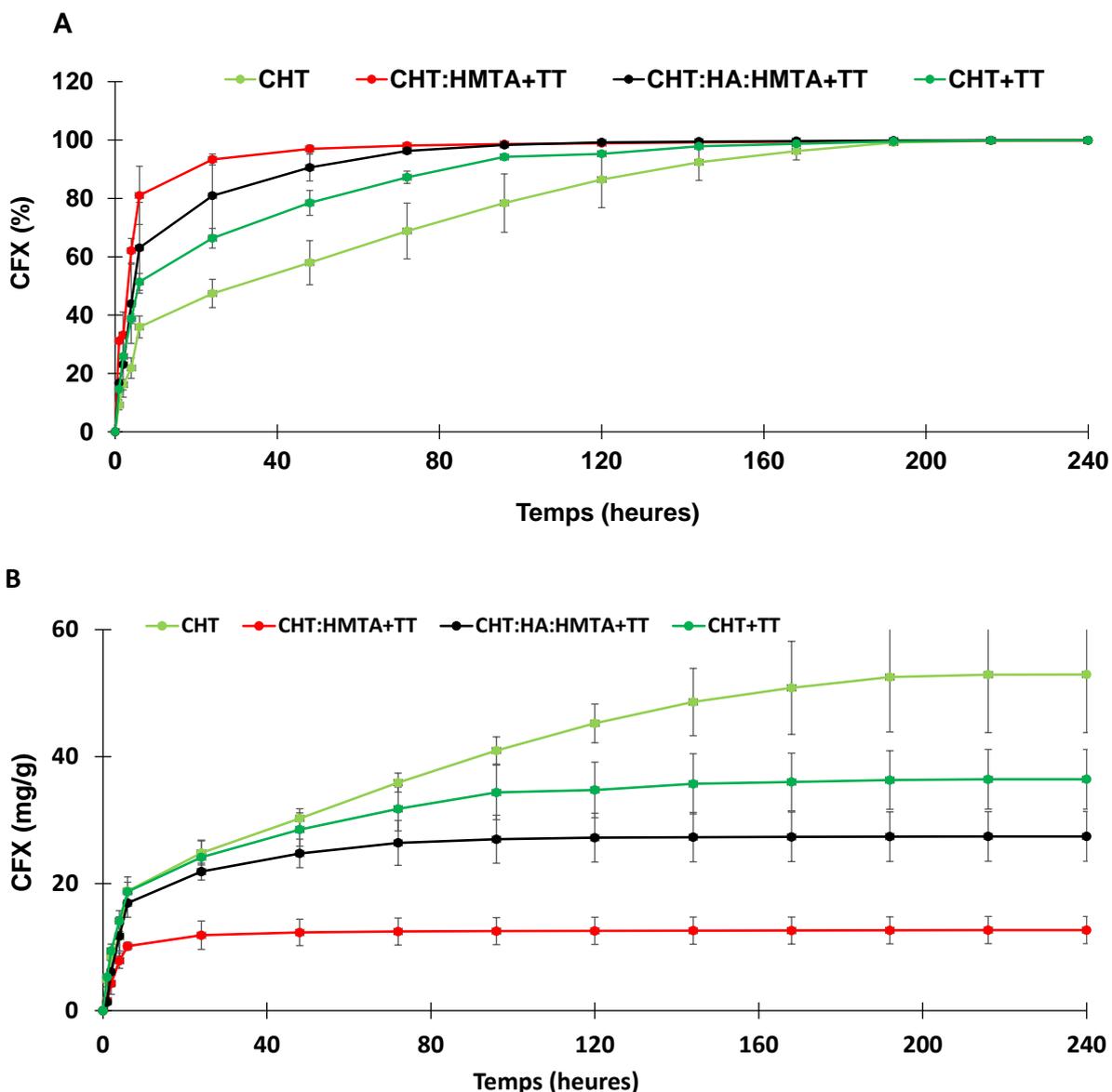


Figure 54 : (A) Profils de libération de la CFX exprimés en pourcentage (%) et en quantité (mg/g) (B). Pour les éponges de CHT 5%, CHT 5%+TT, CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT. TT : traitement thermique. Le test a été réalisé dans des conditions stériles sous agitation (80 rpm) à 37°C en trois exemplaires (n=3).

Différents profils de libération de la CFX ont été observés selon la composition des différentes éponges, les formulations contenant HMTA présentent une libération plus rapide, tandis que celles sans HMTA montrent un profil de libération prolongée. Sur l'ensemble de la période, les quantités cumulées libérées varient d'environ 12 mg/g à plus de 52 mg/g, allant de CHT:HMTA+TT, qui libère le moins de CFX, à CHT qui au contraire, en libère plus.

L'analyse des profils de libération met en évidence un *effet burst* important au cours des 6 premières heures, particulièrement marqué pour l'éponge CHT:HMTA+TT (81 % ± 10 %), suivie de CHT:HA:HMTA+TT (63,1 % ± 15,6 %), CHT+TT (51,4 % ± 2,9 %) et CHT (36 % ± 4

%). Les éponges de CHT:HMTA+TT atteignent un plateau rapidement dès 72 heures ($12,5 \pm 2,1$ mg/g), tandis que les éponges CHT:HA:HMTA+TT et CHT+TT atteignent un plateau après 120 heures ($27,2 \pm 3,8$ mg/g) et 168 heures ($36,3 \pm 4,6$ mg/g), respectivement. Ces résultats montrent que la réticulation du CHT par le formaldéhyde provenant de la décomposition thermique de l'HMTA réduit la quantité de CFX libérée. Ce phénomène s'explique par la réticulation chimique du CHT, qui limite les sites de fixation de la CFX sur les groupements amines du CHT. Cette observation est cohérente avec les résultats obtenus pour les éponges réticulées avec la MDo.

Dans le système avec HMTA, les éponges contenant du HA libèrent davantage de CFX que celles sans HA (figure 54B), contrairement à ce qui a été observé pour les éponges CHT:HA:MDo. Cette différence ne semble pas liée au taux de gonflement des éponges, qui reste similaire entre les groupes. Une augmentation de 54 % de la quantité de CFX libérée par gramme d'éponge (mg/g) est constatée, suggérant une possible interaction chimique entre le HA et la CFX,¹⁸⁰ le phénomène est observé uniquement dans les systèmes réticulés avec l'HMTA.

Les éponges de formulation CHT+TT présentent un profil de libération plus prolongé dans le temps comparativement aux autres groupes. Bien qu'elles ne soient pas réticulées chimiquement, elles libèrent des quantités de CFX significativement plus élevées que les éponges réticulées avec l'HMTA, avec une augmentation d'environ 33 % par rapport aux éponges CHT:HA:HMTA+TT et de 65 % par rapport aux CHT:HMTA+TT. Cette libération plus importante pourrait s'expliquer par l'absence de réticulation chimique au sein de ces éponges, qui laisse plus de sites disponibles à la fixation de la CFX. Toutefois, en comparaison avec les éponges de CHT non traitées thermiquement, une baisse de 33 % de la quantité de CFX libérée est observée pour les éponges CHT+TT, cela est dû au renforcement des éponges traitées thermiquement.

La Figure 55 illustre la quantité de CFX libérée (mg/g) après 240 heures pour chaque groupe d'éponges, permettant ainsi d'évaluer l'impact du type de réticulation (MDo ou HMTA) sur la libération du principe actif.

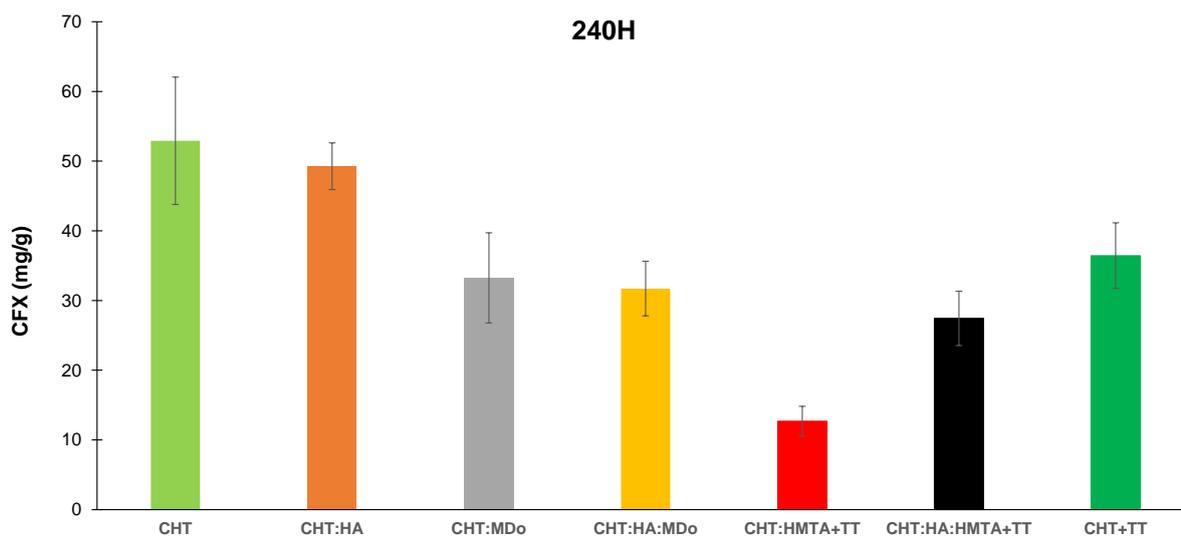


Figure 55 : comparaison de la quantité de CFX (mg/g) libérée par les éponges de CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4), CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT après 240h. TT : traitement thermique, n=3.

L'analyse des profils de libération de la CFX montre des différences entre les systèmes réticulés avec MDo et de l'HMTA. Les éponges réticulées à l'HMTA (CHT:HMTA+TT) libèrent environ 62 % de CFX en moins que celles réticulées au MDo (CHT:MDo), ce qui traduit une structure plus dense limitant la diffusion de la CFX. Cette tendance est également observée dans les formulations contenant de l'HA, avec une baisse de 13,5 % pour les éponges CHT:HA:HMTA+TT par rapport à CHT:HA:MDo.

L'ajout de l'HA agit de manière distincte selon le système : il n'a pas d'impact significatif dans les éponges réticulées au MDo, tandis qu'il augmente de 116 % la libération de la CFX dans les éponges réticulées avec le formaldéhyde provenant de la décomposition thermique de l'HMTA. La différence observée résulte des mécanismes distincts de réticulation. Dans le cas des éponges réticulées avec la MDo, un réseau covalent stable et peu dense se forme, dont la structure reste inchangée malgré l'ajout d'HA. À l'inverse, pour les systèmes réticulés à l'HMTA, la libération de formaldéhyde qui est une molécule de faible poids moléculaire entraîne une réticulation dense par la création de ponts méthylène entre les chaînes de CHT. Dans ce contexte, l'incorporation d'HA dans les éponges CHT:HMTA+TT perturbe la compacité du réseau, probablement en diminuant la densité de réticulation, ce qui facilite la diffusion de la CFX. Ces résultats soulignent l'influence du type de réticulant chimique et de ses interactions sur la capacité de libération de la CFX.

En conclusion La libération de la CFX est principalement déterminée par les interactions entre le CHT et la CFX, et la nature du réticulant chimique joue un rôle déterminant dans ce processus. En effet, les éponges réticulées à l'HMTA présentent une libération plus faible de

CFX que celles réticulées au MDo, ce qui s'explique par la formation d'un réseau polymère plus compact et limite la libération de la CFX. Par ailleurs, l'ajout d'HA exerce un effet variable selon le type de réticulation : il n'altère pas le profil de libération dans les éponges CHT:MDo, alors qu'il favorise une augmentation de la libération de la CFX dans les éponges CHT:HMTA. Cette différence est probablement due à une perturbation de la structure du réseau polymère réticulés, ce qui réduit la rétention de la CFX dans l'éponge et facilite sa diffusion. Ainsi, le choix du réticulant et l'incorporation d'HA apparaissent comme des paramètres clés pour moduler la libération de la CFX.

3. Evaluation microbiologique

L'activité antibactérienne des milieux de libération a été évaluée par diffusion en présence d'*E. coli*. Les figures 56 et 57 montrent les diamètres d'inhibition (zone de non-prolifération bactérienne) en fonction du temps (320h). Les éponges testées sont CHT, CHT:HA, CHT:MDo et CHT:HA:MDo (figure 56) et CHT:HMTA+TT, CHT:HA:HMTA+TT et CHT+TT (figure 57).

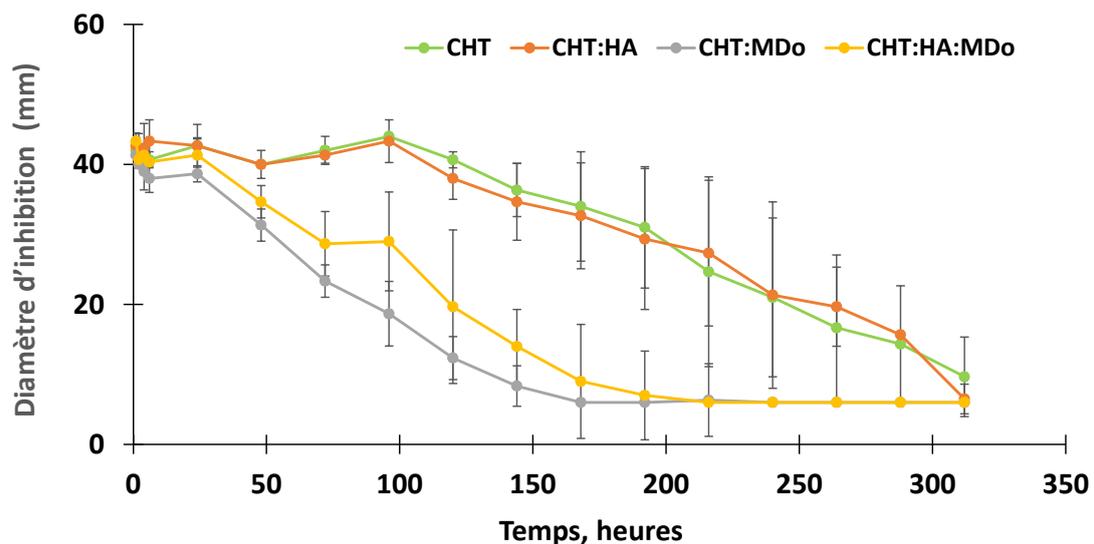


Figure 56 : Diamètre d'inhibition (test de diffusion) après libération statique (sans flux constant) sur *E. coli* K12, éponges de CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4) ($n=3$). La valeur initiale de 6 mm correspond au diamètre du puits, expliquant l'absence de retour à zéro.

Le test de diffusion réalisé sur les milieux de libération prélevés au cours des 100 premières heures à partir des éponges de CHT et de CHT:HA a révélé un diamètre d'inhibition constant, avoisinant 44 mm, ensuite, ce diamètre diminue progressivement pour atteindre 6 mm en fin du test (320 heures).

L'activité antibactérienne du milieu de libération des éponges CHT:MDo diminue progressivement, avec un diamètre d'inhibition passant de $38,7 \pm 1$ mm après 24 heures à 6

mm après 168 heures. Une évolution similaire est observée pour les éponges CHT:HA:MDo le diamètre d'inhibition, initialement de $41,3 \pm 2,3$ mm après 24 heures, diminue progressivement jusqu'à 6 mm après 216 heures. Ces résultats mettent en évidence une corrélation entre l'activité antibactérienne et la libération de la CFX avec les conclusions suivantes : 1) L'activité antibactérienne est plus soutenue pour les éponges de CHT et CHT:HA par rapport aux éponges réticulés avec la MDo. 2) La présence d'HA dans les éponges n'a pas eu d'impact significatif sur le profil de l'activité antibactérienne des éponges avec ou sans MDo.

La figure 57 illustre l'activité antibactérienne des milieux de libération recueillis lors du test de libération de la CFX pour les éponges réticulées avec l'HMTA.

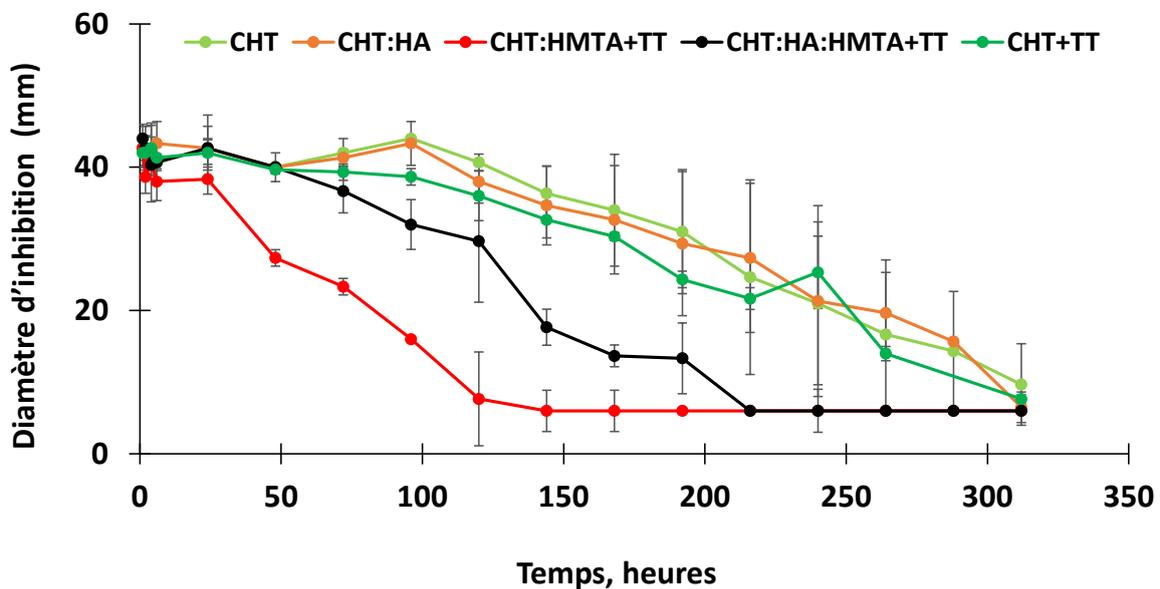


Figure 57 : Diamètre d'inhibition (test de diffusion) après libération statique sur *E. coli* K12 des éponges CHT 5%, CHT:HA (5:1), CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1) +TT, CHT 5%+TT, TT : traitement thermique (n=3). La valeur initiale de 6 mm correspond au diamètre du puits, expliquant l'absence de retour à zéro.

Au cours des premières heures d'analyse, les éponges CHT, CHT:HA et CHT+TT présentent des diamètres d'inhibition stables et comparables de 42 ± 2 mm, traduisant une activité antibactérienne similaire. Les milieux issus des éponges CHT:HMTA+TT présentent une activité antibactérienne élevée au début, illustrée par un diamètre d'inhibition stable autour de 40 ± 2 mm, qui décroît progressivement jusqu'à 144 heures. Cette évolution est en phase avec le profil de libération de la CFX, dont la libération cesse après 72 heures. Toutefois, l'effet antibactérien persistant jusqu'à 144 heures indique la présence de quantités résiduelles de CFX, insuffisantes pour être détectées par les méthodes analytiques classiques, mais encore

capables d'inhiber la croissance bactérienne. À l'inverse, les éponges CHT+TT maintiennent leur activité sur une période nettement plus longue (7 ± 1 mm à 312 heures), ce qui s'explique par une libération prolongée de la CFX (168 heures) contre 72 heures pour CHT:HMTA+TT et par une quantité de CFX libérée près de 3 fois supérieure pour CHT+TT en comparaison avec CHT:HMTA+TT. Par ailleurs, l'ajout de l'HA à la formulation CHT:HMTA+TT (CHT:HA:HMTA+TT) permet d'étendre la durée de l'activité antibactérienne jusqu'à 216 heures (6 mm), contre 144 heures (6 ± 3 mm) pour les éponges sans HA (CHT:HMTA+TT), ce qui est en accord avec son profil de libération prolongé de la CFX.

En conclusion, tous les milieux de libération de la CFX issus des différentes éponges ont montré une activité antibactérienne contre *E. coli* K12 durant les premières heures. Cependant, cette activité diminue et prend fin plus rapidement pour les éponges CHT:HMTA+TT (144h) et CHT:MDo (168h), suivies par CHT:HA:MDo (216h) et CHT:HA:HMTA+TT (216h). En revanche, les éponges de CHT, CHT+TT et CHT:HA présentent une activité prolongée (312h), en accord avec leur profil de libération. Ces résultats soulignent l'impact du processus de réticulation chimique des éponges CHT et CHT:HA par la MDo ou l'HMTA sur leur cinétique de libération du principe actif et, par conséquent, sur leur activité antibactérienne.

4. Evaluation biologique - cytotoxicité

La figure 58 montre l'étude de la cytotoxicité par méthode indirecte, réalisée avec les cellules pré-ostéoblastiques MC3T3-E1 selon la norme ISO10993-5.

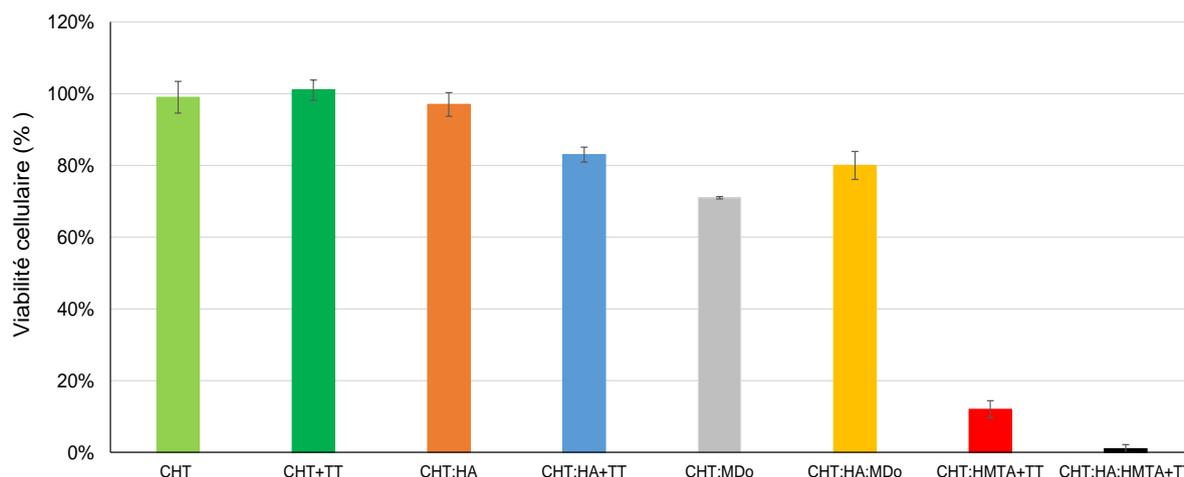


Figure 58 : Viabilité cellulaire mesurée par la méthode de l'extrait (technique indirecte) selon la norme ISO 10993-5 pour les éponges de CHT 5%, CHT 5%+TT, CHT:HA (5:1), CHT:HA (5:1)+TT, CHT:MDo (5:0,4), CHT:HA:MDo (5:1:0,4), CHT:HMTA (5:1)+TT, CHT:HA:HMTA (5:1:1)+TT. TT : traitement thermique.

Les résultats de viabilité cellulaire montrent que les éponges de CHT et CHT:HA présentent des taux de viabilité élevés, respectivement de 100% et 97%, indiquant une absence de toxicité au regard de la norme ISO10993-5. Les éponges réticulées avec MDo (CHT:MDo et CHT:HA:MDo) montrent une diminution de la viabilité cellulaire, bien que les taux de 71% (CHT:MDo) et 80% (CHT:HA:MDo) restent au-dessus du seuil de cytotoxicité de 70% selon la norme ISO 10993-5 ^{181,182}.

Les éponges réticulées avec HMTA (CHT:HMTA+TT et CHT:HA:HMTA+TT) présentent une plus faible viabilité cellulaire. Ceci n'est pas dû au traitement thermique appliqué qui n'a pas montré de cytotoxicité (CHT+TT à 100%, CHT:HA+TT à 83%) mais probablement aux produits libérés suite à la décomposition de l'HMTA en ammoniac et formaldéhyde non lié.

Le formaldéhyde est connu comme produit cytotoxique, dans l'étude de H. Lovschal *et al.* a montré que le formaldéhyde retrouvé par exemple au niveau des produits d'obturation coronaire et canalaire (ciments canalaires) inhibe la viabilité des cellules épithéliales de la muqueuse buccale ou encore les cellules pulpaire (fibroblastes) d'une manière dose dépendante ¹⁸³.

5. Conclusion

L'analyse par DMA des propriétés mécaniques des différentes éponges a montré que la réticulation des éponges à base de CHT avec la MDo ou le formaldéhyde provenant de la décomposition de l'HMTA conduit à des structures présentant une rigidité plus élevée par rapport aux éponges témoins non réticulées chimiquement. Cette augmentation de rigidité met en évidence l'intérêt du processus de réticulation chimique, pour construire des supports stables mécaniquement et qui pourrait agir comme un paramètre influençant la différenciation cellulaire, notamment celle des chondrocytes et des cellules mésenchymateuses, ouvrant ainsi des perspectives en ingénierie tissulaire du cartilage.

L'étude du profil de libération de la CFX par ces éponges a montré des différences entre les formulations réticulées et non réticulées. Les éponges non réticulées présentent une libération prolongée, avec une quantité plus importante de CFX libérée dans le milieu. En revanche, les éponges réticulées avec MDo ou le formaldéhyde provenant de la décomposition thermique de l'HMTA, fixent une quantité plus faible de CFX, ce qui entraîne une libération plus rapide et en moindre quantité. Cette différence s'explique par des modifications structurelles induites par la réticulation, influençant la capacité de libération de ces éponges. Par ailleurs, l'incorporation d'HA n'affecte pas le profil de libération dans les systèmes réticulés ou non avec MDo, mais augmente la libération dans les éponges réticulées avec le formaldéhyde provenant

de la décomposition thermique de l'HMTA, probablement en perturbant la densité du réseau polymère. Ainsi, le choix du réticulant chimique influence directement le profil ainsi que la capacité de libération de la CFX à partir des éponges à base de CHT.

Sur le plan biologique, l'évaluation de la cytotoxicité indirecte selon la norme ISO 10993-5 a mis en évidence une différence significative entre les éponges selon le type de réticulation utilisé. Les produits libérés par les éponges réticulées avec MDo ont montré une cytocompatibilité acceptable, par rapport aux éponges à base de CHT et CHT:HA sans MDo. À l'inverse, les éponges réticulées avec le formaldéhyde provenant de la décomposition thermique HMTA ont induit une cytotoxicité importante pour les cellules MC3T3, montrant que la réticulation via HMTA est cytotoxique, probablement dû aux produits libérés et la décomposition de l'HMTA en ammoniac et formaldéhyde dont la forme libre peut être cytotoxique.

6. Conclusion générale et perspectives

Ce projet de recherche s'inscrit dans une démarche de conception de supports à base de biopolymères réticulés, destinés à des applications en régénération du cartilage articulaire. L'étude a porté sur le développement d'hydrogels lyophilisés à base de CHT seuls ou en association avec l'HA, en explorant des stratégies de réticulation, à la fois physiques et chimiques. L'objectif principal a été d'évaluer l'impact des paramètres de formulation et de la nature de la réticulation sur les propriétés structurales, mécaniques, biologiques et fonctionnelles des éponges, dans une perspective d'utilisation comme support pour la reconstruction tissulaire du cartilage.

L'analyse rhéologique de différentes solutions de CHT a permis d'identifier une concentration optimale de 5 %, offrant un compromis satisfaisant entre viscosité, élasticité et facilité de préparation. À partir de cette formulation de base, l'ajout d'HA a conduit à la formation d'un complexe polyélectrolytique (CHT:HA), stabilisé par des interactions ioniques réversibles, améliorant la cohésion de l'hydrogel en milieu aqueux. Néanmoins, cette stabilité restait limitée, justifiant le recours à une réticulation chimique pour renforcer la structure et assurer une durabilité des supports de CHT:HA. L'utilisation de la MDo comme agent de réticulation s'est révélée particulièrement pertinente. À une concentration de 0,4 %, la MDo a permis la formation d'un réseau covalent par interaction avec les groupes amines du CHT, renforçant significativement les propriétés mécaniques des hydrogels de CHT et CHT:HA, de plus, la combinaison de la réticulation physique et chimique a permis la formation d'un hydrogel fort de CHT:HA:MDo .

La transformation de ces hydrogels en éponges, par lyophilisation, a permis d'évaluer l'impact de la réticulation sur la porosité et la stabilité en conditions physiologiques. Les structures réticulées avec la MDo ont montré une résistance aux environnements acides et à l'activité enzymatique, avec une augmentation des propriétés mécaniques en comparaison avec les formulations d'éponges sans MDo. Ce comportement est attribuable à la formation de liaisons covalentes entre les fonctions aldéhydes de la MDo et les amines du CHT.

Parallèlement, une autre stratégie de réticulation chimique a été mise en œuvre en exploitant la libération de formaldéhyde issue de la décomposition thermique de l'HMTA. Ce procédé, fondé sur une réticulation *in situ* du CHT, a permis d'obtenir des éponges dotées d'une rigidité renforcée et d'une capacité de gonflement limitée. Cependant, ces structures se sont révélées plus vulnérables à la dégradation enzymatique, indiquant une réticulation moins uniforme comparée à celle obtenue avec la MDo.

Les analyses mécaniques dynamiques ont mis en évidence une relation entre la nature du réticulant chimique et la rigidité des éponges. Les éponges réticulées avec l'HMTA ont affiché des performances mécaniques supérieures à celles réticulées par la MDo. Cette capacité à moduler les propriétés mécaniques selon l'agent de réticulation offre une flexibilité pour concevoir des supports répondant aux exigences spécifiques des tissus visés, notamment le cartilage, où la rigidité de la matrice joue un rôle important dans la modulation des réponses cellulaires par la stimulation mécano-sensible et le maintien du phénotype cellulaire à long terme. Un autre aspect de l'étude a concerné la libération d'un principe actif (CFX). Les résultats ont mis en évidence que le mécanisme de libération dépend principalement des interactions entre le CHT et la CFX. La réticulation chimique, en densifiant le réseau polymère et en réduisant les sites de fixation disponibles, induit une libération plus rapide mais moins prolongée. Dans les systèmes réticulés ou non avec la MDo, l'ajout de HA n'a pas affecté le profil de libération. En revanche, dans les formulations à base d'HMTA, l'ajout de l'HA a entraîné une augmentation de la libération de la CFX dans le milieu, probablement en perturbant la structure du réseau polymère fortement réticulé. Ces observations ont été corroborées par l'analyse de l'activité antibactérienne des milieux de libération, révélant une action moins prolongée dans le temps pour les éponges ayant subi une réticulation chimique.

La biocompatibilité des différents systèmes a été évaluée par des tests de cytotoxicité indirecte sur des cellules pré ostéoblastiques MC3T3. Les hydrogels réticulés avec la MDo ont démontré une bonne tolérance cellulaire, confirmant leur potentiel pour des applications biomédicales. En revanche, les formulations contenant l'HMTA ont révélé une cytotoxicité importante, probablement liée à la présence de sous-produits de dégradation tels que le

formaldéhyde libre et l'ammoniac, connus pour leur toxicité cellulaire. Ces observations soulignent l'importance de choisir des agents réticulants non seulement efficaces mais également sûrs du point de vue biologique. Des études précliniques sur modèles animaux seront indispensables pour valider leur comportement dans un environnement physiologique complexe.

Pour approfondir et optimiser le développement de ces supports, plusieurs axes d'amélioration peuvent être envisagés. Il est nécessaire d'étudier la possibilité de stérilisation de ces éponges sans compromettre leurs propriétés mécaniques et fonctionnelles. Parmi les méthodes envisageables, la stérilisation par l'oxyde d'éthylène constitue une option intéressante. Cependant, il convient d'évaluer rigoureusement l'impact de ce procédé sur la structure des éponges réticulées, notamment sur la stabilité des liaisons chimiques et la conservation des caractéristiques viscoélastiques.

La conception d'éponges multicouches présentant un gradient progressif de rigidité permettra de mieux reproduire la structure hétérogène du cartilage naturel, qui s'intensifie en rigidité en se rapprochant de l'os sous-chondral. Par ailleurs, l'association du CHT et de l'HA avec d'autres polymères naturels tels que le collagène ou le sulfate de chondroïtine offrirait une composition plus proche de celle du cartilage natif, favorisant ainsi une interaction cellulaire plus efficace. L'incorporation de facteurs de croissance, notamment le TGF- β 3, connu pour induire la différenciation des cellules en chondrocytes, constitue également une piste prometteuse ; il serait pertinent d'explorer ses effets conjoints avec des agents tels que l'IGF-1, le FGF-18 ou le BMP-2 afin de potentialiser la régénération tissulaire. Pour améliorer d'avantages les propriétés mécaniques des zones profondes, l'intégration d'hydroxyapatite dans les couches inférieures des éponges de CHT:HA réticulées constituerait une stratégie efficace afin de mieux reproduire la jonction naturelle entre le cartilage et l'os sous-jacent.

D'un point de vue biologique, il est important d'évaluer la cytocompatibilité des éponges en culture directe avec des chondrocytes ou des CSMs différenciées, afin d'observer leur adhérence, viabilité et comportement cellulaire en contact avec les supports. Par ailleurs, l'analyse de l'expression des marqueurs spécifiques du cartilage, notamment le collagène de type II, l'aggrécane et SOX9, permettra de confirmer le maintien ou l'acquisition du phénotype chondrocytaire. Pour valider la biocompatibilité, l'intégration et la fonctionnalité des matériaux dans un environnement physiologique, il est nécessaire de réaliser des études *in vivo* sur des modèles animaux pertinents, tels que le lapin ou le porc. Enfin, l'exploration des technologies innovantes, comme la bioimpression 3D, ouvre des perspectives prometteuses pour la

fabrication de structures tissulaires complexes et multicellulaires, mieux adaptées aux exigences de la régénération cartilagineuse.

Sur le plan clinique, l'association de ces éponges au sang autologue du patient permettrait d'apporter à la fois des CSMs des facteurs de croissance essentiels, facilitant ainsi l'ingénierie tissulaire *in situ*. Cette approche pourrait être mise en œuvre cliniquement, en complément de procédures chirurgicales telle que la microfracture, dans le but d'optimiser la régénération cartilagineuse et d'améliorer les résultats fonctionnels.

7. Annexes 1- Spectres infra rouge de la maltodextrine et maltodextrine oxydée

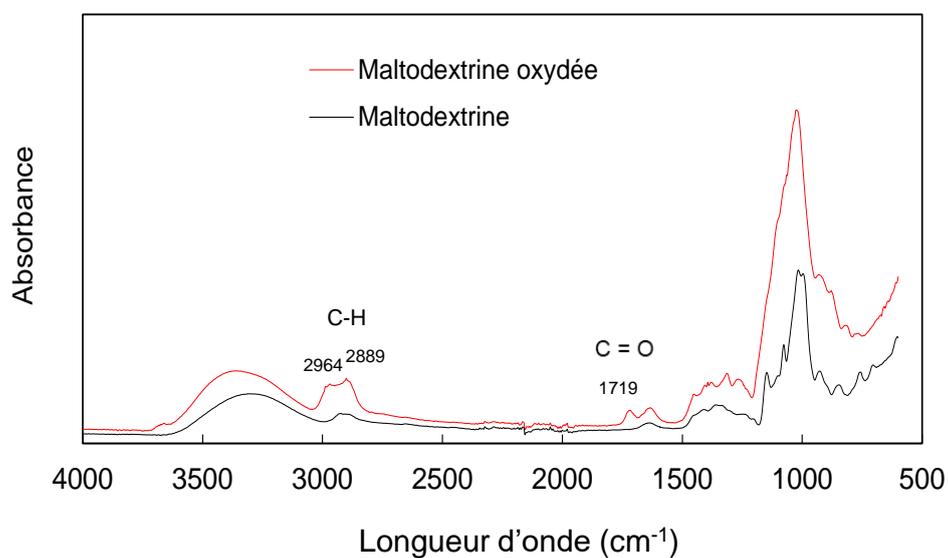


Figure 59 : Spectres IR de la maltodextrine et maltodextrine oxydée

L'analyse du spectre IR de la MDo montre un pic à 1719 cm⁻¹, ce qui montre la présence d'un groupement carbonyle (C=O), indiquant la formation d'aldéhydes. On observe aussi deux pics à 2889 et 2964 cm⁻¹, qui correspondent aux vibrations des liaisons C–H des chaînes aliphatiques. Ce résultat confirme l'oxydation de la maltodextrine.

8. Annexe 2- Publication

Article

Design and Evaluation of a Crosslinked Chitosan-Based Scaffold Containing Hyaluronic Acid for Articular Cartilage Reconstruction

Salim Hamidi ¹, Mickael Maton ¹, Feng Hildebrand ¹, Valérie Gaucher ² , Cédric Bossard ¹, Frédéric Cazaux ² , Jean Noel Staelens ² , Nicolas Blanchemain ¹ and Bernard Martel ^{2,*} 

¹ Univ. Lille, INSERM, CHU Lille, U1008-Advanced Drug Delivery Systems and Biomaterials, F-59000 Lille, France; hamidialim46@gmail.com (S.H.); mickael.maton@univ-lille.fr (M.M.); feng.hildebrand@univ-lille.fr (F.H.); cedric.bossard@univ-lille.fr (C.B.); nicolas.blanchemain@univ-lille.fr (N.B.)

² Univ. Lille, CNRS, INRAE, Centrale Lille, UMR 8207—UMET—Unité Matériaux et Transformations, F-59000 Lille, France; valerie.gaucher@univ-lille.fr (V.G.); frederic.cazaux@univ-lille.fr (F.C.); jean-noel.staelens@univ-lille.fr (J.N.S.)

* Correspondence: bernard.martel@univ-lille.fr; Tel.: +33-(0)3-20-43-46-35

Abstract: Polymeric scaffolds are promising in tissue engineering due to their structural similarity to extracellular matrix components. This study aimed to design freeze-dried hydrogels based on chitosan (CHT) and hyaluronic acid (HA). Chitosan-based gels were crosslinked with oxidized maltodextrin (MDo) before the freeze-drying step, resulting in spongy porous scaffolds. Based on the state-of-the-art, our hypothesis was that crosslinking would increase scaffold stiffness and delay the degradation of the CHT:HA resorbable scaffolds swelled in a hydrated physiological environment. The physicochemical and mechanical properties of crosslinked CHT- and CHT:HA-based scaffolds were analyzed. Hygroscopic and swelling behavior were assessed using dynamic vapor sorption analysis and batch studies. Degradation was evaluated under different conditions, including in phosphate-buffered saline (PBS), PBS with lysozyme, and lactic acid solutions, to investigate scaffold resistance against enzymatic and acidic degradation. The porosity of the spongy materials was characterized using scanning electron microscopy, while dynamic mechanical analysis provided information on the mechanical properties. Crosslinked scaffolds showed reduced swelling, slower degradation rates, and increased stiffness, confirming MDo as an effective crosslinking agent. Scaffolds loaded with ciprofloxacin (CFX) demonstrated their ability to deliver therapeutic agents, as the CFX loading capacity was promoted by CHT-CFX interactions. Microbiologic investigation confirmed the results. Finally, cytotoxicity tests displayed no toxicity. In conclusion, MDo-crosslinked CHT and CHT:HA scaffolds exhibit enhanced stability, functionality, and mechanical performance, making them promising for cartilage tissue engineering.



Academic Editor: Agnieszka Ewa Wiacek

Received: 3 April 2025

Revised: 9 May 2025

Accepted: 13 May 2025

Published: 17 May 2025

Citation: Hamidi, S.; Maton, M.; Hildebrand, F.; Gaucher, V.; Bossard, C.; Cazaux, F.; Staelens, J.N.; Blanchemain, N.; Martel, B. Design and Evaluation of a Crosslinked

Références bibliographiques:

- (1) Armiento, A. R.; Stoddart, M. J.; Alini, M.; Eglin, D. Biomaterials for Articular Cartilage Tissue Engineering: Learning from Biology. *Acta Biomater.* **2018**, *65*, 1–20. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.021>.
- (2) Réparer le cartilage · Inserm, La science pour la santé. Inserm. <https://www.inserm.fr/dossier/reparer-cartilage/> (accessed 2023-11-07).
- (3) Wei, W.; Dai, H. Articular Cartilage and Osteochondral Tissue Engineering Techniques: Recent Advances and Challenges. *Bioact. Mater.* **2021**, *6* (12), 4830–4855. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2021.05.011>.
- (4) O’Neill, T. W.; Felson, D. T. Mechanisms of Osteoarthritis (OA) Pain. *Curr. Osteoporos. Rep.* **2018**, *16* (5), 611–616. <https://doi.org/10.1007/s11914-018-0477-1>.
- (5) Pollet, O. L’Ingénierie Tissulaire Du Cartilage : Effet de l’âge Du Donneur et Des Contraintes Mécanique et Chimique Du Microenvironnement; 2018.
- (6) Sophia Fox, A. J.; Bedi, A.; Rodeo, S. A. The Basic Science of Articular Cartilage: Structure, Composition, and Function. *Sports Health* **2009**, *1* (6), 461–468. <https://doi.org/10.1177/1941738109350438>.
- (7) Nahian, A.; Sapra, A. Histology, Chondrocytes. In *StatPearls*; StatPearls Publishing: Treasure Island (FL), 2023.
- (8) Mow, V. C.; Bachrach, N. M.; Setton, L. A.; Guilak, F. Stress, Strain, Pressure and Flow Fields in Articular Cartilage and Chondrocytes. In *Cell Mechanics and Cellular Engineering*; Mow, V. C., Tran-Son-Tay, R., Guilak, F., Hochmuth, R. M., Eds.; Springer: New York, NY, 1994; pp 345–379. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-8425-0_20.
- (9) Athanasiou, K. A.; Darling, E. M.; Hu, J. C.; DuRaine, G. D.; Reddi, A. H. *Articular Cartilage*; CRC Press, 2017.
- (10) Davis, S.; Roldo, M.; Blunn, G.; Tozzi, G.; Roncada, T. Influence of the Mechanical Environment on the Regeneration of Osteochondral Defects. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2021**, *9*.
- (11) Hayek, E. E.; Chauvet, C.; Rannou, F. Cartilage articulaire, stress mécanique et arthrose. *Revue du Rhumatisme* **2020**, *87* (3), 223–229.
- (12) Clements, K. M.; Bee, Z. C.; Crossingham, G. V.; Adams, M. A.; Sharif, M. How Severe Must Repetitive Loading Be to Kill Chondrocytes in Articular Cartilage? *Osteoarthritis Cartilage* **2001**, *9* (5), 499–507. <https://doi.org/10.1053/joca.2000.0417>.
- (13) Fu, S.; Thompson, C. L.; Ali, A.; Wang, W.; Chapple, J. P.; Mitchison, H. M.; Beales, P. L.; Wann, A. K. T.; Knight, M. M. Mechanical Loading Inhibits Cartilage Inflammatory Signalling via an HDAC6 and IFT-Dependent Mechanism Regulating Primary Cilia

- Elongation. *Osteoarthritis Cartilage* **2019**, *27* (7), 1064–1074. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2019.03.003>.
- (14) Mak, A. F. "The Apparent Viscoelastic Behavior of Articular Cartilage: The Contributions from the Intrinsic Matrix Viscoelasticity and Interstitial Fluid Flows." *Journal of Biomechanical Engineering*, vol. 108, no. 2, **1986**, pp. 123–130. <https://doi.org/10.1115/1.3138591>.
- (15) Mow, V. C.; Guo, X. E. Mechano-Electrochemical Properties of Articular Cartilage: Their Inhomogeneities and Anisotropies. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* **2002**, *4*, 175–209. <https://doi.org/10.1146/annurev.bioeng.4.110701.120309>.
- (16) Sadeghi, H.; Shepherd, D. E. T.; Espino, D. M. Effect of the Variation of Loading Frequency on Surface Failure of Bovine Articular Cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* **2015**, *23* (12), 2252–2258. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2015.06.002>.
- (17) Little, C. J.; Bawolin, N. K.; Chen, X. Mechanical Properties of Natural Cartilage and Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2011**, *17* (4), 213–227. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2010.0572>.
- (18) Jeznach, O.; Kołbuk, D.; Sajkiewicz, P. Injectable Hydrogels and Nanocomposite Hydrogels for Cartilage Regeneration. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2018**, *106* (10), 2762–2776. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36449>.
- (19) Wu, J.; Chen, Q.; Deng, C.; Xu, B.; Zhang, Z.; Yang, Y.; Lu, T. Exquisite Design of Injectable Hydrogels in Cartilage Repair. *Theranostics* **2020**, *10* (21), 9843. <https://doi.org/10.7150/thno.46450>.
- (20) Liang, Y.; Li, J.; Wang, Y.; He, J.; Chen, L.; Chu, J.; Wu, H. Platelet Rich Plasma in the Repair of Articular Cartilage Injury: A Narrative Review. *Cartilage* **2022**, *13* (3), 19476035221118419. <https://doi.org/10.1177/19476035221118419>.
- (21) Jo, C. H.; Lee, Y. G.; Shin, W. H.; Kim, H.; Chai, J. W.; Jeong, E. C.; Kim, J. E.; Shim, H.; Shin, J. S.; Shin, I. S.; Ra, J. C.; Oh, S.; Yoon, K. S. Intra-Articular Injection of Mesenchymal Stem Cells for the Treatment of Osteoarthritis of the Knee: A Proof-of-Concept Clinical Trial. *Stem Cells Dayt. Ohio* **2014**, *32* (5), 1254–1266. <https://doi.org/10.1002/stem.1634>.
- (22) Makris, E. A.; Gomoll, A. H.; Malizos, K. N.; Hu, J. C.; Athanasiou, K. A. Repair and Tissue Engineering Techniques for Articular Cartilage. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2015**, *11* (1), 21–34. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.157>.
- (23) Minas, T.; Von Keudell, A.; Bryant, T.; Gomoll, A. H. The John Insall Award: A Minimum 10-Year Outcome Study of Autologous Chondrocyte Implantation. *Clin. Orthop.* **2014**, *472* (1), 41–51. <https://doi.org/10.1007/s11999-013-3146-9>.

- (24) Clavé, A.; Potel, J.-F.; Servien, E.; Neyret, P.; Dubrana, F.; Stindel, E. Third-Generation Autologous Chondrocyte Implantation versus Mosaicplasty for Knee Cartilage Injury: 2-Year Randomized Trial. *J. Orthop. Res. Off. Publ. Orthop. Res. Soc.* **2016**, *34* (4), 658–665. <https://doi.org/10.1002/jor.23152>.
- (25) Schneider, U.; Rackwitz, L.; Andereya, S.; Siebenlist, S.; Fensky, F.; Reichert, J.; Löer, I.; Barthel, T.; Rudert, M.; Nöth, U. A Prospective Multicenter Study on the Outcome of Type I Collagen Hydrogel-Based Autologous Chondrocyte Implantation (CaReS) for the Repair of Articular Cartilage Defects in the Knee. *Am. J. Sports Med.* **2011**, *39* (12), 2558–2565. <https://doi.org/10.1177/0363546511423369>.
- (26) Kreuz, P. C.; Müller, S.; Ossendorf, C.; Kaps, C.; Erggelet, C. Treatment of Focal Degenerative Cartilage Defects with Polymer-Based Autologous Chondrocyte Grafts: Four-Year Clinical Results. *Arthritis Res. Ther.* **2009**, *11* (2), R33. <https://doi.org/10.1186/ar2638>.
- (27) Niethammer, T. R.; Pietschmann, M. F.; Horng, A.; Roßbach, B. P.; Ficklscherer, A.; Jansson, V.; Müller, P. E. Graft Hypertrophy of Matrix-Based Autologous Chondrocyte Implantation: A Two-Year Follow-up Study of NOVOCART 3D Implantation in the Knee. *Knee Surg. Sports Traumatol. Arthrosc. Off. J. ESSKA* **2014**, *22* (6), 1329–1336. <https://doi.org/10.1007/s00167-013-2454-7>.
- (28) Calvo, R.; Figueroa, D.; Figueroa, F.; Bravo, J.; Contreras, M.; Zilleruelo, N. Treatment of Patellofemoral Chondral Lesions Using Microfractures Associated with a Chitosan Scaffold: Mid-Term Clinical and Radiological Results. *CARTILAGE* **2021**, *13* (1_suppl), 1258S-1264S. <https://doi.org/10.1177/19476035211011506>.
- (29) Bishop, M. E.; Seigo, M. A.; Hadley, C. J.; Freedman, K. B. Failure After Osteochondral Allograft Transplantation with the Chondrofix Implant: A Report of Two Cases. *JBJS Case Connect.* **2018**, *8* (4), e86. <https://doi.org/10.2106/JBJS.CC.17.00311>.
- (30) Kwon, H.; Brown, W. E.; Lee, C. A.; Wang, D.; Paschos, N.; Hu, J. C.; Athanasiou, K. A. Surgical and Tissue Engineering Strategies for Articular Cartilage and Meniscus Repair. *Nat. Rev. Rheumatol.* **2019**, *15* (9), 550–570. <https://doi.org/10.1038/s41584-019-0255-1>.
- (31) Little, C. J.; Bawolin, N. K.; Chen, X. Mechanical Properties of Natural Cartilage and Tissue-Engineered Constructs. *Tissue Eng. Part B Rev.* **2011**, *17* (4), 213–227. <https://doi.org/10.1089/ten.TEB.2010.0572>.
- (32) Balakrishnan, B.; Banerjee, R. Biopolymer-Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Chem. Rev.* **2011**, *111* (8), 4453–4474. <https://doi.org/10.1021/cr100123h>.
- (33) Zhang, L.; Hu, J.; Athanasiou, K. A. The Role of Tissue Engineering in Articular Cartilage Repair and Regeneration. *Crit. Rev. Biomed. Eng.* **2009**, *37* (1–2), 1–57.

- (34) Lesage, C.; Lafont, M.; Guihard, P.; Weiss, P.; Guicheux, J.; Delplace, V. Material-Assisted Strategies for Osteochondral Defect Repair. *Adv. Sci. Weinh. Baden-Wurt. Ger.* **2022**, *9* (16), e2200050. <https://doi.org/10.1002/advs.202200050>.
- (35) Jakob, M.; Démartean, O.; Schäfer, D.; Hintermann, B.; Dick, W.; Heberer, M.; Martin, I. Specific Growth Factors during the Expansion and Redifferentiation of Adult Human Articular Chondrocytes Enhance Chondrogenesis and Cartilaginous Tissue Formation in Vitro. *J. Cell. Biochem.* **2001**, *81* (2), 368–377. [https://doi.org/10.1002/1097-4644\(20010501\)81:2<368::aid-jcb1051>3.0.co;2-j](https://doi.org/10.1002/1097-4644(20010501)81:2<368::aid-jcb1051>3.0.co;2-j).
- (36) Kwon, H.; Paschos, N. K.; Hu, J. C.; Athanasiou, K. Articular Cartilage Tissue Engineering: The Role of Signaling Molecules. *Cell. Mol. Life Sci.* **2016**, *73* (6), 1173–1194. <https://doi.org/10.1007/s00018-015-2115-8>.
- (37) Dehghan-Baniani, D.; Chen, Y.; Wang, D.; Bagheri, R.; Solouk, A.; Wu, H. Injectable in Situ Forming Kartogenin-Loaded Chitosan Hydrogel with Tunable Rheological Properties for Cartilage Tissue Engineering. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2020**, *192*, 111059. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111059>.
- (38) Villanueva, I.; Hauschulz, D. S.; Mejjic, D.; Bryant, S. J. Static and Dynamic Compressive Strains Influence Nitric Oxide Production and Chondrocyte Bioactivity When Encapsulated in PEG Hydrogels of Different Crosslinking Densities. *Osteoarthritis Cartilage* **2008**, *16* (8), 909–918. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2007.12.003>.
- (39) Hutmacher, D. W. Scaffolds in Tissue Engineering Bone and Cartilage. *Biomaterials* **2000**, *21* (24), 2529–2543. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00121-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00121-6).
- (40) Wasyleczko, M.; Sikorska, W.; Chwojnowski, A. Review of Synthetic and Hybrid Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering. *Membranes* **2020**, *10* (11), 348. <https://doi.org/10.3390/membranes10110348>.
- (41) Wasyleczko, M.; Remiszewska, E.; Sikorska, W.; Dulnik, J.; Chwojnowski, A. Scaffolds for Cartilage Tissue Engineering from a Blend of Polyethersulfone and Polyurethane Polymers. *Molecules* **2023**, *28* (7), 3195. <https://doi.org/10.3390/molecules28073195>.
- (42) Nukavarapu, S. P.; Dorcemus, D. L. Osteochondral Tissue Engineering: Current Strategies and Challenges. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31* (5), 706–721. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.11.004>.
- (43) Chu, C. R.; Coutts, R. D.; Yoshioka, M.; Harwood, F. L.; Monosov, A. Z.; Amiel, D. Articular Cartilage Repair Using Allogeneic Perichondrocyte-Seeded Biodegradable Porous Polylactic Acid (PLA): A Tissue-Engineering Study. *J. Biomed. Mater. Res.* **1995**, *29* (9), 1147–1154. <https://doi.org/10.1002/jbm.820290915>.
- (44) Malda, J.; Woodfield, T. B. F.; van der Vloodt, F.; Wilson, C.; Martens, D. E.; Tramper, J.; van Blitterswijk, C. A.; Riesle, J. The Effect of PEGT/PBT Scaffold Architecture on the

- Composition of Tissue Engineered Cartilage. *Biomaterials* **2005**, *26* (1), 63–72. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.02.046>.
- (45) Nukavarapu, S. P.; Dorcenus, D. L. Osteochondral Tissue Engineering: Current Strategies and Challenges. *Biotechnol. Adv.* **2013**, *31* (5), 706–721. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2012.11.004>.
- (46) Lopa, S.; Madry, H. Bioinspired Scaffolds for Osteochondral Regeneration. *Tissue Eng. Part A* **2014**, *20* (15–16), 2052–2076. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2013.0356>.
- (47) Chen, G.; Sato, T.; Tanaka, J.; Tateishi, T. Preparation of a Biphasic Scaffold for Osteochondral Tissue Engineering. *Mater. Sci. Eng. C* **2006**, *26*, 118–123. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.07.024>.
- (48) Wasyleczko, M.; Sikorska, W.; Chwojnowski, A. Review of Synthetic and Hybrid Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering. *Membranes* **2020**, *10* (11), 348. <https://doi.org/10.3390/membranes10110348>.
- (49) Cao, Z.; Dou, C.; Dong, S. Scaffolding Biomaterials for Cartilage Regeneration. *J. Nanomater.* **2014**, *2014*, e489128. <https://doi.org/10.1155/2014/489128>.
- (50) Jeong, C. G.; Hollister, S. J. A Comparison of the Influence of Material on in Vitro Cartilage Tissue Engineering with PCL, PGS, and POC 3D Scaffold Architecture Seeded with Chondrocytes. *Biomaterials* **2010**, *31* (15), 4304–4312. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.01.145>.
- (51) Rocha, C. V.; Gonçalves, V.; da Silva, M. C.; Bañobre-López, M.; Gallo, J. PLGA-Based Composites for Various Biomedical Applications. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23* (4), 2034. <https://doi.org/10.3390/ijms23042034>.
- (52) Pişkin, E. Biodegradable Polymers as Biomaterials. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1995**, *6* (9), 775–795. <https://doi.org/10.1163/156856295x00175>.
- (53) Castañeda-Rodríguez, S.; González-Torres, M.; Ribas-Aparicio, R. M.; Del Prado-Audelo, M. L.; Leyva-Gómez, G.; Güreş, E. S.; Sharifi-Rad, J. Recent Advances in Modified Poly (Lactic Acid) as Tissue Engineering Materials. *J. Biol. Eng.* **2023**, *17*, 21. <https://doi.org/10.1186/s13036-023-00338-8>.
- (54) Lee, N. K.; Oh, H. J.; Hong, C. M.; Suh, H.; Hong, S. H. Comparison of the Synthetic Biodegradable Polymers, Polylactide (PLA), and Polylactic-Co-Glycolic Acid (PLGA) as Scaffolds for Artificial Cartilage. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **2009**, *14* (2), 180–186. <https://doi.org/10.1007/s12257-008-0208-z>.
- (55) Tamai, N.; Myoui, A.; Hirao, M.; Kaito, T.; Ochi, T.; Tanaka, J.; Takaoka, K.; Yoshikawa, H. A New Biotechnology for Articular Cartilage Repair: Subchondral Implantation of a Composite of Interconnected Porous Hydroxyapatite, Synthetic Polymer (PLA-PEG), and

- Bone Morphogenetic Protein-2 (rhBMP-2). *Osteoarthritis Cartilage* **2005**, *13* (5), 405–417. <https://doi.org/10.1016/j.joca.2004.12.014>.
- (56) Zhang, Y.; Zhang, J.; Chang, F.; Xu, W.; Ding, J. Repair of Full-Thickness Articular Cartilage Defect Using Stem Cell-Encapsulated Thermogel. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **2018**, *88*, 79–87. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.02.028>.
- (57) Ching, K. Y.; Andriotis, O.; Sengers, B.; Stolz, M. Genipin Crosslinked Chitosan/PEO Nanofibrous Scaffolds Exhibiting an Improved Microenvironment for the Regeneration of Articular Cartilage. *J. Biomater. Appl.* **2021**, *36* (3), 503–516. <https://doi.org/10.1177/08853282211002015>.
- (58) Demoor, M.; Ollitrault, D.; Gomez-Leduc, T.; Bouyoucef, M.; Hervieu, M.; Fabre, H.; Lafont, J.; Denoix, J.-M.; Audigié, F.; Mallein-Gerin, F.; Legendre, F.; Galera, P. Cartilage Tissue Engineering: Molecular Control of Chondrocyte Differentiation for Proper Cartilage Matrix Reconstruction. *Biochim. Biophys. Acta* **2014**, *1840* (8), 2414–2440. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2014.02.030>.
- (59) Shojarazavi, N.; Mashayekhan, S.; Pazooki, H.; Mohsenifard, S.; Baniasadi, H. Alginate/Cartilage Extracellular Matrix-Based Injectable Interpenetrating Polymer Network Hydrogel for Cartilage Tissue Engineering. *J. Biomater. Appl.* **2021**, *36* (5), 803–817. <https://doi.org/10.1177/08853282211024020>.
- (60) Awad, H. A.; Wickham, M. Q.; Leddy, H. A.; Gimble, J. M.; Guilak, F. Chondrogenic Differentiation of Adipose-Derived Adult Stem Cells in Agarose, Alginate, and Gelatin Scaffolds. *Biomaterials* **2004**, *25* (16), 3211–3222. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.045>.
- (61) Giroto, D.; Urbani, S.; Brun, P.; Renier, D.; Barbucci, R.; Abatangelo, G. Tissue-Specific Gene Expression in Chondrocytes Grown on Three-Dimensional Hyaluronic Acid Scaffolds. *Biomaterials* **2003**, *24* (19), 3265–3275. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00160-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00160-1).
- (62) Irawan, V.; Sung, T.-C.; Higuchi, A.; Ikoma, T. Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *15* (6), 673–697. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0135-9>.
- (63) Suh, J. K.; Matthew, H. W. Application of Chitosan-Based Polysaccharide Biomaterials in Cartilage Tissue Engineering: A Review. *Biomaterials* **2000**, *21* (24), 2589–2598. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00126-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00126-5).
- (64) Zhou, F.; Zhang, X.; Cai, D.; Li, J.; Mu, Q.; Zhang, W.; Zhu, S.; Jiang, Y.; Shen, W.; Zhang, S.; Ouyang, H. W. Silk Fibroin-Chondroitin Sulfate Scaffold with Immuno-Inhibition Property for Articular Cartilage Repair. *Acta Biomater.* **2017**, *63*, 64–75. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.09.005>.

- (65) Cheng, G.; Davoudi, Z.; Xing, X.; Yu, X.; Cheng, X.; Li, Z.; Deng, H.; Wang, Q. Advanced Silk Fibroin Biomaterials for Cartilage Regeneration. *ACS Biomater. Sci. Eng.* **2018**, *4* (8), 2704–2715. <https://doi.org/10.1021/acsbiomaterials.8b00150>.
- (66) Correia, C. R.; Moreira-Teixeira, L. S.; Moroni, L.; Reis, R. L.; van Blitterswijk, C. A.; Karperien, M.; Mano, J. F. Chitosan Scaffolds Containing Hyaluronic Acid for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part C Methods* **2011**, *17* (7), 717–730. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0467>.
- (67) Subramanian, A.; Lin, H.-Y. Crosslinked Chitosan: Its Physical Properties and the Effects of Matrix Stiffness on Chondrocyte Cell Morphology and Proliferation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *75* (3), 742–753. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30489>.
- (68) Yan, L.-P.; Wang, Y.-J.; Ren, L.; Wu, G.; Caridade, S. G.; Fan, J.-B.; Wang, L.-Y.; Ji, P.-H.; Oliveira, J. M.; Oliveira, J. T.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Genipin-Cross-Linked Collagen/Chitosan Biomimetic Scaffolds for Articular Cartilage Tissue Engineering Applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *95* (2), 465–475. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32869>.
- (69) Lu, J. X.; Prudhommeaux, F.; Meunier, A.; Sedel, L.; Guillemin, G. Effects of Chitosan on Rat Knee Cartilages. *Biomaterials* **1999**, *20* (20), 1937–1944. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00097-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00097-6).
- (70) Chen, Q.; Qi, Y.; Jiang, Y.; Quan, W.; Luo, H.; Wu, K.; Li, S.; Ouyang, Q. Progress in Research of Chitosan Chemical Modification Technologies and Their Applications. *Mar. Drugs* **2022**, *20* (8), 536. <https://doi.org/10.3390/md20080536>.
- (71) Liu, X.; Ma, L.; Mao, Z.; Gao, C. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Repair and Regeneration. In *Chitosan for Biomaterials II*; Jayakumar, R., Prabakaran, M., Muzzarelli, R. A. A., Eds.; Advances in Polymer Science; Springer: Berlin, Heidelberg, 2011; pp 81–127. https://doi.org/10.1007/12_2011_118.
- (72) Kim, Y.; Zharkinbekov, Z.; Raziyeva, K.; Tabyldiyeva, L.; Berikova, K.; Zhumagul, D.; Temirkhanova, K.; Saparov, A. Chitosan-Based Biomaterials for Tissue Regeneration. *Pharmaceutics* **2023**, *15* (3), 807. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics15030807>.
- (73) M. Ways, T. M.; Lau, W. M.; Khutoryanskiy, V. V. Chitosan and Its Derivatives for Application in Mucoadhesive Drug Delivery Systems. *Polymers* **2018**, *10* (3), 267. <https://doi.org/10.3390/polym10030267>.
- (74) Azuma, K.; Osaki, T.; Minami, S.; Okamoto, Y. Anticancer and Anti-Inflammatory Properties of Chitin and Chitosan Oligosaccharides. *J. Funct. Biomater.* **2015**, *6* (1), 33. <https://doi.org/10.3390/jfb6010033>.
- (75) Avelelas, F.; Horta, A.; Pinto, L. F.; Marques, S. C.; Nunes, P. M.; Pedrosa, R.; Leandro, S. M. Antifungal and Antioxidant Properties of Chitosan Polymers Obtained from

- Nontraditional *Polybius Henslowii* Sources. *Mar. Drugs* **2019**, *17* (4), 239. <https://doi.org/10.3390/md17040239>.
- (76) Ke, C.-L.; Deng, F.-S.; Chuang, C.-Y.; Lin, C.-H. Antimicrobial Actions and Applications of Chitosan. *Polymers* **2021**, *13* (6), 904. <https://doi.org/10.3390/polym13060904>.
- (77) Shih, P.-Y.; Liao, Y.-T.; Tseng, Y.-K.; Deng, F.-S.; Lin, C.-H. A Potential Antifungal Effect of Chitosan Against *Candida Albicans* Is Mediated via the Inhibition of SAGA Complex Component Expression and the Subsequent Alteration of Cell Surface Integrity. *Front. Microbiol.* **2019**, *10*, 602. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00602>.
- (78) Ueno, H.; Mori, T.; Fujinaga, T. Topical Formulations and Wound Healing Applications of Chitosan. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2001**, *52* (2), 105–115. [https://doi.org/10.1016/s0169-409x\(01\)00189-2](https://doi.org/10.1016/s0169-409x(01)00189-2).
- (79) Amirani, E.; Hallajzadeh, J.; Asemi, Z.; Mansournia, M. A.; Yousefi, B. Effects of Chitosan and Oligochitosans on the Phosphatidylinositol 3-Kinase-AKT Pathway in Cancer Therapy. *Int. J. Biol. Macromol.* **2020**, *164*, 456–467. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.07.137>.
- (80) Sarkar, S.; Das, D.; Dutta, P.; Kalita, J.; Wann, S. B.; Manna, P. Chitosan: A Promising Therapeutic Agent and Effective Drug Delivery System in Managing Diabetes Mellitus. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *247*, 116594. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2020.116594>.
- (81) Aranaz, I.; Alcántara, A. R.; Civera, M. C.; Arias, C.; Elorza, B.; Heras Caballero, A.; Acosta, N. Chitosan: An Overview of Its Properties and Applications. *Polymers* **2021**, *13* (19), 3256. <https://doi.org/10.3390/polym13193256>.
- (82) Madihally, S. V.; Matthew, H. W. Porous Chitosan Scaffolds for Tissue Engineering. *Biomaterials* **1999**, *20* (12), 1133–1142. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(99\)00011-3](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(99)00011-3).
- (83) Tomihata, K.; Ikada, Y. In Vitro and in Vivo Degradation of Films of Chitin and Its Deacetylated Derivatives. *Biomaterials* **1997**, *18* (7), 567–575. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(96\)00167-6](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(96)00167-6).
- (84) Seda Tiğli, R.; Karakeçili, A.; Gümüşderelioğlu, M. In Vitro Characterization of Chitosan Scaffolds: Influence of Composition and Deacetylation Degree. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2007**, *18* (9), 1665–1674. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3066-x>.
- (85) Zhang, H.; Neau, S. H. In Vitro Degradation of Chitosan by a Commercial Enzyme Preparation: Effect of Molecular Weight and Degree of Deacetylation. *Biomaterials* **2001**, *22* (12), 1653–1658. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00326-4](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00326-4).
- (86) Jennings, J. A. 7 - Controlling Chitosan Degradation Properties in Vitro and in Vivo. In *Chitosan Based Biomaterials Volume 1*; Jennings, J. A., Bumgardner, J. D., Eds.; Woodhead Publishing, 2017; pp 159–182. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100230-8.00007-8>.

- (87) Paradossi, G.; Chiessi, E.; Venanzi, M.; Pispisa, B.; Palleschi, A. Branched-Chain Analogues of Linear Polysaccharides: A Spectroscopic and Conformational Investigation of Chitosan Derivatives. *Int. J. Biol. Macromol.* **1992**, *14* (2), 73–80. [https://doi.org/10.1016/0141-8130\(92\)90002-p](https://doi.org/10.1016/0141-8130(92)90002-p).
- (88) Hankiewicz, J.; Swierczek, E. Lysozyme in Human Body Fluids. *Clin. Chim. Acta* **1974**, *57* (3), 205–209. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(74\)90398-2](https://doi.org/10.1016/0009-8981(74)90398-2).
- (89) *N-acetylation in chitosan and the rate of its enzymic hydrolysis* - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2605289/> (accessed 2024-03-25).
- (90) Kim, I.-Y.; Seo, S.-J.; Moon, H.-S.; Yoo, M.-K.; Park, I.-Y.; Kim, B.-C.; Cho, C.-S. Chitosan and Its Derivatives for Tissue Engineering Applications. *Biotechnol. Adv.* **2008**, *26* (1), 1–21. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2007.07.009>.
- (91) Berger, J.; Reist, M.; Mayer, J. M.; Felt, O.; Peppas, N. A.; Gurny, R. Structure and Interactions in Covalently and Ionically Crosslinked Chitosan Hydrogels for Biomedical Applications. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2004**, *57* (1), 19–34. [https://doi.org/10.1016/S0939-6411\(03\)00161-9](https://doi.org/10.1016/S0939-6411(03)00161-9).
- (92) Zhu, S.; Li, Y.; He, Z.; Ji, L.; Zhang, W.; Tong, Y.; Luo, J.; Yu, D.; Zhang, Q.; Bi, Q. Advanced Injectable Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.954501>.
- (93) Guo, C.; Cao, Z.; Peng, Y.; Wu, R.; Xu, H.; Yuan, Z.; Xiong, H.; Wang, Y.; Wu, Y.; Li, W.; Kong, Q.; Wang, Y.; Wu, J. Subchondral Bone-Inspired Hydrogel Scaffold for Cartilage Regeneration. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2022**, *218*, 112721. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2022.112721>.
- (94) Pita-López, M. L.; Fletes-Vargas, G.; Espinosa-Andrews, H.; Rodríguez-Rodríguez, R. Physically Cross-Linked Chitosan-Based Hydrogels for Tissue Engineering Applications: A State-of-the-Art Review. *Eur. Polym. J.* **2021**, *145*, 110176. <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2020.110176>.
- (95) Rodríguez-Rodríguez, R.; Espinosa-Andrews, H.; Velasquillo-Martínez, C.; García-Carvajal, Z. Y. Composite Hydrogels Based on Gelatin, Chitosan and Polyvinyl Alcohol to Biomedical Applications: A Review. *Int. J. Polym. Mater. Polym. Biomater.* **2020**, *69* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1080/00914037.2019.1581780>.
- (96) Chenite, A.; Chaput, C.; Wang, D.; Combes, C.; Buschmann, M. D.; Hoemann, C. D.; Leroux, J. C.; Atkinson, B. L.; Binette, F.; Selmani, A. Novel Injectable Neutral Solutions of Chitosan Form Biodegradable Gels in Situ. *Biomaterials* **2000**, *21* (21), 2155–2161. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(00\)00116-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(00)00116-2).
- (97) Nie, J.; Wang, Z.; Hu, Q. Difference between Chitosan Hydrogels via Alkaline and Acidic Solvent Systems. *Sci. Rep.* **2016**, *6* (1), 36053. <https://doi.org/10.1038/srep36053>.

- (98) Liu, L.; Tang, X.; Wang, Y.; Guo, S. Smart Gelation of Chitosan Solution in the Presence of NaHCO₃ for Injectable Drug Delivery System. *Int. J. Pharm.* **2011**, *414* (1–2), 6–15. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2011.04.052>.
- (99) Montembault, A.; Viton, C.; Domard, A. Rheometric Study of the Gelation of Chitosan in Aqueous Solution without Cross-Linking Agent. *Biomacromolecules* **2005**, *6* (2), 653–662. <https://doi.org/10.1021/bm049593m>.
- (100) Meka, V. S.; Sing, M. K. G.; Pichika, M. R.; Nali, S. R.; Kolapalli, V. R. M.; Kesharwani, P. A Comprehensive Review on Polyelectrolyte Complexes. *Drug Discov. Today* **2017**, *22* (11), 1697–1706. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2017.06.008>.
- (101) Escalante, S.; Rico, G.; Becerra, J.; San Román, J.; Vázquez-Lasa, B.; Aguilar, M. R.; Durán, I.; García-Fernández, L. Chemically Crosslinked Hyaluronic Acid-Chitosan Hydrogel for Application on Cartilage Regeneration. *Front. Bioeng. Biotechnol.* **2022**, *10*, 1058355. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.1058355>.
- (102) Sharma, S.; Swetha, K. L.; Roy, A. Chitosan-Chondroitin Sulfate Based Polyelectrolyte Complex for Effective Management of Chronic Wounds. *Int. J. Biol. Macromol.* **2019**, *132*, 97–108. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.03.186>.
- (103) Osorio Echavarría, J.; Gómez Vanegas, N. A.; Orozco, C. P. O. Chitosan/Carboxymethyl Cellulose Wound Dressings Supplemented with Biologically Synthesized Silver Nanoparticles from the Ligninolytic Fungus *Anamorphous Bjerkandera* Sp. R1. *Heliyon* **2022**, *8* (9), e10258. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2022.e10258>.
- (104) Marudova, M.; MacDougall, A. J.; Ring, S. G. Pectin–Chitosan Interactions and Gel Formation. *Carbohydr. Res.* **2004**, *339* (11), 1933–1939. <https://doi.org/10.1016/j.carres.2004.05.017>.
- (105) Baysal, K.; Aroguz, A. Z.; Adiguzel, Z.; Baysal, B. M. Chitosan/Alginate Crosslinked Hydrogels: Preparation, Characterization and Application for Cell Growth Purposes. *Int. J. Biol. Macromol.* **2013**, *59*, 342–348. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.04.073>.
- (106) Khaliq, T.; Sohail, M.; Minhas, M. U.; Ahmed Shah, S.; Jabeen, N.; Khan, S.; Hussain, Z.; Mahmood, A.; Kousar, M.; Rashid, H. Self-Crosslinked Chitosan/κ-Carrageenan-Based Biomimetic Membranes to Combat Diabetic Burn Wound Infections. *Int. J. Biol. Macromol.* **2022**, *197*, 157–168. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.12.100>.
- (107) Luo, Y.; Wang, Q. Recent Development of Chitosan-Based Polyelectrolyte Complexes with Natural Polysaccharides for Drug Delivery. *Int. J. Biol. Macromol.* **2014**, *64*, 353–367. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2013.12.017>.

- (108) Park, H.; Choi, B.; Hu, J.; Lee, M. Injectable Chitosan Hyaluronic Acid Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Acta Biomater.* **2013**, *9* (1), 4779–4786. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.08.033>.
- (109) Davachi, S. M.; Haramshahi, S. M. A.; Akhvirad, S. A.; Bahrami, N.; Hassanzadeh, S.; Ezzatpour, S.; Hassanzadeh, N.; Malekzadeh Kebria, M.; Khanmohammadi, M.; Bagher, Z. Development of Chitosan/Hyaluronic Acid Hydrogel Scaffolds via Enzymatic Reaction for Cartilage Tissue Engineering. *Mater. Today Commun.* **2022**, *30*, 103230. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.103230>.
- (110) Liu, M.; Zeng, X.; Ma, C.; Yi, H.; Ali, Z.; Mou, X.; Li, S.; Deng, Y.; He, N. Injectable Hydrogels for Cartilage and Bone Tissue Engineering. *Bone Res.* **2017**, *5* (1), 1–20. <https://doi.org/10.1038/boneres.2017.14>.
- (111) Perni, S.; Prokopovich, P. Rheometer Enabled Study of Cartilage Frequency-Dependent Properties. *Sci. Rep.* **2020**, *10* (1), 20696. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77758-9>.
- (112) Bhattarai, N.; Gunn, J.; Zhang, M. Chitosan-Based Hydrogels for Controlled, Localized Drug Delivery. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2010**, *62* (1), 83–99. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2009.07.019>.
- (113) Sung, H. W.; Huang, R. N.; Huang, L. L.; Tsai, C. C. In Vitro Evaluation of Cytotoxicity of a Naturally Occurring Cross-Linking Reagent for Biological Tissue Fixation. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **1999**, *10* (1), 63–78. <https://doi.org/10.1163/156856299x00289>.
- (114) Mi, F. L.; Tan, Y. C.; Liang, H. C.; Huang, R. N.; Sung, H. W. In Vitro Evaluation of a Chitosan Membrane Cross-Linked with Genipin. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2001**, *12* (8), 835–850. <https://doi.org/10.1163/156856201753113051>.
- (115) Reddy, N.; Reddy, R.; Jiang, Q. Crosslinking Biopolymers for Biomedical Applications. *Trends Biotechnol.* **2015**, *33* (6), 362–369. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2015.03.008>.
- (116) Kaczmarek, B.; Sionkowska, A.; Osyczka, A. M. The Comparison of Physico-Chemical Properties of Chitosan/Collagen/Hyaluronic Acid Composites with Nano-Hydroxyapatite Cross-Linked by Dialdehyde Starch and Tannic Acid. *Polym. Test.* **2017**, *62*, 171–176. <https://doi.org/10.1016/j.polymertesting.2017.06.027>.
- (117) Singh, A.; Narvi, S. S.; Dutta, P. K.; Pandey, N. D. External Stimuli Response on a Novel Chitosan Hydrogel Crosslinked with Formaldehyde. *Bull. Mater. Sci.* **2006**, *29* (3), 233–238. <https://doi.org/10.1007/BF02706490>.
- (118) Moradi-Araghi, A. Gelation of Acrylamide-Containing Polymers with Hexamethylenetetramine and an Aminobenzoic Acid Compound or Phenol.

- US5905100A, May 18, 1999. <https://patents.google.com/patent/US5905100A/en> (accessed 2024-04-24).
- (119) Moradi-Araghi, A. Application of Low-Toxicity Crosslinking Systems in Production of Thermally Stable Gels; OnePetro, 1994. <https://doi.org/10.2118/27826-MS>.
- (120) *Socio-Economic Benefits of Formaldehyde to the European Union (EU 25) and Norway*. (accessed 2024-04-26).
- (121) Kaur, N.; Kishore, D. An Insight into Hexamethylenetetramine: A Versatile Reagent in Organic Synthesis. *J. Iran. Chem. Soc.* **2013**, *10* (6), 1193–1228. <https://doi.org/10.1007/s13738-013-0260-2>.
- (122) Paiva, D.; Gonçalves, C.; Vale, I.; Bastos, M. M. S. M.; Magalhães, F. D. Oxidized Xanthan Gum and Chitosan as Natural Adhesives for Cork. *Polymers* **2016**, *8* (7), 259. <https://doi.org/10.3390/polym8070259>.
- (123) Wegrzynowska-Drzymalska, K.; Grebicka, P.; Mlynarczyk, D. T.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Kaczmarek, H.; Goslinski, T.; Ziegler-Borowska, M. Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Chitosan as a New Approach for Biomedical Applications. *Materials* **2020**, *13* (15), 3413. <https://doi.org/10.3390/ma13153413>.
- (124) Serrero, A.; Trombotto, S.; Cassagnau, P.; Bayon, Y.; Gravagna, P.; Montanari, S.; David, L. Polysaccharide Gels Based on Chitosan and Modified Starch: Structural Characterization and Linear Viscoelastic Behavior. *Biomacromolecules* **2010**, *11* (6), 1534–1543. <https://doi.org/10.1021/bm1001813>.
- (125) Lou, C.; Tian, X.; Deng, H.; Wang, Y.; Jiang, X. Dialdehyde- β -Cyclodextrin-Crosslinked Carboxymethyl Chitosan Hydrogel for Drug Release. *Carbohydr. Polym.* **2020**, *231*, 115678. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2019.115678>.
- (126) Gómez-Mascaraque, L. G.; Méndez, J. A.; Fernández-Gutiérrez, M.; Vázquez, B.; San Román, J. Oxidized Dextrins as Alternative Crosslinking Agents for Polysaccharides: Application to Hydrogels of Agarose–Chitosan. *Acta Biomater.* **2014**, *10* (2), 798–811. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.10.003>.
- (127) Tan, H.; Chu, C. R.; Payne, K.; Marra, K. G. Injectable In Situ Forming Biodegradable Chitosan-Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Biomaterials* **2009**, *30* (13), 2499–2506. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.080>.
- (128) Weng, L.; Chen, X.; Chen, W. Rheological Characterization of in Situ Crosslinkable Hydrogels Formulated from Oxidized Dextran and N-Carboxyethyl Chitosan. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (4), 1109–1115. <https://doi.org/10.1021/bm0610065>.
- (129) Kaczmarek, B.; Sionkowska, A.; Osyczka, A. M. The Application of Chitosan/Collagen/Hyaluronic Acid Sponge Cross-Linked by Dialdehyde Starch Addition

- as a Matrix for Calcium Phosphate in Situ Precipitation. *Int. J. Biol. Macromol.* **2018**, *107* (Pt A), 470–477. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.09.017>.
- (130) Flores, C.; Hornez, J.-C.; Chai, F.; Raoul, G.; Tabary, N.; Cazaux, F.; Ferri, J.; Martel, B.; Hildebrand, H.-F.; Blanchemain, N. Development of an Antibacterial Hybrid Sponge (Chitosan/Hydroxyapatite) for Bone. **2019**. <https://doi.org/10/11407>.
- (131) Gauzit, A. Élaboration d'un Dispositif Médical à Base de Chitosan et de Polymère de Cyclodextrine Pour Le Traitement Des Infections Du Pied Diabétique. These de doctorat, Université de Lille (2018-2021), 2019. <https://theses.fr/2019LILUS072> (accessed 2025-04-30).
- (132) Palomino Durand, C. Hydrogels Injectables et Éponges à Base de Complexe Polyélectrolytes (Chitosane/Polymère de Cyclodextrine) Pour Une Application En Ingénierie Tissulaire Osseuse. These de doctorat, Université de Lille (2018-2021), 2019. <https://www.theses.fr/2019LILUS006> (accessed 2023-06-12).
- (133) Palomino-Durand, C.; Lopez, M.; Marchandise, P.; Martel, B.; Blanchemain, N.; Chai, F. Chitosan/Polycyclodextrin (CHT/PCD)-Based Sponges Delivering VEGF to Enhance Angiogenesis for Bone Regeneration. *Pharmaceutics* **2020**, *12*, 784. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12090784>.
- (134) Lin, L.; Xu, Y.; Li, Y.; Gong, X.; Wei, M.; Zhang, W.; Zhang, X.; Xu, Y. Nanofibrous Wharton's Jelly Scaffold in Combination with Adipose-Derived Stem Cells for Cartilage Engineering. *Mater. Des.* **2019**, *186*, 108216. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2019.108216>.
- (135) Derensy-Dron, D. Etude Structurale de Polymères Glucidiques de Type Polydextrose. These de doctorat, Lille 1, 1998. <https://theses.fr/1998LIL10028> (accessed 2025-03-20).
- (136) Clark, T. P.; Finch, W. C.; Rand, C. Aqueous Compositions of Polyaldehydes from the Oxidation of Polysaccharides and Their Thermosets. EP2894172A1, July 15, 2015. <https://patents.google.com/patent/EP2894172A1/en> (accessed 2023-06-05).
- (137) Cui, S. Structural Analysis of Polysaccharides. *Food Carbohydr. Chem. Phys. Prop. Appl. M* **2005**. <https://doi.org/10.1201/9780203485286.ch3>.
- (138) Van Vlierberghe, S.; Graulus, G.-J.; Keshari Samal, S.; Van Nieuwenhove, I.; Dubruel, P. 12 - Porous Hydrogel Biomedical Foam Scaffolds for Tissue Repair. In *Biomedical Foams for Tissue Engineering Applications*; Netti, P. A., Ed.; Woodhead Publishing, 2014; pp 335–390. <https://doi.org/10.1533/9780857097033.2.335>.
- (139) Borzacchiello, A.; Ambrosio, L. Structure-Property Relationships in Hydrogels. In *Hydrogels: Biological Properties and Applications*; Barbucci, R., Ed.; Springer Milan: Milano, 2009; pp 9–20. https://doi.org/10.1007/978-88-470-1104-5_2.

- (140) Garcia-Fernandez, M. J.; Tabary, N.; Chai, F.; Cazaux, F.; Blanchemain, N.; Flament, M.-P.; Martel, B. New Multifunctional Pharmaceutical Excipient in Tablet Formulation Based on Citric Acid-Cyclodextrin Polymer. *Int. J. Pharm.* **2016**, *511* (2), 913–920. <https://doi.org/10.1016/j.ijpharm.2016.07.059>.
- (141) Kienzle-Sterzer, C. A.; Rodriguez-Sanchez, D.; Rha, C. K. Flow Behavior of a Cationic Biopolymer: Chitosan. *Polym. Bull.* **1985**, *13* (1), 1–6. <https://doi.org/10.1007/BF00264233>.
- (142) Fatimi, A.; François Tassin, J.; Quillard, S.; Axelos, M. A. V.; Weiss, P. The Rheological Properties of Siliated Hydroxypropylmethylcellulose Tissue Engineering Matrices. *Biomaterials* **2008**, *29* (5), 533–543. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.10.032>.
- (143) Cho, J.; Heuzey, M.-C.; Bégin, A.; Carreau, P. J. Viscoelastic Properties of Chitosan Solutions: Effect of Concentration and Ionic Strength. *J. Food Eng.* **2006**, *74* (4), 500–515. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2005.01.047>.
- (144) Rubinstein, M.; Semenov, A. N. Dynamics of Entangled Solutions of Associating Polymers. *Macromolecules* **2001**, *34* (4), 1058–1068. <https://doi.org/10.1021/ma0013049>.
- (145) Calero, N.; Muñoz, J.; Ramírez, P.; Guerrero, A. Flow Behaviour, Linear Viscoelasticity and Surface Properties of Chitosan Aqueous Solutions. *Food Hydrocoll.* **2010**, *24* (6), 659–666. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.03.009>.
- (146) Rwei, S.; Lien, C.-C. Synthesis and Rheological Characterization of Sulfonated Chitosan Solutions. *Colloid Polym. Sci.* **2014**, *292*. <https://doi.org/10.1007/s00396-013-3115-6>.
- (147) Steffe, J. F. *Rheological Methods in Food Process Engineering*; Freeman Press, 1996.
- (148) do Amaral Sobral, P. J.; Gebremariam, G.; Drudi, F.; De Aguiar Saldanha Pinheiro, A. C.; Romani, S.; Rocculi, P.; Dalla Rosa, M. Rheological and Viscoelastic Properties of Chitosan Solutions Prepared with Different Chitosan or Acetic Acid Concentrations. *Foods* **2022**, *11* (17), 2692. <https://doi.org/10.3390/foods11172692>.
- (149) Moura, M. J.; Figueiredo, M. M.; Gil, M. H. Rheological Study of Genipin Cross-Linked Chitosan Hydrogels. *Biomacromolecules* **2007**, *8* (12), 3823–3829. <https://doi.org/10.1021/bm700762w>.
- (150) Sánchez-Cid, P.; González-Ulloa, G.; Alonso-González, M.; Jiménez-Rosado, M.; Ráfii-El-Idrissi Benhnia, M.; Romero, A.; Ostos, F. J.; Perez-Puyana, V. M. Influence of Natural Crosslinkers on Chitosan Hydrogels for Potential Biomedical Applications.

- Macromol. Mater. Eng.* **2023**, *308* (12), 2300195.
<https://doi.org/10.1002/mame.202300195>.
- (151) Zarandona, I.; Bengoechea, C.; Álvarez-Castillo, E.; de la Caba, K.; Guerrero, A.; Guerrero, P. 3D Printed Chitosan-Pectin Hydrogels: From Rheological Characterization to Scaffold Development and Assessment. *Gels* **2021**, *7* (4), 175. <https://doi.org/10.3390/gels7040175>.
- (152) Herrada-Manchón, H.; Fernández, M. A.; Aguilar, E. Essential Guide to Hydrogel Rheology in Extrusion 3D Printing: How to Measure It and Why It Matters? *Gels* **2023**, *9* (7), 517. <https://doi.org/10.3390/gels9070517>.
- (153) Palomino Durand, C. Hydrogels Injectables et Éponges à Base de Complexe Polyélectrolytes (Chitosane/Polymère de Cyclodextrine) Pour Une Application En Ingénierie Tissulaire Osseuse. These de doctorat, Université de Lille (2018-2021), 2019. <https://theses.fr/2019LILUS006> (accessed 2024-06-05).
- (154) Aslzad, S.; Savadi, P.; Abdolahinia, E. D.; Omid, Y.; Fathi, M.; Barar, J. Chitosan/Dialdehyde Starch Hybrid in Situ Forming Hydrogel for Ocular Delivery of Betamethasone. *Mater. Today Commun.* **2022**, *33*, 104873. <https://doi.org/10.1016/j.mtcomm.2022.104873>.
- (155) Leone, G.; Consumi, M.; Lamponi, S.; Magnani, A. New Hyaluronic Acid Derivative with Prolonged Half-Life for Ophthalmological Formulation. *Carbohydr. Polym.* **2012**, *88* (3), 799–808. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.12.047>.
- (156) Wegrzynowska-Drzymalska, K.; Grebicka, P.; Mlynarczyk, D. T.; Chelminiak-Dudkiewicz, D.; Kaczmarek, H.; Goslinski, T.; Ziegler-Borowska, M. Crosslinking of Chitosan with Dialdehyde Chitosan as a New Approach for Biomedical Applications. *Mater. Basel Switz.* **2020**, *13* (15), 3413. <https://doi.org/10.3390/ma13153413>.
- (157) Li, B.; Shan, C.-L.; Zhou, Q.; Fang, Y.; Wang, Y.-L.; Xu, F.; Han, L.-R.; Ibrahim, M.; Guo, L.-B.; Xie, G.-L.; Sun, G.-C. Synthesis, Characterization, and Antibacterial Activity of Cross-Linked Chitosan-Glutaraldehyde. *Mar. Drugs* **2013**, *11* (5), 1534–1552. <https://doi.org/10.3390/md11051534>.
- (158) Some Studies of Crosslinking Chitosan-Glutaraldehyde Interaction in a Homogeneous System.
- (159) Tang, R.; Du, Y.; Fan, L. Dialdehyde Starch-Crosslinked Chitosan Films and Their Antimicrobial Effects. *J. Polym. Sci. Part B Polym. Phys.* **2003**, *41* (9), 993–997. <https://doi.org/10.1002/polb.10405>.
- (160) Tabong, C. D.; Ondoh, A. M.; Yufanyi, D. M.; Foba, J. Cobalt(II) and Zinc(II) Complexes of Hexamethylenetetramine as Single Source Precursors for Their Metal

- Oxide Nanoparticles. *J. Mater. Sci. Res.* **2015**, *4* (4), p70. <https://doi.org/10.5539/jmsr.v4n4p70>.
- (161) Anand, K.; Mohan, R.; Jayavel, R. Facile One-Pot Hydrothermal Synthesis and Structural Characterization of Transition Metals (Cu, Co and Mn) Doped ZnS Nanoparticles in HMTA Matrix. *J Mater Env. Sci* **2016**, *7*, 679–684.
- (162) Singh, A.; Narvi, S. S.; Dutta, P. K.; Pandey, N. D. External Stimuli Response on a Novel Chitosan Hydrogel Crosslinked with Formaldehyde. *Bull. Mater. Sci.* **2006**, *29* (3), 233–238. <https://doi.org/10.1007/BF02706490>.
- (163) Nath, S. D.; Abueva, C.; Kim, B.; Lee, B. T. Chitosan–Hyaluronic Acid Polyelectrolyte Complex Scaffold Crosslinked with Genipin for Immobilization and Controlled Release of BMP-2. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *115*, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.077>.
- (164) Deng, Y.; Ren, J.; Chen, G.; Li, G.; Wu, X.; Wang, G.; Gu, G.; Li, J. Injectable in Situ Cross-Linking Chitosan-Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Abdominal Tissue Regeneration. *Sci. Rep.* **2017**, *7* (1), 2699. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02962-z>.
- (165) Blanchemain, N.; Martel, B.; FLORES, C.; CAZAUX, F.; CHAI, F.; TABARY, N.; HEREDIA, M. L. Procédé de Fabrication d'hydrogel à Base de Chitosan et de Polyélectrolytes Chargés Négativement et Matériau Poreux Alvéolaire Issu Dudit Hydrogel. WO2017001808A1, January 5, 2017. <https://patents.google.com/patent/WO2017001808A1/fr> (accessed 2023-10-11).
- (166) Ji, C.; Shi, J. Thermal-Crosslinked Porous Chitosan Scaffolds for Soft Tissue Engineering Applications. *Mater. Sci. Eng. C* **2013**, *33* (7), 3780–3785. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.05.010>.
- (167) Rastogi, D. S. C.; Goyal, E. M. *Chemistry Class 12*; SBPD Publications, 2022.
- (168) Tan, H.; Chu, C. R.; Payne, K. A.; Marra, K. G. Injectable *in Situ* Forming Biodegradable Chitosan–Hyaluronic Acid Based Hydrogels for Cartilage Tissue Engineering. *Biomaterials* **2009**, *30* (13), 2499–2506. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.12.080>.
- (169) Nath, S. D.; Abueva, C.; Kim, B.; Lee, B. T. Chitosan–Hyaluronic Acid Polyelectrolyte Complex Scaffold Crosslinked with Genipin for Immobilization and Controlled Release of BMP-2. *Carbohydr. Polym.* **2015**, *115*, 160–169. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.08.077>.
- (170) Correia, C. R.; Moreira-Teixeira, L. S.; Moroni, L.; Reis, R. L.; van Blitterswijk, C. A.; Karperien, M.; Mano, J. F. Chitosan Scaffolds Containing Hyaluronic Acid for Cartilage Tissue Engineering. *Tissue Eng. Part C Methods* **2011**, *17* (7), 717–730. <https://doi.org/10.1089/ten.tec.2010.0467>.

- (171) Subramanian, A.; Lin, H.-Y. Crosslinked Chitosan: Its Physical Properties and the Effects of Matrix Stiffness on Chondrocyte Cell Morphology and Proliferation. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2005**, *75A* (3), 742–753. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30489>.
- (172) Yan, L.-P.; Wang, Y.-J.; Ren, L.; Wu, G.; Caridade, S. G.; Fan, J.-B.; Wang, L.-Y.; Ji, P.-H.; Oliveira, J. M.; Oliveira, J. T.; Mano, J. F.; Reis, R. L. Genipin-Cross-Linked Collagen/Chitosan Biomimetic Scaffolds for Articular Cartilage Tissue Engineering Applications. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2010**, *95A* (2), 465–475. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32869>.
- (173) Kocen, R.; Gasik, M.; Gantar, A.; Novak, S. Viscoelastic Behaviour of Hydrogel-Based Composites for Tissue Engineering under Mechanical Load. *Biomed. Mater.* **2017**, *12* (2), 025004. <https://doi.org/10.1088/1748-605X/aa5b00>.
- (174) Silva, S. S.; Motta, A.; Rodrigues, M. T.; Pinheiro, A. F. M.; Gomes, M. E.; Mano, J. F.; Reis, R. L.; Migliaresi, C. Novel Genipin-Cross-Linked Chitosan/Silk Fibroin Sponges for Cartilage Engineering Strategies. *Biomacromolecules* **2008**, *9* (10), 2764–2774. <https://doi.org/10.1021/bm800874q>.
- (175) Schuh, E.; Kramer, J.; Rohwedel, J.; Notbohm, H.; Müller, R.; Gutschmann, T.; Rotter, N. Effect of Matrix Elasticity on the Maintenance of the Chondrogenic Phenotype. *Tissue Eng. Part A* **2010**, *16* (4), 1281–1290. <https://doi.org/10.1089/ten.TEA.2009.0614>.
- (176) Zhou, Y.; Qiu, J.; Wan, L.; Li, J. The Effect of Matrix Stiffness on the Chondrogenic Differentiation of Mesenchymal Stem Cells. *J. Mol. Histol.* **2022**, *53* (5), 805–816. <https://doi.org/10.1007/s10735-022-10094-6>.
- (177) Murphy, C. M.; Matsiko, A.; Haugh, M. G.; Gleeson, J. P.; O'Brien, F. J. Mesenchymal Stem Cell Fate Is Regulated by the Composition and Mechanical Properties of Collagen-Glycosaminoglycan Scaffolds. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **2012**, *11*, 53–62. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.11.009>.
- (178) Irawan, V.; Sung, T.-C.; Higuchi, A.; Ikoma, T. Collagen Scaffolds in Cartilage Tissue Engineering and Relevant Approaches for Future Development. *Tissue Eng. Regen. Med.* **2018**, *15* (6), 673–697. <https://doi.org/10.1007/s13770-018-0135-9>.
- (179) Semwal, A.; Singh, B.; Archana, D.; Verma, A.; Dutta, P. Macromolecular Chitosan/Ciprofloxacin Pro-Drugs: Synthesis, Physico-Chemical and Biological Assessment for Drug Delivery Systems. *J. Polym. Mater.* **2012**, *29*, 1–13.
- (180) Arshad, R.; Tabish, T. A.; Kiani, M. H.; Ibrahim, I. M.; Shahnaz, G.; Rahdar, A.; Kang, M.; Pandey, S. A Hyaluronic Acid Functionalized Self-Nano-Emulsifying Drug Delivery System (SNEDDS) for Enhancement in Ciprofloxacin Targeted Delivery against Intracellular Infection. *Nanomater. Basel Switz.* **2021**, *11* (5), 1086. <https://doi.org/10.3390/nano11051086>.

- (181) Chijcheapaza-Flores, H.; Tabary, N.; Chai, F.; Maton, M.; Staelens, J.-N.; Cazaux, F.; Neut, C.; Martel, B.; Blanchemain, N.; Garcia-Fernandez, M. J. Injectable Chitosan-Based Hydrogels for Trans-Cinnamaldehyde Delivery in the Treatment of Diabetic Foot Ulcer Infections. *Gels* **2023**, *9* (3), 262. <https://doi.org/10.3390/gels9030262>.
- (182) Kovrlija, I.; Menshikh, K.; Abreu, H.; Cochis, A.; Rimondini, L.; Marsan, O.; Rey, C.; Combes, C.; Locs, J.; Loca, D. Challenging Applicability of ISO 10993-5 for Calcium Phosphate Biomaterials Evaluation: Towards More Accurate *in Vitro* Cytotoxicity Assessment. *Biomater. Adv.* **2024**, *160*, 213866. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2024.213866>.
- (183) Lovschall, H.; Eiskjaer, M.; Arenholt-Bindslev, D. Formaldehyde Cytotoxicity in Three Human Cell Types Assessed in Three Different Assays. *Toxicol. In Vitro* **2002**, *16* (1), 63–69. [https://doi.org/10.1016/S0887-2333\(01\)00093-5](https://doi.org/10.1016/S0887-2333(01)00093-5).